
Qualité du sol — Effets des polluants vis-à-vis des vers de terre —

Partie 1:

Détermination de la toxicité aiguë vis-à-vis de *Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*

*Soil quality — Effects of pollutants on earthworms —
Part 1: Determination of acute toxicity to Eisenia fetida/Eisenia andrei*

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 11268-1:2012

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/37b9d6bf-8b50-4d5b-ac51-0b8e5e433919/iso-11268-1-2012>



iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

ISO 11268-1:2012

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/37b9d6bf-8b50-4d5b-ac51-0b8e5e433919/iso-11268-1-2012>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2012

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
Web www.iso.org

Publié en Suisse

Sommaire

Page

Avant-propos.....	iv
Introduction.....	v
1 Domaine d'application	1
2 Références normatives	1
3 Termes et définitions	2
4 Principe	3
5 Réactifs et matériaux	4
6 Appareillage	5
7 Mode opératoire	6
7.1 Plan d'expérimentation	6
7.2 Préparation des mélanges d'essai	7
7.3 Introduction des vers de terre	8
7.4 Conditions d'essai et mesurages	8
7.5 Substance de référence	9
8 Calcul et expression des résultats	9
8.1 Calcul	9
8.2 Expression des résultats	9
9 Validité de l'essai	9
10 Analyse statistique	10
10.1 Généralités	10
10.2 Essais à une seule concentration	10
10.3 Essais à plusieurs concentrations	11
11 Rapport d'essai	12
Annexe A (informative) Détermination de la toxicité aiguë des substances chimiques (en particulier les pesticides) sur les vers de terre dans des conditions d'essai tropicales	13
Annexe B (informative) Élevage d'<i>Eisenia fetida</i> et d'<i>Eisenia andrei</i>	15
Annexe C (informative) Détermination de la capacité de rétention d'eau	16
Annexe D (informative) Informations de base sur l'effet aigu de l'acide borique sur les vers de terre	17
Bibliographie	18

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 11268-1 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 190, *Qualité du sol*, sous-comité SC 4, *Méthodes biologiques*.

Cette deuxième édition annule et remplace la première édition (ISO 11268-1:1993), qui a fait l'objet d'une révision technique.

L'ISO 11268 comprend les parties suivantes, présentées sous le titre général *Qualité du sol — Effets des polluants vis-à-vis des vers de terre*:

- *Partie 1: Détermination de la toxicité aiguë vis-à-vis de Eisenia fetida/Eisenia andrei*
- *Partie 2: Détermination des effets sur la reproduction de Eisenia fetida/Eisenia andrei*
- *Partie 3: Lignes directrices relatives à la détermination des effets sur site*

Introduction

Des systèmes d'essais écotoxicologiques sont mis en œuvre pour obtenir des informations sur les effets des contaminants présents dans le sol et sont proposés en complément d'une analyse chimique conventionnelle (voir l'ISO 15799^[33] et l'ISO 17616^[34]). L'ISO 15799 comprend une liste et une brève caractérisation des systèmes d'essais recommandés et normalisés et l'ISO 17616 donne des lignes directrices pour le choix et l'évaluation des essais biologiques. Les systèmes d'essais aquatiques sur éluat de sol sont mis en œuvre pour obtenir des informations sur la fraction des contaminants susceptibles d'atteindre les eaux souterraines par le mouvement de l'eau (fonction de rétention des sols), alors que les systèmes d'essais terrestres sont utilisés pour évaluer la fonction d'habitat des sols. En tant que systèmes d'essais normalisés utilisant des vers de terre comme organismes indicateurs pour la fonction d'habitat du sol, un essai de toxicité aiguë pour la survie et un essai de toxicité chronique pour la reproduction sont disponibles.

La présente partie de l'ISO 11268 décrit une méthode basée sur la détermination de la toxicité aiguë des sols contaminés pour des vers de terre adultes des espèces *Eisenia fetida* (Savigny 1826) et *Eisenia andrei* (André 1963). La méthode peut éventuellement être utilisée pour évaluer le potentiel toxique aigu pour les vers de terre de produits chimiques ajoutés à un sol standard (par exemple un sol artificiel). En dernier lieu, des informations sont fournies sur la manière d'utiliser cette méthode pour évaluer des produits chimiques dans des conditions tropicales (voir l'Annexe A).

