

ISO/TC 190/SC 4

Date: 2018-~~06~~

Deleted: 05-12

ISO ~~15952:2018~~(F)

Deleted: /FDIS

ISO/TC 190/SC 4

Secrétariat: AFNOR

**Qualité du sol — Effets des polluants vis-à-vis des escargots juvéniles (*Helicidae*)
— Détermination des effets sur la croissance par contamination du sol**

*Soil quality — Effects of pollutants on juvenile land snails (*Helicidae*) — Determination of
the effects on growth by soil contamination*

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 15952:2018

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/5e2a2ed5-04ea-4365-8e6b-cf8531f87ff1/iso-15952-2018>

Type du document : Norme internationale
Sous-type du document :
Stade du document : (50) Approbation
Langue du document : F

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 (IEC) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les procédures utilisées pour élaborer le présent document et celles destinées à sa mise à jour sont décrites dans les Directives ISO/IEC, Partie 1. Il convient, en particulier de prendre note des différents critères d'approbation requis pour les différents types de documents ISO. Le présent document a été rédigé conformément aux règles de rédaction données dans les Directives ISO/IEC, Partie 2 (voir www.iso.org/directives).

L'attention est attirée 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. Les détails concernant les références aux droits de propriété intellectuelle ou autres droits analogues identifiés lors de l'élaboration du document sont indiqués dans l'Introduction et/ou dans la liste des déclarations de brevets reçues par l'ISO (voir www.iso.org/brevets).

Les appellations commerciales éventuellement mentionnées dans le présent document sont données pour information, par souci de commodité, à l'intention des utilisateurs et ne sauraient constituer un engagement.

Pour une explication de la nature volontaire des normes, la signification des termes et expressions spécifiques de l'ISO liés à l'évaluation de la conformité, ou pour toute information au sujet de l'adhésion de l'ISO aux principes de l'Organisation mondiale du commerce (OMC) concernant les obstacles techniques au commerce (OTC), voir le lien suivant: www.iso.org/avant-propos.

Le présent document a été élaboré par le comité technique ISO/TC 190, *Qualité du sol*, sous-comité SC 4, *Caractérisation biologique*.

Cette deuxième édition annule et remplace la première édition (ISO 15952:2006), qui a fait l'objet d'une révision technique.

Introduction

En raison du nombre limité de données disponibles sur la toxicité des contaminants sur les organismes vivant dans le sol, l'écotoxicité des sols et des déchets sont très préoccupants tant au niveau national qu'au niveau international. Les essais actuellement disponibles utilisent les organismes de la faune du sol limités aux embranchements annélides (vers de terre et *Enchytraeidae*) et des arthropodes (insectes: Collembolés et Coléoptères). Parmi ces derniers, deux normes évaluent la toxicité aiguë (vers de terre (ISO 11268-1) et larves de coléoptères^[6] et trois autres normes traitent des effets sublétaux des contaminants du sol sur la reproduction (vers de terre,^[3] Collembolés,^[2] *Enchytraeidae*^[4]). Dans les cycles biologiques des organismes, il semble que la croissance est, tout comme la reproduction, un paramètre écophysologique fondamental à prendre en considération pour la viabilité des espèces et des écosystèmes^[38].

Les escargots sont des indicateurs écologiques pertinents pour l'évaluation de la qualité des sols (voir Références [16], [18] à [20], [32], [33], [40] à [42]), étant donné qu'ils sont caractéristiques de la couche superficielle du sol (saprophages et phytophages) et qu'une grande partie de leur cycle biologique a lieu dans le sol (ponté, éclosion, premiers stades du développement, hibernation, etc.).^{[7][18][29]} Pendant les autres phases de leur cycle, ils ingèrent du sol et sont en contact avec celui-ci par l'intermédiaire de leur sole pédieuse humide (pied), recouverte de mucus, et participent aux échanges permanents avec le sol (eau, sels minéraux, excréments, puis finalement la coquille et la matière organique quand ils meurent).^{[7][18][31]} De plus, ils représentent un lien important entre les plantes, la faune et les micro-organismes du sol. Ils répondent pleinement aux critères d'un bon indicateur biologique: faciles à collecter et à identifier, ils présentent une large répartition, ils accumulent les contaminants (voir Références [9], [11] à [15], [17], [18], [22], [24], [29], [30], [33] à [48]), leurs caractéristiques écologiques et physiologiques sont bien connues^{[7],[10],[32]} et ils sont, à présent, faciles à élever dans des conditions contrôlées.^{[22][26][32]} Leur sensibilité aux contaminants courants dans leur environnement a été démontrée (voir Références [11] à [16], [19] à [28], [30], [33] à [38], [37] à [48]).

