

---

---

**Qualité du sol — Effets des polluants sur  
les *Enchytraeidae* (*Enchytraeus* sp.) —  
Détermination des effets sur la  
reproduction et la survie**

*Soil quality — Effects of pollutants on Enchytraeidae (Enchytraeus  
sp.) — Determination of effects on reproduction and survival*

iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

[ISO 16387:2004](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/3c725054-fc9b-4a96-8fb6-6d3d53d9d0ce/iso-16387-2004)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/3c725054-fc9b-4a96-8fb6-6d3d53d9d0ce/iso-16387-2004>



**PDF – Exonération de responsabilité**

Le présent fichier PDF peut contenir des polices de caractères intégrées. Conformément aux conditions de licence d'Adobe, ce fichier peut être imprimé ou visualisé, mais ne doit pas être modifié à moins que l'ordinateur employé à cet effet ne bénéficie d'une licence autorisant l'utilisation de ces polices et que celles-ci y soient installées. Lors du téléchargement de ce fichier, les parties concernées acceptent de fait la responsabilité de ne pas enfreindre les conditions de licence d'Adobe. Le Secrétariat central de l'ISO décline toute responsabilité en la matière.

Adobe est une marque déposée d'Adobe Systems Incorporated.

Les détails relatifs aux produits logiciels utilisés pour la création du présent fichier PDF sont disponibles dans la rubrique General Info du fichier; les paramètres de création PDF ont été optimisés pour l'impression. Toutes les mesures ont été prises pour garantir l'exploitation de ce fichier par les comités membres de l'ISO. Dans le cas peu probable où surviendrait un problème d'utilisation, veuillez en informer le Secrétariat central à l'adresse donnée ci-dessous.

**iTeh STANDARD PREVIEW**  
**(standards.iteh.ai)**

[ISO 16387:2004](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/3c725054-fc9b-4a96-8fb6-6d3d53d9d0ce/iso-16387-2004)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/3c725054-fc9b-4a96-8fb6-6d3d53d9d0ce/iso-16387-2004>

© ISO 2004

Droits de reproduction réservés. Sauf prescription différente, aucune partie de cette publication ne peut être reproduite ni utilisée sous quelque forme que ce soit et par aucun procédé, électronique ou mécanique, y compris la photocopie et les microfilms, sans l'accord écrit de l'ISO à l'adresse ci-après ou du comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office  
Case postale 56 • CH-1211 Geneva 20  
Tel. + 41 22 749 01 11  
Fax. + 41 22 749 09 47  
E-mail [copyright@iso.org](mailto:copyright@iso.org)  
Web [www.iso.org](http://www.iso.org)

Publié en Suisse

## Sommaire

Page

Avant-propos .....	iv
Introduction .....	v
1 <b>Domaine d'application</b> .....	1
2 <b>Références normatives</b> .....	1
3 <b>Termes et définitions</b> .....	1
4 <b>Principe</b> .....	2
5 <b>Matériels</b> .....	3
6 <b>Appareillage</b> .....	5
7 <b>Environnement d'essai</b> .....	5
8 <b>Mode opératoire</b> .....	6
8.1 <b>Préparation des substrats d'essai</b> .....	6
8.2 <b>Préparation des contenus des récipients d'essai</b> .....	6
8.3 <b>Essai préliminaire</b> .....	6
8.4 <b>Essai définitif</b> .....	7
8.5 <b>Substance de référence</b> .....	8
8.6 <b>Récapitulatif et planification de l'essai</b> .....	9
9 <b>Calcul et expression des résultats</b> .....	10
9.1 <b>Généralités</b> .....	10
9.2 <b>Essai préliminaire</b> .....	10
9.3 <b>Essai définitif</b> .....	10
10 <b>Validité de l'essai</b> .....	11
11 <b>Rapport d'essai</b> .....	11
<b>Annexe A (normative) Description détaillée des techniques d'extraction</b> .....	13
<b>Annexe B (normative) Détermination des effets du sol contaminé sur la reproduction des <i>Enchytraeidae</i></b> .....	15
<b>Annexe C (informative) Détermination du pH</b> .....	20
<b>Annexe D (informative) Détermination de la capacité maximale de rétention d'eau</b> .....	21
<b>Annexe E (informative) Conditions de culture des espèces du genre <i>Enchytraeus</i></b> .....	22
<b>Annexe F (informative) Réalisation d'essais avec d'autres espèces du genre <i>Enchytraeus</i></b> .....	24
<b>Annexe G (informative) Présentation de l'évaluation statistique des données (détermination de la CSEO)</b> .....	26
<b>Bibliographie</b> .....	27