Eisenia fetida et *Eisenia andrei* sont considérés comme étant représentatifs de la faune du sol et des vers de terre en particulier. Des informations de base sur l'écologie des vers de terre et leur utilisation en écotoxicologie sont disponibles. D'autres espèces, par exemple *Aporrectodea caliginosa*, *Lumbricus rubellus* et *Lumbricus terrestris*, ont également été utilisées comme organismes d'essai. En général, ces espèces ou d'autres ne se sont pas avérées plus sensibles, et les bases de données et l'expérience dans l'évaluation des sols sont réduites^{[15][16][23]}.

La présente partie de l'ISO 11268 a été élaborée en tenant compte des modes opératoires d'essai adoptés par l'Organisation de coopération et de développement économiques^{[26][27]} et par l'Union européenne^[9].

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/37b9d6bf-8b50-4d5b-ac51-0b8e5e433919/iso-11268-1-2012>

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 11268-1:2012

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/37b9d6bf-8b50-4d5b-ac51-0b8e5e433919/iso-11268-1-2012>

Qualité du sol — Effets des polluants vis-à-vis des vers de terre —

Partie 1:

Détermination de la toxicité aiguë vis-à-vis de *Eisenia fetida*/ *Eisenia andrei*

AVERTISSEMENT — Les sols contaminés peuvent contenir des mélanges inconnus de produits chimiques toxiques, mutagènes ou nocifs d'une autre manière ou des micro-organismes infectieux. Des risques pour la santé au travail peuvent survenir en raison de la poussière ou de l'évaporation de produits chimiques pendant la manipulation et l'incubation. Il convient de prendre des mesures pour éviter tout contact avec la peau.

1 Domaine d'application

La présente partie de l'ISO 11268 spécifie l'une des méthodes permettant d'évaluer la fonction d'habitat des sols et de déterminer la toxicité aiguë de contaminants du sol et de produits chimiques pour *Eisenia fetida*/*Eisenia andrei* par absorption cutanée et ingestion. Elle s'applique aux sols et aux matériaux de type sol de qualité inconnue, provenant, par exemple, de sites contaminés, de sols amendés, de sols après remédiation, de sols agricoles ou autres sites d'intérêt et de déchets.

Les effets des substances sont évalués à l'aide d'un sol standard, de préférence un substrat de sol artificiel défini. 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 témoin et de dilution (gamme de dilutions d'un sol contaminé) peut être soit un sol non contaminé comparable à l'échantillon de sol à évaluer (sol de référence), soit un sol standard (par exemple un sol artificiel).

Des informations sont fournies sur la manière d'utiliser cette méthode pour évaluer des produits chimiques dans des conditions tempérées ainsi que dans des conditions tropicales.

La méthode ne s'applique pas aux substances volatiles, c'est-à-dire aux substances pour lesquelles H (constante de Henry) ou le coefficient de partage air/eau est supérieur à 1, ou pour lesquelles la pression de vapeur à 25 °C excède 0,013 3 Pa.

Cette méthode ne tient pas compte de l'éventuelle dégradation des substances ou contaminants pendant l'essai.

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, dans des conditions aérobies, de sols destinés à l'évaluation en laboratoire des processus, de la biomasse et de la diversité microbiens*

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

ISO 10694, *Qualité du sol — Dosage du carbone organique et du carbone total après combustion sèche (analyse élémentaire)*

ISO 11260, *Qualité du sol — Détermination de la capacité d'échange cationique effective et du taux de saturation en bases échangeables à l'aide d'une solution de chlorure de baryum*

ISO 11277, *Qualité du sol — Détermination de la répartition granulométrique de la matière minérale des sols — Méthode par tamisage et sédimentation*

ISO 11465, *Qualité du sol — Détermination de la teneur pondérale en matière sèche et en eau — Méthode gravimétrique*

