
**Qualité du sol — Essai de
détermination de l'inhibition de
la reproduction chez les acariens
oribates (*Oppia nitens*) exposés aux
contaminants dans le sol**

*Soil quality — Test for measuring the inhibition of reproduction in
oribatid mites (*Oppia nitens*) exposed to contaminants in soil*

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

[ISO 23266:2020](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/99c931dd-344f-4f0c-8b1e-33ca50666114/iso-23266-2020)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/99c931dd-344f-4f0c-8b1e-33ca50666114/iso-23266-2020>



iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

ISO 23266:2020

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/99c931dd-344f-4f0c-8b1e-33ca50666114/iso-23266-2020>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2020

Tous droits réservés. Sauf prescription différente ou nécessité dans le contexte de sa mise en œuvre, 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, ou la diffusion sur l'internet ou sur un intranet, sans autorisation écrite préalable. Une autorisation peut être demandée à l'ISO à l'adresse ci-après ou au comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office
Case postale 401 • Ch. de Blandonnet 8
CH-1214 Vernier, Genève
Tél.: +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	4
5 Réactifs et matériel	5
6 Appareillage	7
7 Mode opératoire	8
7.1 Plan d'expérience.....	8
7.1.1 Généralités.....	8
7.1.2 Essai préliminaire.....	8
7.1.3 Essai définitif.....	8
7.2 Préparation du mélange d'essai.....	9
7.2.1 Essai sur sol contaminé.....	9
7.2.2 Essai sur substances ajoutées au substrat d'essai.....	10
7.2.3 Préparation des récipients témoins.....	10
7.3 Ajout des acariens.....	11
7.4 Conditions d'essai et mesurages.....	11
7.5 Détermination de la survie et de l'efficacité de reproduction des adultes.....	11
8 Calcul et expression des résultats	12
8.1 Calcul.....	12
8.2 Expression des résultats.....	12
9 Validité de l'essai	12
10 Analyse statistique	13
10.1 Généralités.....	13
10.2 Essais à une seule concentration.....	13
10.3 Essais multi-concentrations.....	13
10.3.1 Essai préliminaire.....	13
10.3.2 Essai définitif.....	14
11 Rapport d'essai	14
Annexe A (informative) Techniques d'élevage d'<i>Oppia nitens</i>	16
Annexe B (normative) Détermination de la capacité de rétention d'eau	19
Annexe C (informative) Recommandations relatives à l'ajustement du pH d'un sol artificiel	21
Annexe D (informative) Extraction et comptage d'<i>Oppia nitens</i>	22
Annexe E (informative) Performance de la méthode	26
Bibliographie	32

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.

(standards.iteh.ai)

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/iso/fr/avant-propos.

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

Il convient que l'utilisateur adresse tout retour d'information ou toute question concernant le présent document à l'organisme national de normalisation de son pays. Une liste exhaustive desdits organismes se trouve à l'adresse www.iso.org/fr/members.html.

Introduction

Les systèmes d'essais écotoxicologiques sont mis en œuvre pour obtenir des informations sur les effets des contaminants présents dans les sols et sont proposés pour compléter l'analyse chimique conventionnelle (voir l'ISO 15799^[1] et l'ISO 17616^[2]). L'ISO 15799 contient une liste et une brève caractérisation des systèmes d'essai recommandés et normalisés et l'ISO 17616 donne des recommandations sur le choix et l'évaluation des essais biologiques. Les systèmes d'essai aquatiques avec un éluat de sol sont mis en œuvre pour obtenir des informations sur la fraction des contaminants susceptibles d'être entraînés jusque dans les eaux souterraines par le cheminement de l'eau (fonction de rétention des sols), alors que les systèmes d'essai terrestres sont utilisés pour évaluer la fonction d'habitat des sols concernant le fait de subvenir aux besoins du biote du sol et de ses interactions.

Les acariens sont un groupe divers d'arthropodes, présent dans le monde entier, appartenant à une sous-classe des Arachnides, avec plus de 40 000 espèces comptabilisées, divisé en deux superordres (Acariformes et Parasitiformes). En raison de leur taille relativement petite (de quelques micromètres à quelques centimètres), ils occupent des niches écologiques spécifiques sur les végétaux et dans les sols^[5].

