

---

---

**Qualité du sol — Effets des polluants  
vis-à-vis des larves d'insectes  
(*Oxythyrea funesta*) — Détermination de  
la toxicité aiguë**

*Soil quality — Effects of pollutants on insect larvae (Oxythyrea  
funesta) — Determination of acute toxicity*

iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

[ISO 20963:2005](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/90e002e2-70bd-456f-ad6c-1b58084b521/iso-20963-2005)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/90e002e2-70bd-456f-ad6c-1b58084b521/iso-20963-2005>



**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 20963:2005](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/90e002e2-70bd-456f-ad6c-1bf58084b521/iso-20963-2005)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/90e002e2-70bd-456f-ad6c-1bf58084b521/iso-20963-2005>

© ISO 2005

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> .....	2
4 <b>Principe</b> .....	2
5 <b>Environnement de l'essai</b> .....	3
6 <b>Réactifs</b> .....	3
7 <b>Appareillage</b> .....	4
8 <b>Mode opératoire</b> .....	4
8.1 <b>Protocole d'essai</b> .....	4
8.2 <b>Préparation des mélanges d'essai</b> .....	5
8.3 <b>Préparation du récipient témoin</b> .....	6
8.4 <b>Apport de nourriture</b> .....	6
8.5 <b>Introduction du matériel biologique</b> .....	6
8.6 <b>Conditions d'essai et mesurages</b> .....	6
8.7 <b>Substance de référence</b> .....	7
9 <b>Expression des résultats</b> .....	7
9.1 <b>Calculs</b> .....	7
9.2 <b>Expression des résultats</b> .....	8
10 <b>Validité de l'essai</b> .....	8
11 <b>Rapport d'essai</b> .....	8
<b>Annexe A (informative) Exemple de technique d'élevage pour <i>Oxythyrea funesta</i></b> .....	10
<b>Annexe B (informative) Résultats de l'essai circulaire réalisé en France</b> .....	12
<b>Bibliographie</b> .....	13

## 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 20963 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 20963:2005  
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/90e002e2-70bd-456f-ad6c-1b58084b521/iso-20963-2005>

## Introduction

La présente Norme internationale décrit une méthode de détermination de la toxicité aiguë de sols contaminés et de produits chimiques vis-à-vis des larves de *Oxythyrea funesta*, un coléoptère phytophage (*Scarabaeidae*, *Cetoniinae*) ayant une vaste répartition géographique (Europe, Afrique du Nord et Moyen-Orient).

*Oxythyrea funesta* possède de nombreuses caractéristiques qui permettent de l'utiliser pour suivre la qualité du sol ou pour évaluer les effets des produits chimiques:

- une pertinence écologique: ce type d'organisme contribue d'un grand nombre de façons à la structure du sol en stimulant l'aération du sol et l'écoulement des eaux;
- les premiers stades de développement (incubation des œufs, cycle larvaire et nymphose) sont souterrains;
- les larves de *Oxythyrea funesta* sont tolérantes aux modifications de la granulométrie du substrat d'essai;
- cette espèce peut être élevée en conditions contrôlées.

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

[ISO 20963:2005](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/90e002e2-70bd-456f-ad6c-1b58084b521/iso-20963-2005)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/90e002e2-70bd-456f-ad6c-1b58084b521/iso-20963-2005>

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

ISO 20963:2005

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/90e002e2-70bd-456f-ad6c-1bf58084b521/iso-20963-2005>

# Qualité du sol — Effets des polluants vis-à-vis des larves d'insectes (*Oxythyrea funesta*) — Détermination de la toxicité aiguë

## 1 Domaine d'application

La présente Norme internationale décrit une méthode de détermination des effets des sols contaminés et des substances sur la survie des larves de *Oxythyrea funesta*. Les larves sont exposées aux polluants par absorption cuticulaire et ingestion.

Pour les sols contaminés, les effets sur la survie sont déterminés dans le sol soumis à essai et dans un sol témoin. Selon l'objectif de l'étude, le substrat utilisé pour le témoin et les dilutions (série de dilutions du sol contaminé) sont soit un sol non contaminé comparable à l'échantillon de sol à soumettre à essai, soit un substrat de sol artificiel. Les effets des substances sont évalués en utilisant un substrat de sol artificiel défini.