La présente Norme internationale décrit une méthode pour déterminer les effets sur la survie et la croissance des escargots juvéniles de substances, de préparations (c'est-à-dire un mélange ou une solution composé d'au moins deux substances), de sols ou de déchets ajoutés à un sol artificiel ou naturel. La méthode décrite est donc applicable aux essais de sols contaminés ou à la comparaison de différents sols non contaminés. L'espèce recommandée est *Helix aspersa aspersa* Müller (aussi communément appelée: escargot petit-gris, escargot de jardin, Petit-Gris; synonymes: *Cantareus aspersus*, *Cornu aspersum*^[56]). Parmi les escargots terrestres (mollusques gastéropodes pulmonés stylommatophores de la famille *Helicidae*), *Helix aspersa aspersa* Müller est le plus répandu. Cette espèce paléarctique peut s'acclimater à des régions présentant des climats de types différents: méditerranéen, océanique tempéré, continental tempéré, voire tropical. *Helix aspersa aspersa* Müller est d'origine européenne et a été introduit dans le monde entier. Ces escargots se trouvent à présent sur tous les continents hormis l'Antarctique^[10].

Dans leur environnement naturel, les escargots assimilent les contaminants par contact (avec des substrats variés tels que le sol, les lixiviats du sol et la litière végétale), par ingestion (de plantes et de sol), de même que par les voies respiratoires.^{[7][29]} Ainsi, pour des objectifs particuliers (évaluation de la toxicité d'un pesticide, par exemple), une autre méthode d'essai basée sur l'exposition par ingestion d'aliments est disponible en option (Annexe F et Référence [6]).

Qualité du sol — Effets des polluants vis-à-vis des escargots juvéniles (*Helicidae*) — Détermination des effets sur la croissance par contamination du sol

1 Domaine d'application

Le présent document s'applique à une méthode semi-statique pour la détermination des effets de contaminants sur la croissance et la survie d'escargots juvéniles, généralement *Helix aspersa aspersa* Müller. Les animaux sont exposés par les voies cutanée et digestive à un substrat d'essai (sol artificiel ou naturel selon l'objectif de l'étude) auquel sont ajoutées des quantités définies:

- de substances, de mélanges ou de préparations;
- de sols (contaminés ou de qualité inconnue) ou de déchets.

Cet essai prend en considération les changements éventuels de la substance d'essai, de la préparation, du sol ou des déchets, étant donné que les mélanges d'essai sont préparés et renouvelés chaque semaine pendant la période d'essai de 28 jours.

Il est admis de mettre en œuvre une méthode statique en sus de la méthode semi-statique (facultatif). Cette méthode est décrite dans l'Annexe A.

Cette méthode ne s'applique pas aux substances dont le coefficient de partage air/sol est supérieur à 1, ou pour lesquelles la pression de vapeur est supérieure à 300 Pa à 25 °C.