## Avant-propos

L'ISO (Organisation internationale de normalisation) est une fédération mondiale d'organismes nationaux de normalisation (comités membres de l'ISO). L'élaboration des Normes internationales est en général confiée aux comités techniques de l'ISO. Chaque comité membre intéressé par une étude a le droit de faire partie du comité technique créé à cet effet. Les organisations internationales, gouvernementales et non gouvernementales, en liaison avec l'ISO participent également aux travaux. L'ISO collabore étroitement avec la Commission électrotechnique internationale (CEI) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les Normes internationales sont rédigées conformément aux règles données dans les Directives ISO/CEI, Partie 2.

La tâche principale des comités techniques est d'élaborer les Normes internationales. Les projets de Normes internationales adoptés par les comités techniques sont soumis aux comités membres pour vote. Leur publication comme Normes internationales requiert l'approbation de 75 % au moins des comités membres votants.

L'attention est appelée sur le fait que certains des éléments du présent document peuvent faire l'objet de droits de propriété intellectuelle ou de droits analogues. L'ISO ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié de tels droits de propriété et averti de leur existence.

L'ISO 16387 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 190, *Qualité du sol*, sous-comité SC 4, *Méthodes biologiques*.

ITEH STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

[ISO 16387:2004](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/3c725054-fc9b-4a96-8fb6-6d3d53d9d0ce/iso-16387-2004)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/3c725054-fc9b-4a96-8fb6-6d3d53d9d0ce/iso-16387-2004>

## Introduction

La présente Norme internationale a été élaborée en tenant compte des modes opératoires recommandés par l'Organisation internationale de normalisation (ISO) et l'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE) (voir l'Article 2 et la Bibliographie).

La méthode décrite a été mise au point en vue d'expérimenter les effets liés à l'ajout de substances chimiques dans un sol artificiel. L'Annexe B décrit une adaptation de la méthode pour la mise à l'essai ou la comparaison de sols afin, par exemple, d'évaluer les résultats des traitements de dépollution. Cette méthode peut également être adaptée pour déterminer les effets sub-létaux et les niveaux sans effets des pesticides.

Les annélides du genre *Enchytraeus* vivant dans le sol sont pertinents sur le plan écologique. En effet, ils sont abondants dans de nombreux sols faiblement peuplés de lombriciens, mais leur densité de population peut également être élevée dans des sols où les lombriciens sont très répandus. Les *Enchytraeidae* peuvent être utilisés aussi bien pour des essais en laboratoire que pour des études en conditions naturelles ou semi-naturelles. Du point de vue pratique, de nombreuses espèces du genre *Enchytraeus* sont faciles à manipuler et à élever et présentent un cycle de reproduction nettement plus court que les lombriciens [la durée des essais de reproduction des *Enchytraeidae* est de quatre semaines à six semaines, contre douze semaines (synchronisation comprise) pour les lombriciens].

## iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

ISO 16387:2004

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/3c725054-fc9b-4a96-8fb6-6d3d53d9d0ce/iso-16387-2004>

**iTeh STANDARD PREVIEW**  
**(standards.iteh.ai)**

ISO 16387:2004

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/3c725054-fc9b-4a96-8fb6-6d3d53d9d0ce/iso-16387-2004>

# Qualité du sol — Effets des polluants sur les *Enchytraeidae* (*Enchytraeus* sp.) — Détermination des effets sur la reproduction et la survie

## 1 Domaine d'application

La présente Norme internationale décrit une méthode de détermination des effets des substances ou des sols contaminés sur la reproduction et la survie du ver *Enchytraeus albidus* (*Enchytraeidae*). Les animaux sont exposés aux substances par absorption cutanée et ingestion soit en utilisant un substrat de sol artificiel déterminé dans lequel des quantités définies de la substance sont incorporées, soit en utilisant un substrat de sol de qualité inconnue.