La présente Norme internationale n'est pas applicable aux substances volatiles, c'est-à-dire des substances pour lesquelles la constante de Henry ou le coefficient de partition air/eau est supérieur à 1, ou des substances pour lesquelles la pression de vapeur excède 0,001 33 Pa à 25 °C.

NOTE Cette méthode ne prend pas en compte la dégradation possible des substances ou des polluants au cours de l'essai.

[ISO 20963:2005](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/90e002e2-70bd-456f-ad6c-1bf58084b521/iso-20963-2005)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/90e002e2-70bd-456f-ad6c-1bf58084b521/iso-20963-2005>

## 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 10381-6, *Qualité du sol — Échantillonnage — Partie 6: Lignes directrices pour la collecte, la manipulation et la conservation de sols destinés à une étude en laboratoire des processus microbiens aérobies*

ISO 10390, *Qualité du sol — Détermination du pH*

ISO 11268-1, *Qualité du sol — Effets des polluants vis-à-vis des vers de terre (Eisenia fetida) — Partie 1: Détermination de la toxicité aiguë en utilisant des substrats de sol artificiel*

ISO 11269-2:—<sup>1)</sup> *Qualité du sol — Détermination des effets des polluants sur la flore du sol — Partie 2: Effets des substances chimiques sur l'émergence et la croissance des végétaux supérieurs*

---

1) À publier. (Révision de l'ISO 11269-2:1995)

### 3 Termes et définitions

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

**3.1**  
**concentration létale 50**  
**CL 50**  
concentration létale médiane de la substance expérimentée ou pourcentage de dilution du sol contaminé qui provoque la mort de 50 % des organismes d'essai pendant la période d'expérimentation

**3.2**  
**concentration létale  $x$**   
**CL $_x$**   
concentration de la substance expérimentée ou pourcentage de dilution du sol contaminé qui provoque la mort de  $x$  % des organismes d'essai pendant la période d'expérimentation

NOTE  $x$  correspond au pourcentage (10, 20, 25) de cet effet.

**3.3**  
**concentration minimale avec effet observé**  
**CMEO**  
plus faible concentration soumise à essai de la substance expérimentée ou du sol contaminé à laquelle est observé un effet statistiquement significatif par rapport au témoin

NOTE Toutes les concentrations d'essai supérieures à la CMEO ont un effet nocif supérieur ou égal à celui observé à la CMEO.

**3.4**  
**concentration sans effet observable**  
**CSEO**  
plus forte concentration soumise à essai de la substance expérimentée ou du sol contaminé pour laquelle aucun effet statistiquement significatif n'est observé par rapport au témoin

NOTE La CSEO est la concentration d'essai immédiatement inférieure à la CMEO.

**3.5**  
**mélange d'essai**  
mélange de la substance expérimentée avec le substrat d'essai, mélange de sol contaminé avec le substrat d'essai ou mélange de sol contaminé avec un sol non contaminé comparable à l'échantillon de sol soumis à essai

**3.6**  
**diapause**  
interruption du métabolisme durant le développement de l'œuf, de la larve, de la nymphe ou de l'imago

### 4 Principe

Des larves de *Cetoniinae* (espèce *Oxythyrea funesta*) sont exposées à une gamme de dilutions d'un sol contaminé ou à une gamme de concentrations de la substance soumise à essai. La mortalité des larves est déterminée après 10 jours. Les mélanges d'essai sont préparés au début de l'essai et ne sont pas renouvelés pendant la période d'expérimentation.

Les résultats obtenus à l'issue de l'essai sont comparés à un témoin et sont utilisés pour déterminer la concentration qui provoque 50 % de mortalité chez les larves (CL 50<sub>10jours</sub>).

L'essai est conduit en deux étapes:

- un essai préliminaire qui détermine la gamme appropriée de dilution/concentration lors de l'essai final;



- un essai définitif qui permet de déterminer les dilutions/concentrations provoquant entre 10 % et 90 % de mortalité, ceci constituant le résultat de l'essai.

Il est également possible de déterminer les effets des sols contaminés ou des substances sur la croissance des larves (en option). Le gain de poids au cours de la période d'expérimentation permet en effet de considérer ce critère comme complémentaire de la mortalité pour l'évaluation des effets des sols contaminés ou des substances.

## 5 Environnement de l'essai

Les essais doivent être réalisés à une température de  $(26 \pm 1)$  °C dans l'obscurité complète.