2 Références normatives

Les documents suivants cités dans le texte constituent, pour tout ou partie de leur contenu, des exigences 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 10390. Qualité du sol — Détermination du pH

ISO 18400-206, *Qualité du sol — Échantillonnage — Partie 206: Lignes directrices pour la collecte, la manipulation et la conservation de sols destinés à l'évaluation de paramètres biologiques fonctionnels et structurels en laboratoire.*

Deleted: <std>ISO 10390, *Qualité du sol — Détermination du pH*</std>¶<std>

Deleted: </std>

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

ISO 11268-1, *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*.*

Deleted: <std>ISO 10694, *Qualité du sol — Dosage du carbone organique et du carbone total après combustion sèche (analyse élémentaire)*</std>¶<std>

Deleted: </std>

ISO 11269-2:2012, *Qualité du sol — Détermination des effets des polluants sur la flore du sol — Partie 2: Effets des sols contaminés sur l'émergence et la croissance des végétaux supérieurs.*

Deleted: <std>

Deleted: </std>



ISO 15952:2018(F)

Deleted: /FDIS

[ISO 11274, Qualité du sol — Détermination de la caractéristique de la rétention en eau — Méthodes de laboratoire](#)

Deleted: <std>ISO 11274, Qualité du sol — Détermination de la caractéristique de la rétention en eau — Méthodes de laboratoire</std>¶
<std>ISO 11465, Qualité du sol — Détermination de la teneur pondérale en matière sèche et en eau — Méthode gravimétrique</std>¶
<std>EN 14735, Caractérisation des déchets — Préparation des échantillons de déchets en vue d'essais écotoxicologiques</std>¶

[ISO 11465, Qualité du sol — Détermination de la teneur pondérale en matière sèche et en eau — Méthode gravimétrique](#)

[EN 14735, Caractérisation des déchets — Préparation des échantillons de déchets en vue d'essais écotoxicologiques](#)

3 Termes et définitions

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

L'ISO et l'IEC tiennent à jour des bases de données terminologiques destinées à être utilisées en normalisation, consultables aux adresses suivantes:

- IEC Electropedia: disponible à l'adresse <http://www.electropedia.org/>
- ISO Online browsing platform: disponible à l'adresse <https://www.iso.org/obp>

3.1 substrat d'essai

sol artificiel ou sol naturel utilisé comme témoin et comme substrat de dilution

3.2 matrice

sol ou déchet soumis à l'essai

3.3 mélange d'essai

mélange de la substance d'essai, de la préparation ou de la matrice avec le *substrat d'essai* (3.1)

3.4 croissance

<biomasse> augmentation de la biomasse, c'est-à-dire de la masse fraîche totale (corps et coquille) des organismes entre le début et la fin de l'essai

Note 1 à l'article: Elle s'exprime sous forme d'un coefficient de croissance $k_{CC,m}$.

3.5 croissance

<coquille> augmentation du diamètre maximal de la coquille entre le début et la fin de l'essai

Note 1 à l'article: Elle est exprimée sous forme d'un coefficient de croissance $k_{CC,d}$.

3.6 concentration efficace

CE_x
concentration à laquelle est décelé un effet spécifique; x est le pourcentage (10, 25, 50) de cet effet, par exemple inhibition de la croissance

EXEMPLE CE₅₀ est la concentration estimée pour réduire la croissance, à la fin de l'essai, de 50 % par rapport au témoin (CE_{50,m} et CE_{50,d} pour la croissance de la biomasse et de la coquille, respectivement).

3.7 concentration létale médiane

CL₅₀

concentration de la substance d'essai, de la préparation présente à l'origine ou concentration de la matrice entraînant la mort de 50 % des escargots soumis à l'essai

3.8

concentration minimale avec effet observé

CMEO

concentration la plus basse soumise à l'essai, à laquelle il est observé que la substance d'essai a un effet statistiquement significatif ($p < 0,05$) par rapport au témoin

Note 1 à l'article: Toutes les concentrations d'essai supérieures à la CMEO ont un effet nocif supérieur ou égal à ceux observés à la CMEO. Lorsqu'il n'est pas possible de satisfaire ces deux conditions, il convient d'expliquer dans le détail comment a été sélectionnée la CMEO (et par conséquent la CSEO).

3.9

concentration sans effet observable

CSEO

concentration de l'essai immédiatement inférieure à la CMEO, qui, lorsqu'elle est comparée à celle du témoin, ne produit aucun effet statistiquement significatif ($p > 0,05$) pendant un temps d'exposition donné

Note 1 à l'article: La CSEO est la concentration immédiatement inférieure à la CMEO.