Dans les dernières années, il y a eu une augmentation des méthodes d'essai biologiques pour évaluer les sols contaminés, en retard par rapport aux autres milieux (par exemple, eau et sédiment). Les essais écotoxicologiques pour les sols sont confrontés, entre autres, à la complexité des systèmes terrestres (par exemple, manque d'homogénéité) et de la variété des voies d'exposition (par exemple, absorption par voie alimentaire, exposition à l'eau interstitielle ou aux vapeurs du sol, ou contact direct avec les particules de sol). Une méthode développée récemment (ISO 21285^[3]) évalue les effets d'un sol contaminé sur la reproduction de l'acarien prédateur (*Hypoaspis aculeifer*), principalement par absorption par voie alimentaire. Les acariens oribates représentent une niche différente de *H. aculeifer* dans le sol, mais pour autant essentielle, contribuant à la minéralisation du carbone et à la formation du sol, ainsi qu'au rejet d'azote et de phosphore par les activités de pâturage. Les acariens oribates comptent parmi les espèces de microarthropodes les plus variées et les plus abondantes du sol. Toutefois, leur métabolisme et leur croissance plus lents, couplés à une faible fécondité, une longue durée de vie et une capacité de dispersion limitée augmentent le risque de vulnérabilité et de sensibilité aux perturbations à court et long terme^[6]. L'utilisation d'acariens oribates dans le cadre des essais écotoxicologiques terrestre a été étudiée en détail^{[7][8][9][10][11]}. Les recherches récentes utilisant *Oppia nitens* pour les essais sur sols ont démontré une applicabilité et une sensibilité relative de l'espèce pour l'évaluation des sols contaminés des zones agronomiques ainsi que des écozones des plaines boréales et de la taïga^{[6][12][13][14][15]}. Les recherches ont également démontré sa sensibilité aux métaux^{[16][17][18][19]}, aux pesticides^{[20][21]} et aux composés organiques^{[16][17][22]}. *Oppia nitens* est un acarien oribate peuplant la couche organique supérieure du sol, et est un membre de la plus grande famille des oribates (Oppiidae), comptant environ 1 000 espèces dans 129 genres répartis dans les zones holarctiques et antarctiques^[23]. Ce sont des fongivores polyphages, se reproduisant par voie sexuée, qui peuvent être facilement élevés en laboratoire dans le sol ou sur le plâtre de Paris, et nourris avec de la levure de boulanger^[10].

Cette méthode décrit les modes opératoires pour réaliser des essais de 28 jours déterminant les effets de sols contaminés sur la survie et la reproduction de l'acarien oribate, *Oppia nitens*. En option, la méthode peut être utilisée pour évaluer le danger létal et subléthal des substances chimiques ajoutées aux sols standards (par exemple, sol artificiel) pour les acariens oribates. La performance de cette méthode a été évaluée lors d'une étude interlaboratoires internationale^[15], comme synthétisé à l'Annexe E. Les acariens représentent des communautés qui ne peuvent pas être exclues de l'évaluation des dangers pour l'environnement. Cette espèce est considérée comme étant représentative des acariens non prédateurs du sol.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 23266:2020

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/99c931dd-344f-4f0c-8b1e-33ca50666114/iso-23266-2020>

Qualité du sol — Essai de détermination de l'inhibition de la reproduction chez les acariens oribates (*Oppia nitens*) exposés aux contaminants dans le sol

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

1 Domaine d'application

Le présent document spécifie l'une des méthodes d'évaluation de la fonction d'habitat des sols et détermine les effets des contaminants et substances chimiques individuelles du sol sur la reproduction de l'acarien oribate, *Oppia nitens*, par absorption par voie dermique et alimentaire. Cet essai chronique (28 jours) est applicable aux sols et matériaux de type sol de qualité inconnue (par exemple, sites contaminés, sols amendés, sols après remédiation, sols agricoles ou autres sites sujets à préoccupation et déchets). Cette méthode n'est pas destinée à remplacer ni les essais sur vers de terre ou sur collemboles car elle représente un autre groupe taxonomique (= acariens; à savoir, arachnides), ni l'essai sur acariens prédateurs car cette espèce représente un niveau trophique et une niche écologique différents.

Les effets des substances sont évalués en utilisant un sol standard, de préférence un substrat défini de sol artificiel. Pour les sols contaminés, les effets sont déterminés dans le sol soumis à essai et dans un sol témoin. Selon l'objectif de l'étude, il convient que le substrat témoin et le substrat de dilution (séries de dilutions du sol contaminé) soient un sol non contaminé ayant des propriétés similaires à celles du sol à analyser (sol de référence) ou un sol standard (par exemple, sol artificiel).

Des informations sont fournies sur la façon d'utiliser cette méthode pour analyser les substances dans des conditions tempérées.

Le présent document n'est pas applicable aux substances pour lesquelles le coefficient de partage air/sol est supérieur à 1, ou aux substances dont la pression de vapeur dépasse 300 Pa à 25 °C.

NOTE La stabilité de la substance d'essai ne peut pas être garantie tout au long de la période d'essai. La méthode d'essai ne prévoit pas de contrôler la persistance de la substance soumise à essai.