3 Termes et définitions

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

- 3.1 contaminant**
substance ou agent présent(e) dans le sol et résultant de l'activité humaine
[ISO 15176:2002]
- 3.2 survie**
pourcentage de vers vivants au terme de la période d'essai
- 3.3 mortalité**
pourcentage de vers morts ou manquants au terme de la période d'essai
- 3.4 CL₅₀ concentration létale**
pourcentage létal médian d'un échantillon soumis à essai dans un sol témoin standard ou un sol de référence, ou concentration d'une substance dans l'échantillon soumis à essai, qui provoque la mort de 50 % des animaux d'essai au cours de la période d'exposition
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/37b9d6bf-8b50-4d5b-ac51-0b8e5e433919/iso-11268-1-2012>
- NOTE** La CL₅₀ est exprimée en pourcentage de masse sèche du sol d'essai par masse sèche du mélange d'essai.
- 3.5 essai limite**
essai à une seule concentration comprenant au moins quatre réplicats pour chacun, l'échantillon pour essai sans dilution ou la plus forte concentration de substances d'essai mélangées dans le sol témoin et le témoin
- 3.6 plus faible taux (RMEO) ou concentration ayant un effet observé (CMEO)**
pourcentage le plus faible d'un échantillon pour essai dans un sol témoin, ou concentration la plus faible d'une substance, pour lequel (laquelle) un effet statistiquement significatif est observé
- NOTE** La CMEO est exprimée en pourcentage de masse sèche de sol d'essai par masse sèche de mélange d'essai. Tous les mélanges d'essai supérieurs à la CMEO ont un effet nuisible supérieur ou égal à celui observé à la CMEO. Si cette condition ne peut pas être satisfaite, il convient d'expliquer comment la CMEO et la CSEO (3.7) ont été choisies.
- 3.7 CSEO concentration sans effet observé**
pourcentage de sol d'essai immédiatement inférieur à la CMEO ou concentration d'essai la plus élevée d'une substance soumise à essai qui, comparée au témoin, n'a aucun effet létal ou autre effet (tel qu'une modification de la masse (probabilité d'erreur $p < 0,05$) statistiquement significatif
- NOTE** La CSEO est exprimée en pourcentage de masse sèche du sol d'essai par masse sèche du mélange d'essai.
- 3.8 sol de référence**
sol non contaminé spécifique au site (par exemple prélevé au voisinage d'un site contaminé) ayant des propriétés similaires (concentrations d'éléments nutritifs, pH, teneur en carbone organique et texture) à celles du sol soumis à essai

3.9**sol standard**

sol prélevé sur le terrain ou sol artificiel dont les principales propriétés (par exemple pH, texture, teneur en matières organiques) se situent dans une gamme connue

EXEMPLE Euro-Soils^[21], sol artificiel^[26], sol standard LUFA^[24].

NOTE Les propriétés des sols standards peuvent différer de celles du sol d'essai.

3.10**sol témoin**

sol de référence ou sol standard utilisé comme témoin et comme milieu pour préparer une gamme de dilutions avec les échantillons pour essai ou une substance de référence qui satisfait les critères de validité

NOTE Pour un sol naturel, il est recommandé de démontrer sa capacité à être utilisé pour un essai et à atteindre les critères de validité de l'essai avant de l'utiliser dans un essai définitif.

3.11**mélange d'essai**

mélange d'un sol contaminé ou de la substance soumise à essai avec un **sol témoin** (3.10)

NOTE Les mélanges d'essai sont donnés en pourcentage de sol contaminé sur la base de la masse sèche du sol.

3.12**ratio de mélange d'essai**

rapport entre le sol soumis à essai et le sol témoin dans un mélange d'essai

NOTE Différents ratios peuvent être appliqués dans une gamme de dilutions afin de déterminer une relation dose-réponse.

(standards.iteh.ai)

4 Principe

ISO 11268-1:2012

Le pourcentage de mortalité de vers de terre adultes (espèce *Eisenia fetida* ou *Eisenia andrei*) exposés au sol soumis à essai est comparé à celui observé pour des échantillons exposés à un sol témoin. Si cela est approprié, les effets observés à la suite d'une exposition à une gamme de dilutions de sol contaminé ou à une gamme de concentrations d'une substance d'essai sont déterminés après sept jours et 14 jours. Les mélanges d'essai sont préparés au début de l'essai et ne sont pas renouvelés pendant la période d'essai.

Les résultats obtenus lors des essais sont comparés à ceux d'un témoin et sont utilisés pour déterminer les dilutions ou concentrations qui n'ont aucun effet sur la biomasse et la survie (CSEO) et qui entraînent une mortalité de 50 % des vers de terre (CL₅₀, 14 jours).