Note 2 à l'article: Dans le cas de 3.6, 3.7, 3.8 et 3.9, les résultats sont exprimés:

- en masse sèche de la substance d'essai ou de la préparation par masse sèche du *substrat d'essai* (3.1);
- en pourcentage de la masse de la matrice soumise à l'essai dans le mélange d'essai (exprimé en masse sèche).

4 Principe

Des escargots terrestres juvéniles (généralement *Helix aspersa aspersa* Müller) sont exposés pendant une période de 28 jours à des mélanges d'essai contenant la substance d'essai, la préparation ou la matrice à différentes concentrations. Les mélanges d'essai sont fraîchement préparés et renouvelés tous les 7 jours.

En fonction des objectifs de l'étude, les mélanges d'essai peuvent être préparés avec du sol artificiel (6.3.2) ou un sol naturel adapté (6.3.3).

Pendant l'essai, les escargots sont nourris avec un aliment non contaminé.

Les effets sur la croissance (biomasse et diamètre de la coquille) et sur la survie sont mesurés après 28 jours d'exposition (facultativement, les effets peuvent être mesurés tous les 7 jours pendant 28 jours).

Les résultats obtenus au cours de l'essai sont comparés avec ceux d'un témoin afin de déterminer la CSEO ou la CMEO et ils permettent d'estimer la concentration qui réduit la croissance des escargots de 50 % en l'espace de 28 jours par rapport à la masse fraîche [CE_{50,m} (28 jours)] et au diamètre de la coquille [CE_{50,d} (28 jours)] ou à d'autres valeurs de CE_x.

Si les concentrations sélectionnées provoquent des effets létaux, les résultats obtenus au cours de l'essai sont comparés à ceux d'un témoin et sont utilisés pour estimer la concentration qui entraîne la mort de 50 % des escargots [CL₅₀ (28 jours)].

Dans des cas particuliers, il est possible de déterminer (facultatif) certains paramètres (CE_x, CSEO, CMEO, CL₅₀) après des périodes d'exposition inférieures à 28 jours (7 jours, 14 jours ou 21 jours).

L'essai comprend deux étapes:

- un essai préliminaire dont le but est de déterminer aussi bien la concentration sans effet observable (CSEO) que l'inhibition totale de la croissance. La relation dose/effet obtenue est importante pour la conception correcte de l'essai définitif;
- un essai définitif spécifiant les concentrations entraînant une inhibition de 10 % à 90 % de la croissance. Il n'est pas nécessaire d'effectuer un essai définitif lorsque l'essai préliminaire n'a pas révélé d'effets inhibiteurs à la concentration maximale soumise à essai.

5 Environnement de l'essai

L'essai doit être réalisé à une température de (20 ± 2) °C avec une photopériode jour-nuit de 18 h à 6 h. L'intensité lumineuse (lumière artificielle de type lumière du jour), sans lumière naturelle dans les récipients d'essai, doit être de 50 lx à 100 lx.

6 Réactifs

6.1 Eau, de pureté minimum déionisée.

6.2 Matériel biologique

Les organismes d'essai doivent être des escargots juvéniles. L'espèce recommandée est *Helix aspersa aspersa* Müller (également connue sous les noms de *Cantareus aspersus* et de *Cornu aspersum*), dont les individus doivent être âgés de 3 à 5 semaines et présenter une masse fraîche moyenne de $(1 \pm 0,3)$ g et un diamètre de coquille de $(15,5 \pm 1)$ mm.

NOTE Il est possible d'utiliser un autre genre et/ou une autre espèce d'*Helicidae* (voir les exemples et les conditions dans l'Annexe G).

Les escargots doivent être sélectionnés à partir d'un élevage synchrone afin d'obtenir une population plus homogène possible au regard de la taille, de la masse et de l'âge. Les techniques d'élevage des escargots sont décrites dans l'Annexe B. Après une période de nursery (de 3 à 5 semaines, voir l'Annexe B), les escargots juvéniles doivent être utilisés après une période d'estivation d'au moins 1 semaine et de 5 mois au plus. L'estivation a lieu dans des boîtes rondes en bois (diamètre de 12 cm et hauteur de 4 cm environ), les escargots étant soumis à des conditions sèches à une température de 17 °C à 20 °C.