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 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 et du taux de saturation en bases échangeables à l'aide d'une solution de chlorure de baryum*

ISO 11265, *Qualité du sol — Détermination de la conductivité électrique spécifique*

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*

ISO 18400-206, *Qualité du sol — Échantillonnage — Partie 206: Collecte, manipulation et conservation de sols destinés à l'évaluation de paramètres biologiques fonctionnels et structuraux en laboratoire*

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:

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

3.1

contaminant

substance ou agent présent(e) dans le sol du fait de l'activité humaine

3.2

concentration efficace

CE_x

concentration (fraction massique) d'un échantillon pour essai ou d'une substance d'essai qui engendre un effet de x % sur un critère d'effet donné durant une période d'exposition déterminée, par rapport à un témoin

EXEMPLE Une CE₅₀ est une concentration estimée produire un effet de 50 % d'une population exposée sur un critère d'effet donné durant une période d'exposition déterminée.

Note 1 à l'article: La CE_x est exprimée en pourcentage de sol soumis à essai (masse sèche) par mélange de sols (masse sèche). Lorsque des substances sont soumises à essai, la CE_x est exprimée en masse de substance d'essai par masse sèche de sol en milligrammes par kilogramme.

3.3

taux efficace

RE_x

taux d'un sol soumis à essai qui engendre un effet de x % sur un critère d'effet donné durant une période d'exposition déterminée, par rapport à un témoin

3.4

concentration létale

CL_x

concentration (fraction massique) d'un échantillon pour essai ou d'une substance d'essai qui engendre une mortalité de x % durant une période d'exposition déterminée, par rapport à un témoin

EXEMPLE Une CL₅₀ est une concentration estimée provoquer une mortalité de 50 % chez une population exposée sur une période d'exposition définie.

Note 1 à l'article: La CL_x est exprimée en pourcentage de sol soumis à essai (masse sèche) par mélange de sols (masse sèche). Lorsque des substances sont soumises à essai, la CL_x est exprimée en masse de substance d'essai par masse sèche de sol en milligrammes par kilogramme.

3.5

essai limite

essai à une seule concentration comprenant au moins cinq réplicats chacun, le *sol d'essai* (3.14) sans dilution ou la concentration maximale de substance d'essai mélangée dans le sol témoin et le témoin

3.6**concentration minimale avec effet observé****CMEO**

concentration d'essai minimale (fraction massique) d'un échantillon pour essai ou d'une substance d'essai ayant un effet statistiquement significatif (probabilité $p < 0,05$)

Note 1 à l'article: Dans cet essai, la CMEO est exprimée en pourcentage de sol soumis à essai (masse sèche) par mélange de sols (masse sèche) ou en masse de substance d'essai par masse sèche de sol soumis à essai. Il convient que toutes les concentrations d'essai supérieures à la CMEO présentent généralement un effet statistiquement différent du témoin.

3.7**taux minimal avec effet observé****RMEO**

taux minimal d'un sol soumis à essai dans un sol témoin pour lequel un effet statistiquement significatif est observé

3.8**concentration sans effet observé****CSEO**

concentration d'essai maximale (fraction massique) d'un échantillon pour essai ou d'une substance d'essai, immédiatement inférieure à la CMEO, à laquelle aucun effet n'est observé

Note 1 à l'article: Dans cet essai, la concentration correspondant à la CSEO ne présente aucun effet statistiquement significatif (probabilité $p < 0,05$) durant une période d'exposition déterminée, en comparaison avec le témoin.

3.9**taux sans effet observé****RSEO**

taux minimal d'un sol soumis à essai, immédiatement inférieur au RMEO, qui, en comparaison avec le témoin, ne présente aucun effet statistiquement significatif (probabilité $p < 0,05$) durant une période d'exposition déterminée

iTech STANDARD PREVIEW

(standards.iteh.ai)

ISO 23266:2020
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/99c931dd-344f-4f0c-8b1e-33ca50666114/iso-23266-2020>

3.10**reproduction**

nombre moyen de juvéniles par récipient d'essai après une incubation de 28 jours dans les conditions d'essai spécifiées

3.11**sol de référence**

sol non contaminé avec des propriétés pédologiques (concentrations en éléments nutritifs, pH, teneur en carbone organique et texture) comparables à celles du *sol d'essai* (3.14)

3.12**sol standard**

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

EXEMPLE Euro-sols, sol artificiel, sol standard LUFA.

Note 1 à l'article: Les propriétés des sols standards peuvent différer de celles du sol d'essai.

3.13**sol témoin**

sol de référence ou *sol standard* (3.12) utilisé comme témoin et comme milieu pour préparer une série de dilution avec des sols/échantillons d'essai ou une substance de référence, qui satisfait aux critères de validité

Note 1 à l'article: Dans le cas d'un sol naturel, il est recommandé de démontrer sa capacité à être utilisé pour un essai et à remplir les critères de validité de l'essai avant de l'utiliser dans un essai définitif.