La présente Norme internationale est applicable aux substances d'essai solubles ou insolubles dans l'eau, bien que la méthode de préparation diffère. La méthode ne s'applique pas aux substances d'essai volatiles, c'est-à-dire aux substances dont  $H$  (la constante de Henry) ou le coefficient de partage air/eau est supérieur à 1, ou dont la pression de vapeur à 25 °C excède 0,013 3 Pa. Il convient de connaître la solubilité dans l'eau, et la pression de vapeur de la substance expérimentée. En outre, des informations sur la persistance de la substance expérimentée dans le sol sont souhaitables.

NOTE 1 Des informations écologiques et écotoxicologiques de base sur les *Enchytraeidae* en milieu terrestre sont fournies dans les références énumérées dans la Bibliographie.

NOTE 2 La stabilité de la substance expérimentée ne peut pas être garantie pendant toute la durée de l'essai. La méthode d'essai ne comporte aucune disposition relative au contrôle de la persistance de la substance expérimentée.

NOTE 3 L'Annexe B donne des recommandations d'adaptation de la méthode pour la comparaison et la surveillance de la qualité des sols.

## 2 Références normatives

Les documents de référence suivants sont indispensables pour l'application du présent document. Pour les références datées, seule l'édition citée s'applique. Pour les références non datées, la dernière édition du document de référence s'applique (y compris les éventuels amendements).

ISO 11268-2:1998, *Qualité du sol — Effets des polluants vis-à-vis des vers de terre* (*Eisenia fetida*) — *Partie 2: Détermination des effets sur la reproduction*

OCDE (Organisation de coopération et de développement économiques), 1984, *Earthworm, Acute Toxicity Tests (Ver de terre, Essais de toxicité aiguë)*, ligne directrice n° 207, OCDE, Paris

## 3 Termes et définitions

Pour les besoins du présent document, les termes et définitions suivants s'appliquent.

### 3.1

#### reproduction

augmentation du nombre moyen de jeunes par récipient d'essai après six semaines

### 3.2

#### **concentration létale pour 50 % des organismes soumis à l'essai**

##### **CL 50**

concentration létale moyenne, c'est-à-dire la concentration de la substance expérimentée qui provoque la mort de 50 % des animaux soumis à l'essai pendant l'essai préliminaire ou l'essai définitif

NOTE La CL 50 est exprimée en masse de substance expérimentée par masse sèche de substrat d'essai.

### 3.3

#### **concentration minimale avec effet observé**

##### **CMEO**

plus faible concentration d'essai à laquelle la substance expérimentée produit un effet statistiquement significatif sur la reproduction ( $p < 0,05$ ) par rapport au témoin

NOTE 1 La concentration est exprimée en masse de substance expérimentée par masse sèche de substrat d'essai pendant un temps d'exposition donné.

NOTE 2 Toutefois, toutes les concentrations d'essai supérieures à la CMEO doivent impérativement avoir un effet nocif supérieur ou égal au niveau observé pour la CMEO. Lorsque ces deux conditions ne peuvent être satisfaites, il convient que le choix de la CMEO [et donc de la CSEO (voir 3.4)] fasse l'objet d'explications exhaustives.

NOTE 3 Pour le présent essai, les effets sur la reproduction (nombre de jeunes) servent de paramètre de mesure.

### 3.4

#### **concentration sans effet observable**

##### **CSEO**

concentration d'essai immédiatement inférieure à la CMEO qui, comparée au témoin, ne produit aucun effet statistiquement significatif ( $p > 0,05$ ) pendant un temps d'exposition donné

NOTE Pour le présent essai, les effets sur la reproduction (nombre de jeunes) servent de paramètre de mesure.

[ISO 16387:2004](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/3c725054-fc9b-4a96-8fb6-6d3d53d9d0ce/iso-16387-2004)

### 3.5

##### **CE<sub>x</sub>**

concentration à laquelle un effet spécifique est détecté [où  $x$  est le pourcentage (10, 25, 50) de cet effet, par exemple sur la reproduction]

NOTE À titre d'exemple, la CE 50 correspond à la concentration estimée qui réduit de 50 % le taux de reproduction par rapport au témoin. Toutes les CE<sub>x</sub> sont exprimées en masse de substance expérimentée par masse sèche du substrat d'essai.