De deux à trois jours avant de commencer l'essai, les escargots doivent être réveillés par une pulvérisation d'eau (6.1) dans les boîtes ayant servi à l'estivation. La proportion d'escargots non réveillés doit être inférieure à 10 %. Dès que les escargots reprennent leur activité (ils se décollent des parois de la boîte et commencent à se déplacer), ils doivent être transférés dans un récipient d'essai (7.1) ayant été préalablement humidifié avec de l'eau (6.1). Le fond de cette boîte est soit recouvert de papier absorbant ayant aussi été humidifié, soit contenir du substrat d'essai (6.3) humidifié de 50 % à 60 % de sa capacité de rétention d'eau. Il est nécessaire de nourrir les escargots (6.4) entre le moment du réveil et le début de l'essai (de 2 à 3 jours).

6.3 Substrat d'essai

6.3.1 Généralités

En fonction des objectifs de l'étude, le substrat d'essai peut être préparé avec du sol artificiel (voir 6.3.2) ou un sol naturel adapté (voir 6.3.3). Le substrat d'essai peut être utilisé sec ou brut (c'est-à-dire sans déshydratation préalable à l'utilisation pour le sol naturel).

Il est admis d'utiliser un sol artificiel en tant que témoin et substrat de dilution pour évaluer l'effet d'une substance ou d'une préparation, pour comparer différents sols ou déchets ou pour déterminer les effets d'un sol contaminé.

Il est admis d'utiliser un sol naturel (sol d'un champ) en tant que témoin et substrat de dilution pour évaluer, par exemple, l'effet de l'incorporation de boues de stations d'épuration d'eaux usées dans le sol d'un champ ou pour soumettre à essai l'effet d'un sol contaminé (dans ce cas, il est recommandé d'utiliser un sol non contaminé, comparable à l'échantillon de sol soumis à essai).

6.3.2 Sol artificiel

Le sol artificiel doit présenter la composition suivante (telle que définie par l'ISO 11268-1).

Voir Tableau 1.

Tableau 1 — Composition du sol artificiel

Composition	Pourcentage exprimé en masse sèche
Tourbe de sphaigne séchée à l'air et finement moulue (2 ± 1) mm, dépourvue de résidus végétaux visibles.	10
Argile à kaolinite, contenant de préférence au moins 30 % de kaolinite.	20
Sable quartzeux industriel séché à l'air (prédominance de sable fin avec plus de 50 % de la masse présentant une granulométrie comprise entre 0,05 mm et 0,2 mm).	Environ 69 % (en fonction de la quantité nécessaire de CaCO_3).
Carbonate de calcium (CaCO_3 , pulvérisé, de qualité analytique) pour ramener le pH du sol artificiel humide à $6,0 \pm 0,5$.	Environ 0,3 à 1,0.

Le sol artificiel doit être préparé au moins 2 jours avant le début de l'essai, en mélangeant parfaitement les constituants secs, indiqués ci-dessus, dans un mélangeur de laboratoire de grande dimension. La quantité de carbonate de calcium exigée peut varier en fonction des propriétés de chaque lot (en particulier de la tourbe) et il convient de la déterminer en mesurant des sous-échantillons immédiatement avant l'essai.

Il est nécessaire de stocker le sol artificiel mélangé à température ambiante pendant 2 jours au moins, afin d'en équilibrer l'acidité. Pour déterminer le pH et la capacité de rétention d'eau maximale, le sol artificiel sec est préhumidifié 1 ou 2 jours avant le début de l'essai, en ajoutant de l'eau déionisée, afin d'obtenir la moitié de la teneur en eau finale exigée de 50 % à 60 % de la capacité de rétention d'eau maximale.