## 6 Réactifs

### 6.1 Matériel biologique

L'espèce utilisée est *Oxythyrea funesta* (*Scarabaeidae*, *Cetoniinae*). Des larves de troisième stade, dont le poids frais est compris entre 100 mg et 200 mg, sont requises pour réaliser l'essai. Les larves doivent être saines et exemptes de morsures ou d'autres blessures apparentes.

NOTE Selon les conditions d'élevage décrites à l'Annexe A, des larves âgées approximativement de deux semaines conviennent pour l'essai.

Des larves de taille similaire doivent être sélectionnées. La différence de masse entre la plus petite et la plus grosse des larves ne doit pas dépasser 50 mg dans un récipient d'essai donné.

Éliminer les particules de substrat d'élevage collées au tégument en utilisant, par exemple, un pinceau doux avant de peser les larves. Il est également possible de laisser les animaux se déplacer sur un papier légèrement humide pour éliminer le substrat d'élevage collé au tégument.

Il est nécessaire de synchroniser l'élevage. Un exemple de technique d'élevage de *Oxythyrea funesta* est donné à l'Annexe A.

### 6.2 Substrat d'essai

La quantité de substrat utilisé par récipient en verre (7.1) doit être équivalente à 300 g (poids sec).

Le substrat, appelé sol artificiel, doit avoir la composition suivante (conformément à l'ISO 11268-1):

- tourbe de sphaigne séchée à l'air, finement moulue et exempte de tout résidu de végétaux visible: 10 % (exprimé en équivalent sec);
- argile à kaolinite contenant au moins 30 % de kaolinite: 20 % (exprimé en équivalent sec);
- sable de quartz industriel (principalement du sable fin dont plus de 50 % des particules ont une taille comprise entre 0,05 mm et 0,20 mm): 70 % (exprimé en équivalent sec).

Ajouter du carbonate de calcium ( $\text{CaCO}_3$ ), pulvérisé et de qualité analytique reconnue, jusqu'à amener le pH du substrat humidifié à  $6,0 \pm 0,5$  (communément entre 0,5 % et 1 % du poids des ingrédients secs).

Préparer le sol artificiel en mélangeant soigneusement les composants secs énumérés ci-dessus dans un mélangeur de laboratoire de grande dimension. La quantité de carbonate de calcium requise peut varier selon les propriétés du lot individuel de tourbe de sphaigne et il convient de la déterminer en mesurant des sous-échantillons immédiatement avant l'essai.

Conserver le sol artificiel mélangé à température ambiante. Pour déterminer le pH et la capacité maximale de rétention d'eau, préhumidifier le sol artificiel sec au moins deux jours avant le début de l'essai en ajoutant de l'eau déionisée de façon à obtenir la moitié de la teneur en eau finale requise, à savoir 50 % de la capacité maximale de rétention d'eau.

Déterminer la capacité de rétention d'eau selon l'Annexe A de l'ISO 11269-2:— et déterminer le pH selon l'ISO 10390. Si le pH mesuré n'est pas dans la gamme requise, ajouter une quantité suffisante de CaCO<sub>3</sub> ou préparer un nouveau lot de sol artificiel.

**6.3 Nourriture pour larves**, c'est-à-dire de la bouse de vache séchée et finement moulue, aucune particule de plus de 1 mm.

La bouse de vache doit provenir d'animaux sains qui n'ont reçu aucun traitement (antibiotiques, stimulateur ou activateur de croissance) durant les deux semaines précédant la date de prélèvement. Il convient de vérifier tout particulièrement que les animaux n'ont pas été traités récemment contre les vers intestinaux.

**6.4 Substance de référence**, c'est-à-dire du 2,4,5-trichlorophénol de qualité analytique reconnue.

## 7 Appareillage

Utiliser le matériel courant de laboratoire et les matériels suivants.

**7.1 Récipients en verre**, d'une capacité de 0,5 l à 1 l environ, recouverts d'une membrane en polyéthylène (7.5) permettant les échanges entre le milieu et l'atmosphère.