L'essai est réalisé en deux étapes:

- un essai préliminaire qui donne une indication approximative des dilutions (concentrations) responsables de la mortalité totale et de l'absence de mortalité, et qui sert à déterminer la gamme des concentrations pour l'essai définitif;
- un essai définitif pour déterminer les dilutions (concentrations) provoquant une mortalité de 10 % à 90 %, et qui conduit au résultat de l'essai.

Si l'essai préliminaire révèle une absence de mortalité, un essai limite (voir 7.1.3) peut être réalisé comme essai définitif.

NOTE L'utilisation d'un sol de référence est une exigence essentielle pour démontrer l'état actuel de la population soumise à essai et éviter toute mauvaise interprétation des résultats.

5 Réactifs et matériaux

5.1 Réactif biologique, constitué de vers de terre adultes de l'espèce *Eisenia fetida* ou *Eisenia andrei*^{[12][17]}^[19], âgés d'au moins trois mois, possédant un clitellum et dont la masse humide est comprise entre 300 mg et 600 mg (*E. fetida*) ou entre 250 mg et 600 mg (*E. andrei*).

Sélectionner les vers à utiliser pour l'essai de manière à obtenir, dans la mesure du possible, une population homogène du point de vue de la taille et de la masse. Il est préférable de sélectionner les vers dans un élevage synchrone ayant une structure d'âge relativement homogène. Laver les vers à l'eau potable avant l'essai.

NOTE Un exemple de technique d'élevage d'*Eisenia fetida*/*Eisenia andrei* est donné dans l'Annexe B.

5.2 Échantillon soumis à essai, qui peut être constitué d'un sol prélevé sur le terrain ou d'un sol témoin amendé par la substance soumise à essai.

5.2.1 Sols prélevés sur le terrain, sol ou déchets

Le ou les échantillons peuvent être un sol prélevé sur un site industriel, agricole ou autre site d'intérêt, ou des déchets (par exemple matériau de dragage, boues provenant d'une station d'épuration des eaux urbaines, matériau composite ou fumier) pour lesquels une éventuelle mise en dépôt terrestre est envisagée.

Les échantillons pour essai doivent être tamisés à 4 mm et soigneusement mélangés. Si nécessaire, le sol peut être séché à l'air sans chauffage avant le tamisage. Il convient que la conservation des échantillons pour essai soit aussi courte que possible. Conserver le sol conformément à l'ISO 10381-6 en utilisant des récipients qui réduisent au minimum les pertes de contaminants du sol par volatilisation et sorption sur les parois des récipients. Il convient de ne pas corriger le pH du sol car il peut avoir une incidence sur la biodisponibilité des contaminants du sol.

Pour l'interprétation des résultats d'essai, les caractéristiques suivantes doivent être déterminées pour chaque échantillon de sol prélevé sur le terrain:

- <https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/37b9d6bf-8b50-4d5b-ac51-0b8e5e433919/iso-11268-1-2012>
- pH conformément à l'ISO 10390;
 - texture (sable, limon, vase) conformément à l'ISO 11277;
 - teneur en eau conformément à l'ISO 11465;
 - capacité de rétention d'eau conformément à l'Annexe C;
 - capacité d'échange cationique conformément à l'ISO 11260;
 - carbone organique conformément à l'ISO 10694.

Selon l'objectif de l'étude, il convient que le substrat témoin et de dilution (gamme de dilutions d'un sol contaminé) soit un sol non contaminé comparable à l'échantillon de sol à évaluer (sol de référence) ou un sol standard, de préférence le substrat de sol artificiel.

NOTE Il est important de mesurer la capacité de rétention d'eau de tous les mélanges utilisés dans l'essai.

5.2.2 Sol témoin, soit a) sol de référence (3.8) soit b) sol standard (3.9) permettant la présence de vers de terre.

- Si des sols de référence provenant de zones non contaminées voisines d'un site contaminé sont disponibles, il convient de les traiter et de les caractériser de la même manière que les échantillons pour essai. S'il est impossible d'exclure une contamination toxique ou des propriétés inhabituelles du sol, il convient de préférer des sols témoins standards.
- Pour évaluer les effets de substances mélangées au sol ou pour préparer les dilutions de l'échantillon pour essai, des sols standards doivent être utilisés pour préparer l'échantillon pour essai. Les propriétés du sol standard prélevé sur le terrain doivent être consignées dans le rapport.