La valeur du pH doit être mesurée conformément à l'ISO 10390. Si la valeur du pH mesurée ne se trouve pas dans la plage exigée, il est nécessaire d'ajouter une quantité suffisante de CaCO_3 ou de préparer un nouveau lot de sol artificiel. La capacité de rétention d'eau maximale du sol artificiel doit être déterminée conformément à l'ISO 11274 ou à l'ISO 11269-2:2012, Annexe C.

6.3.3 Sol naturel

Déterminer les paramètres suivants pour le sol naturel sélectionné qui doit être passé au tamis de 4 mm² afin d'en extraire les fragments de grosse taille:

- pH, conformément à l'ISO 10390;
- capacité de rétention d'eau conformément à l'ISO 11274 ou à l'ISO 11269-2:2012, Annexe C;
- teneur en eau conformément à l'ISO 11465;

— teneur en matière organique conformément à l'ISO 10694.

Il est aussi recommandé de déterminer la capacité d'échange cationique conformément à l'ISO 11260.

6.4 Nourriture

La nourriture doit être fournie sous forme de farine avec son taux d'humidité naturel (de 5 % à 10 %).

Afin que la croissance soit suffisante, il est recommandé d'effectuer les essais avec une nourriture à base de farine comprenant des céréales, du fourrage, des sels minéraux et des vitamines couvrant convenablement les besoins des escargots. Un exemple de composition de la nourriture est fourni dans l'Annexe C.

7 Appareillage

Le matériel de laboratoire habituel et ce qui suit.

7.1 Récipients d'essai

Boîtes à souris jetables en polystyrène transparent¹⁾ ou tout autre récipient dont le volume est égal à 1,6 l [dimensions approximatives recommandées: 24 cm (longueur) × 10,5 cm (largeur) × 8 cm (hauteur)].

7.2 Récipients de nourriture

Boîtes de Petri de 5,5 cm de diamètre environ et de 1 cm de hauteur environ ou tout autre récipient de dimensions équivalentes.

7.3 Pied à coulisse, d'une précision de 0,1 mm.

7.4 Balances

Une balance analytique d'une précision de 1 mg au moins. Deux autres balances, l'une avec une précision de 0,1 g, l'autre avec une précision de 1 g.

8 Stockage et préparation des échantillons

8.1 Sol à soumettre à essai

Les échantillons de sol reçus au laboratoire doivent être stockés selon l'ISO 18400-206.

L'échantillon de sol soumis à l'essai doit être passé au tamis de 4 mm² afin d'en extraire les fragments de grande taille.

Il est nécessaire de déterminer, pour chaque sol, les mêmes caractéristiques que pour le sol naturel (voir 6.3.3) qui peut être utilisé comme témoin ou comme substrat de dilution.

8.2 Déchets

Les échantillons de déchets reçus au laboratoire doivent être stockés conformément à l'EN 14735 [moins de 2 mois à (4 ± 3) °C].

Pour les essais, la granulométrie des déchets doit être inférieure à 4 mm. Si tel n'est pas le cas, il est nécessaire de réduire la granulométrie des déchets de telle manière que toutes les particules traversent un tamis de 4 mm².

9 Mode opératoire

9.1 Préparation de l'essai

9.1.1 Sélection des concentrations à soumettre à essai

9.1.1.1 Essai préliminaire

Cet essai est réalisé avec une vaste plage de concentrations.

- Quatre concentrations de la substance ou de la préparation et un témoin (par exemple 0 mg/kg; 50 mg/kg; 100 mg/kg; 500 mg/kg et 1 000 mg/kg de substrat d'essai) avec cinq escargots par concentration et par récipient. L'essai préliminaire peut être effectué sans répétition.
- Quatre pourcentages de la matrice étudiée et un témoin (par exemple 0 %; 12,5 %; 25 %; 50 % et 100 %) avec cinq escargots par pourcentage et par récipient. L'essai préliminaire peut être effectué sans répétition.