## 4 Principe

Des vers *Enchytraeidae* adultes sont exposés à une gamme de concentrations de la substance expérimentée mélangée à un sol artificiel. L'essai peut être scindé en deux étapes distinctes: un essai préliminaire de courte durée (deux semaines), durant lequel la gamme de concentrations entraînant des effets toxiques (principalement la mortalité) est déterminée, et un essai définitif à long terme (six semaines), au cours duquel la survie des vers adultes et la fécondité (nombre de jeunes) sont mesurées. L'essai est donc généralement effectué comme suit:

- a) pour les substances expérimentées de toxicité inconnue, il est recommandé d'effectuer un essai préliminaire d'une durée de 14 j, qui indique les concentrations provoquant la mortalité totale et l'absence de mortalité. La relation dose/effet ainsi obtenue est importante pour concevoir l'essai définitif de façon adéquate;

- b) l'essai définitif est conçu pour déterminer la concentration d'une substance expérimentée qui, mélangée au sol artificiel, entraîne un effet significatif défini ou un effet précis sur la reproduction. L'essai est également conçu pour étudier les effets létaux sur les *Enchytraeidae* adultes. La durée totale de l'essai définitif est de six semaines (une durée plus courte est possible si des espèces du genre *Enchytraeus* autres que *E. albidus* sont employées). Au bout des trois premières semaines, les vers adultes sont retirés et le nombre de vers vivants, ainsi que les modifications morphologiques (telles que lésions corporelles ou fragmentation du ver) sont enregistrés. Après une nouvelle période de trois semaines, le nombre de jeunes est comptabilisé après éclosion des cocons. Les valeurs de CSEO et CE<sub>x</sub> sur la reproduction sont déterminées.

## 5 Matériels

Le substrat d'essai et la substance expérimentée sont préparés à l'aide d'un matériel courant de laboratoire et conservés dans des récipients en verre.

### 5.1 Matériel biologique.

L'espèce recommandée pour l'essai est *Enchytraeus albidus* Hance 1837 (ver blanc; *Enchytraeidae*, *Oligochaeta*, *Annelida*). *E. albidus*, l'une des plus grandes espèces d'*Enchytraeidae*, se caractérise par une taille de 15 mm à 40 mm et une distribution géographique mondiale (voir la Bibliographie). Cette espèce est facilement reconnaissable grâce à deux caractéristiques: quatre soies par faisceau sur la face ventrale et un très long canal séminal dans la région du clitellum et de quelques segments postérieurs. On rencontre cette espèce en habitat marin, limnique et terrestre, principalement dans les matières organiques en décomposition (varech, compost) et seulement rarement dans les prairies. Cette tolérance écologique très étendue, ainsi que certaines variations morphologiques, indiquent que cette espèce peut englober plusieurs races (ou écotypes).

*E. albidus* peut être obtenu dans le commerce, puisqu'il est vendu comme aliment pour poissons. Il convient de vérifier si une culture est contaminée par d'autres espèces de taille généralement inférieure (voir la Bibliographie). En cas de contamination, tous les vers sont lavés à l'eau dans une boîte de Petri. Les spécimens adultes de *E. albidus* de grande taille sont sélectionnés à l'aide d'une loupe binoculaire pour démarrer une nouvelle culture. Tous les autres vers issus de la culture initiale sont éliminés. *E. albidus* peut être facilement élevé dans un grand nombre de déchets organiques (voir l'Annexe E) et présente un cycle de vie court, la maturité étant atteinte entre 33 j (à 18 °C) et 74 j (à 12 °C). Seules les cultures ayant été conservées au laboratoire pendant au moins cinq semaines sans problèmes (soit un cycle de génération) sont utilisables pour les essais.

D'autres espèces du genre *Enchytraeus*, telles que *E. buchholzi* Vejdovsky 1879 ou *E. crypticus* Westheide et Graefe 1992, populations réellement indigènes mais plus petites, sont également admises en tant qu'organismes d'essai (voir l'Annexe F). En cas d'utilisation d'autres espèces du genre *Enchytraeus*, il est obligatoire de les identifier clairement et il convient de mentionner les raisons pour lesquelles ces espèces ont été choisies, ainsi que les écarts par rapport à la méthode d'essai.