Le substrat appelé «sol artificiel» peut être utilisé comme un sol standard et a la composition suivante:

	Pourcentage exprimé en masse sèche
— Tourbe de sphaignes, finement moulue, exempte de tout résidu végétal visible	10 %
— Argile kaolinique contenant au moins 30 % de kaolinite	20 %
— Sable de quartz industriel (contenant en majorité du sable fin, constitué à plus de 50 % de grains de granulométrie comprise entre 0,05 mm et 0,2 mm)	69 %

Environ 0,3 % à 1,0 % de carbonate de calcium (CaCO_3 , pulvérisé, de qualité analytique) sont nécessaires pour obtenir un pH de $6,0 \pm 0,5$.

NOTE 1 Afin de prendre en compte les propriétés des substances fortement non polaires [$\log K_{ow} > 2$, où K_{ow} est le coefficient de partage (octanol/eau)] ou des substances ionisantes, 5 % de tourbe se sont avérés suffisants pour maintenir la structure souhaitée du sol artificiel.

NOTE 2 Il a été démontré que *Eisenia fetida* peut respecter les critères de validité, même en ce qui concerne la reproduction, lorsqu'il est soumis à essai dans des sols ayant une plus faible teneur en carbone organique (par exemple 2,7 %) [17], et l'expérience montre que cette teneur peut être obtenue dans un sol artificiel avec 5 % de tourbe. Par conséquent, avant d'utiliser un tel sol dans un essai définitif, il n'est pas nécessaire de démontrer que le sol artificiel permet de respecter les critères de validité, sauf si la teneur en tourbe est inférieure à la valeur spécifiée ci-dessus [27].

Préparer le sol artificiel au moins trois jours avant le début de l'essai, en mélangeant soigneusement les constituants secs indiqués ci-dessus dans un mélangeur de laboratoire de grandes dimensions. Une partie de l'eau déionisée nécessaire est ajoutée pendant le mélange. Il convient de tenir compte de l'eau qui est utilisée pour introduire la substance d'essai dans le sol. La quantité de carbonate de calcium nécessaire peut varier selon les propriétés du lot particulier de tourbe de sphaignes et il convient qu'elle soit déterminée par des mesurages effectués sur des sous-échantillons immédiatement avant l'essai. Conserver le sol artificiel mélangé à température ambiante pendant au moins deux jours pour équilibrer l'acidité. Pour déterminer le pH et la capacité maximale de rétention d'eau, le sol artificiel sec est pré-humidifié un jour ou deux jours avant le début de l'essai en ajoutant de l'eau déionisée de manière à atteindre approximativement la moitié de la teneur finale en eau requise correspondant à 40 % à 60 % de la capacité maximale de rétention d'eau.

La capacité totale de rétention d'eau est déterminée conformément à l'Annexe C; le pH est déterminé conformément à l'ISO 10390.

5.2.3 Acide borique, utilisé comme substance de référence (voir Annexe D).

6 Appareillage

Matériel courant de laboratoire, et ce qui suit.

6.1 Récipients d'essai, en verre ou autre matériau chimiquement inerte, de capacité comprise environ entre 1 l et 2 l. Il convient que les récipients aient une section transversale d'environ 200 cm² de manière à atteindre une hauteur de substrat humide d'environ 5 cm à 6 cm lorsque 500 g de substrat équivalent sec sont ajoutés. Les récipients d'essai doivent permettre les échanges gazeux entre le milieu et l'atmosphère ainsi que le passage de la lumière (par exemple au moyen d'un couvercle transparent perforé). Ils doivent être conçus de manière à empêcher les vers de terre de s'échapper (par exemple en fixant le couvercle à l'aide de ruban adhésif).

6.2 Appareillage permettant de déterminer la masse sèche du substrat, conformément à l'ISO 11465.

6.3 Mélangeur de laboratoire de grandes dimensions, pour la préparation de l'échantillon soumis à essai (5.2).

6.4 Balance, ayant une précision d'au moins 1 mg.