9.1.1.2 Essai définitif

Sélectionner une plage de cinq concentrations au moins de la substance d'essai, préparation ou matrice avec une progression géométrique, de manière à couvrir et à dépasser la plage des concentrations ou des pourcentages qui n'ont pas eu d'effet, lors de l'essai préliminaire, sur la croissance ou qui l'ont complètement inhibée. Le facteur de cette progression géométrique ne doit pas être supérieur à 2, de préférence.

Si le facteur est supérieur à 2, il est nécessaire d'avoir à disposition deux concentrations pour lesquelles l'effet observé est compris entre 10 % et 90 %.

Trois répétitions par concentration sont effectuées pour l'essai définitif.

9.1.2 Préparation des mélanges d'essai

9.1.2.1 Généralités

Le mélange d'essai (voir 3.3) comprend le substrat d'essai et la substance d'essai, la préparation ou la matrice. Préparer une quantité suffisante de mélange d'essai pour recouvrir le fond du récipient d'essai d'une couche de mélange d'essai d'au moins 1 cm.

Si la substance d'essai est utilisée à l'état brut (c'est-à-dire sans déshydratation préalable à l'utilisation), prendre en considération son taux d'humidité de manière à exprimer les concentrations en milligrammes de substance ou de préparation par kilogramme de substrat d'essai sec et, dans le cas des matrices, en pourcentage de masse de la matrice (exprimé en masse sèche) dans le mélange d'essai (exprimé en masse sèche).

9.1.2.2 Substances et préparations solubles dans l'eau ou émulsifiables

Pour chaque concentration étudiée, dissoudre la quantité adéquate de substance d'essai ou de préparation exigée pour l'obtention de la concentration souhaitée dans la même eau (6.1) que celle utilisée pour humidifier le substrat d'essai. Vaporiser la solution sur le substrat d'essai sec ou brut (6.3), puis mélanger soigneusement.

Le mélange d'essai définitif doit présenter un taux d'humidité correspondant à 50 % à 60 % de sa capacité de rétention d'eau totale (déterminée conformément à l'ISO 11274 ou conformément à l'ISO 11269-2:2012, Annexe C).



Mesurer le pH pour chacune des concentrations d'essai conformément à l'ISO 10390.

Procéder de même pour le traitement du témoin, hormis l'ajout de substance d'essai ou de préparation.

Poursuivre l'essai comme spécifié en 9.2.

9.1.2.3 Substances et préparations insolubles dans l'eau, mais solubles dans des solvants organiques

Dissoudre la quantité adéquate de substance d'essai ou de préparation exigée pour l'obtention de la concentration souhaitée dans un solvant volatil (du méthanol ou de l'acétone, par exemple). Vaporiser la solution obtenue sur le substrat d'essai sec ou brut (6.3). Mélanger le tout soigneusement puis laisser le solvant organique s'évaporer sous hotte aspirante pendant 24 h.

Humidifier le mélange avec de l'eau (6.1) à hauteur de 50 % à 60 % de sa capacité de rétention d'eau totale (déterminée conformément à l'ISO 11274 ou conformément à l'ISO 11269-2:2012, Annexe C), puis mélanger soigneusement.

Mesurer le pH pour chacune des concentrations d'essai conformément à l'ISO 10390.

Procéder de même pour le traitement du témoin, hormis l'ajout de substance d'essai ou de préparation.

Poursuivre l'essai comme spécifié en 9.2.

9.1.2.4 Substances et préparations insolubles à la fois dans l'eau et dans les solvants organiques

Lorsqu'une substance ou une préparation est insoluble dans un solvant volatil, préparer un mélange de 10 g de sable quartzueux industriel (voir 6.3.2) (prélevé au préalable de la quantité de sable exigée pour la préparation du substrat d'essai) et de la quantité de substance d'essai ou de préparation exigée pour obtenir la concentration souhaitée. Transférer le mélange obtenu dans un récipient contenant le substrat d'essai sec ou brut (6.3) (hormis les 10 g utilisés pour la contamination). Mélanger soigneusement.