Il convient que les vers soumis aux essais soient des individus adultes porteurs d'œufs (points blancs) dans la région du clitellum et qu'ils soient de taille approximativement égale (environ 15 mm). Il n'est pas nécessaire de synchroniser la culture d'élevage. Il convient d'acclimater les *Enchytraeidae* dans un sol artificiel non traité, dans les conditions de l'essai pendant au minimum les 24 h qui précèdent l'essai. Durant cette période, il convient de distribuer des quantités suffisantes de la nourriture qui sera également utilisée comme source d'alimentation durant l'essai.

Il convient, pour un essai, de prélever dans la boîte d'élevage un échantillon surnuméraire de vers adultes possédant un clitellum, sans les observer en détail, afin de disposer d'une population de vers suffisante. Au terme de la période d'acclimatation, seuls les vers porteurs d'œufs et présentant un comportement normal (par exemple, n'essayant pas de s'échapper du sol artificiel) sont sélectionnés pour l'essai. La sélection est effectuée en observant à la loupe binoculaire les vers placés dans une boîte de Petri contenant une faible quantité d'eau et en éliminant les animaux dépourvus d'œufs. Il convient, de préférence, d'utiliser un milieu d'eau douce (telle que de l'eau reconstituée conformément à la ligne directrice n° 202 de l'OCDE), car l'eau déminéralisée ou l'eau du robinet (en cas de contamination au cuivre) risque d'être nocive pour les *Enchytraeidae*. Au cours de ce processus, les autres organismes vivant dans les cultures, tels que les mites, sont également séparés des vers.

## 5.2 Substrat d'essai.

La composition du sol artificiel préparé conformément à la ligne directrice n° 207 de l'OCDE et à l'ISO 11268-2 est la suivante (pourcentages exprimés en masse sèche):

- 10 % de tourbe de sphaigne [séchée à l'air et finement moulue ( $2 \text{ mm} \pm 1 \text{ mm}$ )]; il convient de contrôler les nouveaux lots de tourbe avant de les utiliser pour l'essai car la tourbe peut être toxique pour les vers;
- 20 % d'argile kaolinique (contenant de préférence plus de 30 % de kaolinite);
- environ 69 % (suivant la quantité de  $\text{CaCO}_3$  requise) de sable de quartz industriel séché à l'air (sable fin dominant dans lequel plus de 50 % des grains présentent une granulométrie comprise entre 0,05 mm et 0,2 mm).

Ajouter environ 0,3 % à 1,0 % de carbonate de calcium ( $\text{CaCO}_3$ , pulvérisé, de qualité analytique) pour obtenir un pH de  $6,0 \pm 0,5$ .

Il convient de déterminer la quantité de carbonate de calcium nécessaire en mesurant des sous-échantillons immédiatement avant l'essai. Cette quantité de carbonate de calcium peut en effet varier en fonction des caractéristiques du lot particulier (principalement celles de la tourbe).

Le sol artificiel est préparé en mélangeant soigneusement les composants secs énumérés plus haut à l'aide d'un mélangeur de laboratoire de grandes dimensions, environ une semaine avant le début de l'essai. Le sol artificiel mélangé doit être conservé à température ambiante pendant au moins deux jours afin d'équilibrer l'acidité.

Afin de déterminer le pH et la capacité maximale de rétention d'eau, le sol artificiel sec est préalablement humidifié un ou deux jours avant le début de l'essai avec assez d'eau déionisée pour atteindre environ la moitié de la teneur en eau finale requise, à savoir 40 % à 60 % de la capacité de rétention d'eau maximale. La valeur du pH est mesurée en mélangeant le sol avec une solution de KCl [ $c(\text{KCl}) = 1 \text{ mol/l}$ ] selon un rapport de 1 à 5 (voir l'Annexe C). Si le pH mesuré est hors de la plage de valeurs requises, une quantité suffisante de  $\text{CaCO}_3$  doit être ajoutée ou un nouveau lot de sol artificiel doit être préparé. La capacité maximale de rétention d'eau du sol artificiel doit être déterminée en parallèle de la détermination du pH. Cette opération est décrite en détail à l'Annexe D.