**7.2 Broyeur**, ou tout autre appareil utilisable pour préparer la nourriture comme décrit en 6.3.

**7.3 Mélangeur de laboratoire de grande dimension**, pour la préparation du substrat d'essai (6.2).

**7.4 Balance**, avec une précision d'au moins 1 mg.

**7.5 Membrane en polyéthylène**, perforée de petits trous pour permettre les échanges entre le milieu et l'atmosphère.

## 8 Mode opératoire

### 8.1 Protocole d'essai

#### 8.1.1 Essai préliminaire

Réaliser le présent essai dans une gamme étendue de dilutions/concentrations (par exemple pour les sols contaminés: 0 %, 1 %, 5 %, 25 %, 50 %, 75 %, 100 %; pour les substances: 0 mg/kg, 1 mg/kg, 10 mg/kg, 100 mg/kg, 1 000 mg/kg).

Les substances ne sont généralement pas soumises à essai à des concentrations supérieures à 1 000 mg/kg (substrat d'essai exprimé en poids sec).

Utiliser les résultats de l'essai préliminaire pour sélectionner la gamme de dilutions/concentrations pour l'essai définitif. Pour établir cette gamme, il est recommandé de déterminer la concentration la plus élevée à laquelle aucun effet létal n'est observé et la concentration la plus faible à laquelle une mortalité de 100 % est observée.

Conduire l'essai préliminaire sans répétition.

Lorsque aucun effet n'est observé, même à la concentration de 1 000 mg/kg, l'essai définitif peut être conçu comme un essai limite.

### 8.1.2 Essai définitif

Sélectionner une gamme d'au moins cinq dilutions/concentrations du sol contaminé ou de la substance expérimentée en formant une progression géométrique entre la dilution/concentration la plus élevée n'ayant causé aucune mortalité et la concentration la plus faible ayant causé une mortalité totale (100 %) lors de l'essai préliminaire. Il convient que le rapport entre deux concentrations consécutives ne dépasse pas deux.

Si le rapport dépasse deux, il est nécessaire de disposer de deux concentrations pour lesquelles l'effet produit est compris entre 10 % et 90 %.

Lors de l'essai définitif, réaliser trois réplicats par concentration.

## 8.2 Préparation des mélanges d'essai

### 8.2.1 Sols

Tamiser les sols contaminés soumis à essai à travers un tamis de maille de 4 mm<sup>2</sup> pour éliminer les fragments grossiers. Avant l'essai, conserver les sols selon l'ISO 10381-6.

Pour chaque sol, il convient de déterminer les caractéristiques suivantes:

- a) le pH selon l'ISO 10390;
- b) la teneur en eau selon l'ISO 11465;
- c) la capacité de rétention d'eau selon l'Annexe A de l'ISO 11269-2:—;
- d) la capacité d'échange cationique selon l'ISO 11260;
- e) la teneur en matière organique selon l'ISO 10694.

Selon l'objectif de l'étude, il convient que le substrat utilisé pour le témoin et les dilutions (série de dilutions du sol contaminé) soit un sol non contaminé comparable à l'échantillon de sol à soumettre à essai ou bien le substrat de sol artificiel.

Si un sol prélevé sur le terrain est utilisé pour le témoin et les dilutions, il est recommandé de le traiter et de le caractériser comme décrit ci-dessus.

Mélanger le sol soumis à essai avec le sol prélevé sur le terrain ou avec le substrat d'essai (6.2) selon la gamme de dilutions/concentrations sélectionnée. La masse totale du sol et du substrat d'essai (6.2) (ou du sol prélevé sur le terrain) doit être égale à 300 g (poids sec) dans chaque récipient d'essai (7.1). Humidifier le mélange d'essai avec de l'eau déionisée pour atteindre 50 % de la capacité de rétention d'eau totale déterminée selon l'Annexe A de l'ISO 11269-2:— (la quantité totale d'eau est équivalente à l'eau nécessaire pour humidifier la masse du substrat d'essai du mélange + l'eau nécessaire pour humidifier la masse de sol du mélange). Mélanger soigneusement.

Déterminer le pH de chaque mélange d'essai (un récipient par concentration) selon l'ISO 10390.

### 8.2.2 Substances solubles dans l'eau

Dissoudre dans de l'eau déionisée (eau utilisée pour humidifier le substrat d'essai) la quantité de substance expérimentée requise pour obtenir la concentration souhaitée. La mélanger soigneusement avec le substrat d'essai partiellement humidifié.

Humidifier le mélange d'essai avec de l'eau déionisée pour atteindre 50 % de la capacité de rétention d'eau totale déterminée selon l'Annexe A de l'ISO 11269-2:—.

Déterminer le pH de chaque mélange d'essai (un récipient par concentration) selon l'ISO 10390.