Humidifier le mélange avec de l'eau (6.1) à hauteur de 50 % à 60 % de sa capacité de rétention d'eau totale (déterminée conformément à l'ISO 11274 ou conformément à l'ISO 11269-2:2012, Annexe C), puis mélanger soigneusement.

Mesurer le pH pour chacune des concentrations d'essai conformément à l'ISO 10390.

Procéder de même pour le traitement du témoin, hormis l'ajout de substance d'essai ou de préparation.

Poursuivre l'essai comme spécifié en 9.2.

9.1.2.5 Matrice

Des proportions croissantes de la matrice d'essai sont mélangées au substrat d'essai sec ou brut (6.3) (par exemple 0 %; 12,5 %; 25 %; 50 %; 100 %).

Le traitement du témoin correspond à 0 % de matrice d'essai, c'est-à-dire 100 % de sol artificiel (voir 6.3.2) ou de sol naturel (voir 6.3.3).

Humidifier le mélange avec de l'eau (6.1) à hauteur de 50 % à 60 % de sa capacité de rétention d'eau totale (déterminée conformément à l'ISO 11274 ou conformément à l'ISO 11269-2:2012, Annexe C), puis mélanger soigneusement. (L'eau ajoutée correspond au volume d'eau exigé pour réhydrater la quantité de substrat d'essai du mélange et au volume d'eau exigé pour réhydrater la quantité de matrice du mélange.)

S'il est nécessaire de réduire l'humidité des matrices, réaliser la déshydratation en plein air ou dans une étuve de séchage sans dépasser une température de 30 °C, afin de limiter la perte de substances volatiles.

Mesurer le pH pour chacune des concentrations d'essai conformément à l'ISO 10390.

Poursuivre l'essai comme spécifié en 9.2.

9.2 Répartition du mélange d'essai

En préparation de l'essai, ajouter une quantité suffisante de mélange d'essai (voir 9.1.2) dans les récipients d'essai (7.1) pour remplir les fonds des récipients d'essai sur une hauteur d'au moins 1 cm.

NOTE Si le substrat d'essai (6.3) est un sol artificiel, la quantité de mélange d'essai est d'environ 140 g (masse sèche) pour chaque récipient d'essai.

Égaliser la surface du mélange d'essai et compacter légèrement le sol.

9.3 Introduction de la nourriture

Placer le récipient (7.2) contenant la nourriture (6.4) sur le fond du récipient d'essai (7.1). La nourriture doit être administrée *ad libitum*.

9.4 Introduction du réactif biologique

Sélectionner cinq escargots (6.2) au hasard pour chaque récipient d'essai (7.1).

9.5 Manipulations pendant les essais

9.5.1 Généralités

Pendant les deux premières semaines de l'essai, recouvrir les récipients d'une plaque transparente perforée [par exemple en polyalkylméthacrylate (Plexiglas) mesurant environ 26,5 cm × 13,5 cm] maintenue en place à l'aide d'un dispositif approprié. Pendant les deux semaines suivantes, utiliser un deuxième récipient (7.1) renversé pour former le couvercle. Cette disposition permet de doubler le volume de l'enceinte d'essai et d'éviter un effet de groupe négatif sur la croissance des escargots (voir la Figure B.2).

NOTE Il est possible de perforer la plaque et le récipient utilisés pour couvrir les récipients d'essai de 3 à 4 trous de diamètre inférieur à 2 mm.

Placer les récipients d'essai avec les escargots dans les conditions de l'essai (voir l'Article 5). Les observer régulièrement et noter toute anomalie pouvant interférer avec le déroulement de l'essai.

9.5.2 Soins de routine

Pour chaque récipient d'essai, effectuer les opérations suivantes trois fois par semaine (par exemple le lundi, le mercredi et le vendredi):

- à l'aide d'une spatule, extraire régulièrement les excréments déposés sur le mélange d'essai, afin d'éviter leur accumulation et le développement de moisissures;
- nettoyer les parois latérales du récipient avec du papier absorbant humecté avec de l'eau (6.1) et nettoyer le couvercle avec de l'eau du robinet, puis le sécher et l'humecter de nouveau avec de l'eau (6.1);