Ensuite, le sol artificiel est divisé en un nombre de lots égal au total du nombre de concentrations et de témoins utilisés durant l'essai. L'évaporation du substrat d'essai doit être évitée jusqu'au début de l'essai.

La teneur en eau finale est obtenue en ajoutant de l'eau contenant la substance expérimentée ou en ajoutant de l'eau parallèlement à l'introduction de la substance expérimentée. La teneur en eau au début et à la fin de l'essai est déterminée, par pesée, en séchant une petite quantité d'échantillon à  $105 \text{ }^\circ\text{C}$  durant une nuit, puis en la pesant à nouveau. Dans tous les cas, il convient que le substrat soit optimal pour les vers (même si, en raison du lot de tourbe utilisé, ces valeurs d'humidité ne sont pas atteintes). En cas de doute, il convient de contrôler l'humidité en procédant comme suit, lorsque le sol est légèrement pressé entre les doigts, il convient que seules des gouttelettes d'eau se forment.

## 5.3 Source d'alimentation, d'une qualité permettant au minimum d'assurer la survie de la population d'*Enchytraeidae*.

Les flocons d'avoine, de préférence autoclavés (ou éventuellement chauffés) avant usage afin d'éviter l'infection par d'autres organismes, se sont révélés adaptés. La première addition de nourriture est effectuée en mélangeant au sol 50 mg de flocons d'avoine réduits en poudre par récipient d'essai (après application de la substance expérimentée, mais avant d'ajouter les vers); les ajouts de nourriture ultérieurs (25 mg par récipient et par semaine, sauf au-delà de 28 j) sont effectués uniquement en surface afin d'éviter de blesser les vers. Les besoins en nourriture pouvant varier d'un récipient à l'autre, il convient d'ajuster la distribution à la demande (en d'autres termes, d'éviter toute suralimentation). Il convient de recouvrir les flocons de quelques particules de sol afin de réduire l'activité fongique.

## 5.4 Rouge bengale, éthanol.

## 6 Appareillage

Un matériel courant de laboratoire, et notamment les appareils suivants, sont nécessaires:

**6.1 Récipients en verre**, munis d'un couvercle (en verre ou en plastique perforé), de 0,20 l à 0,25 l de contenance et d'environ 6 cm de diamètre.

Les récipients en verre doivent convenir comme récipients d'essai, contenant une quantité de sol artificiel équivalant à 20 g de masse sèche. Les couvercles doivent permettre les échanges gazeux entre le substrat de sol et l'atmosphère.

**6.2 Étuve.**

**6.3 Loupe binoculaire.**

**6.4 Balances**, permettant des pesées de 50 g à 32 kg et d'une précision d'au moins 1 g.

**6.5 Balance d'analyse**, permettant des pesées de 25 mg à 200 g et d'une précision d'au moins 1 mg.

**6.6 pH-mètre.**

**6.7 Enregistreur de température**, par exemple thermomètre/hygromètre.

**6.8 Luxmètre.**

**6.9 Mélangeur.**

**6.10 Incubateur** ou petit local équipé d'un climatiseur.

**6.11 Pince d'horloger**, crochets, anses ou une petite brosse.

**6.12 Bacs de développement photographique**, à fond rainuré.

## 7 Environnement d'essai

Les récipients (6.1) sont recouverts d'un couvercle en verre pour empêcher la déshydratation du substrat d'essai, puis conservés dans les conditions d'essai pendant deux semaines (essai préliminaire) ou six semaines (essai définitif). La température d'essai est de  $20\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ . Il convient que la température ne dépasse pas cette valeur sous peine de nuire à la reproduction. L'essai est effectué dans des conditions de jours longs avec un cycle de lumière-obscurité contrôlé (de préférence de 16 h à 8 h, sous une lumière de 400 lx à 800 lx à proximité des récipients d'essai) afin d'empêcher les vers de s'échapper du sol.

Les récipients sont pesés au début de l'essai, puis une fois par semaine, la perte de masse étant compensée par l'apport de quantités appropriées d'eau déionisée. Cette déperdition peut être minimisée par le maintien d'un degré d'hygrométrie élevé (> 80 %) dans l'incubateur d'essai (6.10). Tous les récipients sont disposés dans l'incubateur dans un ordre aléatoire qu'il convient de modifier chaque semaine.

Au début et à la fin de l'essai préliminaire et de l'essai définitif, il convient de mesurer la teneur en eau et le pH. Pour faciliter le contrôle du pH et de l'humidité du substrat d'essai, il est recommandé d'utiliser des conteneurs supplémentaires (réplicats) pour chaque concentration et pour le témoin.

## 8 Mode opératoire

### 8.1 Préparation des substrats d'essai

#### 8.1.1 Substances expérimentées solubles dans l'eau

Immédiatement avant le début de l'essai, préparer une émulsion ou une dispersion de la substance expérimentée dans de l'eau déionisée, en quantité suffisante pour tous les réplicats d'une même concentration. Il est pratique d'utiliser une quantité d'eau permettant d'obtenir le taux d'humidité final du sol artificiel tel que requis en 5.2 (40 % à 60 % de la capacité maximale de rétention d'eau). Mélanger soigneusement l'émulsion ou la dispersion à la quantité de sol artificiel avant de l'introduire dans un récipient d'essai.

#### 8.1.2 Substances expérimentées non solubles dans l'eau mais solubles dans les solvants organiques

Dissoudre la quantité de substance expérimentée nécessaire pour obtenir la concentration souhaitée dans un solvant volatil (par exemple acétone ou hexane) et la mélanger à une quantité du sable de quartz recommandé. Après l'évaporation du solvant, obtenue en plaçant le conteneur sous une hotte aspirante pendant au moins une heure, ajouter le reste de sol artificiel (5.2) (dont la quantité de sable utilisée pour préparer la substance expérimentée) et l'eau, et mélanger soigneusement l'ensemble avant de l'introduire dans les récipients d'essai.

Il est possible d'effectuer la dispersion des substances faiblement solubles dans l'eau au moyen d'ultrasons, de solvants organiques, d'émulsifiants ou de produits dispersants. En cas d'utilisation de substances auxiliaires de ce type, il convient que toutes les concentrations d'essai et un témoin additionnel contiennent la même quantité minimale de substance auxiliaire.

**AVERTISSEMENT — Compte tenu des vapeurs de solvant, il convient de prendre des précautions appropriées pour éviter les dangers d'inhalation ou d'explosion et pour éviter d'endommager l'équipement d'extraction, les pompes, etc.**

#### 8.1.3 Substances expérimentées insolubles dans l'eau ou dans les solvants organiques

Préparer un mélange à partir de 10 g de sable de quartz finement moulu et de la quantité de substance expérimentée nécessaire pour obtenir la concentration souhaitée. Mélanger ensuite cette mixture soigneusement au sol artificiel préalablement humidifié et à la quantité d'eau déionisée nécessaire pour obtenir le taux d'humidité final requis avant l'introduction dans les récipients d'essai.

### 8.2 Préparation des contenus des récipients d'essai

Introduire une quantité de substrat d'essai (8.1) correspondant à 20 g de masse sèche dans chaque récipient d'essai (6.1).

Mélanger ensuite la nourriture (5.3) à l'ensemble et déposer 10 *Enchytraeidae* avec précaution à la surface du substrat d'essai à l'aide d'un instrument approprié (6.11). Il convient d'effectuer la sélection des vers et leur répartition par lots de 10 de manière aléatoire.

### 8.3 Essai préliminaire

S'il est nécessaire de déterminer la gamme de concentrations à utiliser au cours de l'essai définitif, effectuer un essai préliminaire avec environ cinq concentrations de la substance expérimentée dans la gamme 0,1 mg/kg, 1,0 mg/kg, 10 mg/kg, 100 mg/kg et 1 000 mg/kg (masse sèche de sol artificiel). Il n'est pas nécessaire de soumettre à l'essai les substances expérimentées à des concentrations supérieures à 1 000 mg/kg de masse sèche de sol artificiel. Il est recommandé d'utiliser un seul récipient (contenant 10 vers) pour chaque concentration et pour le témoin. La durée de l'essai est de 2 semaines, au bout desquelles la mortalité des vers est déterminée. Les vers sont considérés comme morts lorsqu'ils ne présentent aucune réaction à un léger stimulus mécanique au niveau de leur partie antérieure. En outre, il convient de vérifier la présence de jeunes en appliquant la méthode par coloration (voir l'Annexe A) à la fin de