3.14

sol d'essai

échantillon de sol prélevé sur le terrain ou de sol dopé avec une substance chimique, dont la toxicité doit être évaluée vis-à-vis des acariens

3.15

mélange d'essai

mélange d'un sol contaminé ou d'une substance d'essai (par exemple, substance chimique, biosolide, déchet) avec *un sol témoin* (3.13)

Note 1 à l'article: Les mélanges d'essai sont exprimés en pourcentage de sol contaminé par masse sèche de sol.

3.16

ratio de mélange d'essai

ratio entre le sol d'essai et le sol témoin dans un *mélange d'essai* (3.15)

Note 1 à l'article: Différents ratios peuvent être appliqués dans une série de dilutions pour établir une relation dose-effet.

4 Principe

Les effets sur la reproduction d'acariens adultes *Oppia nitens* élevés en laboratoire et exposés au sol d'essai, sont comparés à ceux observés pour les organismes présents dans le sol témoin. Si cela est approprié, les effets sont déterminés sur la base de l'exposition à un mélange d'essai de sol contaminé et de sol témoin ou à une gamme de concentrations d'une substance d'essai mélangée dans le sol témoin. Les mélanges d'essai sont préparés au début de l'essai et ne sont pas renouvelés au cours de la période d'essai.

L'essai commence avec 15 acariens adultes provenant d'élevages synchronisés (8 jours à 10 jours après exuviation (c'est-à-dire, mue) jusqu'au stade adulte) par récipient d'essai. L'essai est effectué dans des récipients en verre de 30 ml contenant le sol (poids humide) équivalent à un volume d'environ 20 ml, et au moins cinq réplicats sont préparés pour chaque traitement. L'essai se déroule pendant 28 jours à (20 ± 2) °C après quoi les juvéniles (F_1) éclosent des œufs pondus par les adultes et le nombre de juvéniles produits est déterminé. La survie des adultes est également déterminée à la fin de l'essai. Les résultats de l'essai, en fonction du plan d'expérience, sont comparés avec un témoin ou, lorsqu'une dilution en série est utilisée, pour déterminer la concentration entraînant une réduction de x % des juvéniles produits en comparaison avec le témoin (CE x , 28 jours). Une estimation de la concentration d'essai entraînant une mortalité de x % (CL x , 28 jours) est un critère d'effet facultatif. Si un test d'hypothèse à plusieurs concentrations est utilisé, l'efficacité de reproduction des acariens exposés aux mélanges d'essai est comparée à celle des témoins afin de déterminer la concentration sans effet sur la mortalité et la reproduction (CSEO).

Dans le cas où il n'y a aucune connaissance préalable de la dilution/concentration du sol soumis à essai ou de la substance d'essai susceptible d'avoir un effet, il est utile d'effectuer cet essai en deux étapes:

- un essai préliminaire est réalisé pour obtenir une indication de la dilution/concentration produisant un effet, et de la dilution/concentration ne provoquant pas de mortalité. Les dilutions/concentrations à utiliser au cours de l'essai définitif peuvent ensuite être choisies; et
- l'essai définitif pour déterminer les effets létaux et sublétaux de (dilutions de) sols contaminés ou de la concentration d'une substance qui, lorsqu'elle est uniformément répartie dans le sol standard: 1) provoque x % d'inhibition de la reproduction, CE x (par exemple, CE10, CE20 ou CE50), ou 2) n'a pas d'effet significatif sur le nombre de juvéniles éclos des œufs comparativement au témoin pour l'estimation de la CSEO et de la CME0.

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

5 Réactifs et matériel

5.1 Matériel biologique

Dans cet essai, des acariens adultes, *Oppia nitens* C.L. Koch 1836, âgés de 8 jours à 10 jours (c'est-à-dire, 8 jours à 10 jours après exuviation jusqu'au stade adulte), choisis parmi des adultes récemment apparus prélevés sur une période de 1 jour à 3 jours, sont requis pour commencer l'essai. Les acariens doivent être choisis à partir d'un élevage synchronisé. L'[Annexe A](#) fournit une méthode d'élevage d'*Oppia nitens* et d'obtention d'organismes d'essai synchronisés.

Les acariens adultes *Oppia nitens* sont obtenus à partir d'élevages de laboratoire maintenus dans des conditions de température, de photopériode et d'alimentation similaires à celles utilisées pendant l'essai. Il convient de faire confirmer l'identification de l'espèce par un personnel qualifié expérimenté dans le domaine de l'identification des acariens du sol à l'aide des caractéristiques taxonomiques distinctives, décrites dans les clés taxonomiques^[26], ou par l'identification taxonomique reposant sur l'analyse de l'ADN (c'est-à-dire, code-barres ADN) telle qu'indiquée dans l'ISO 21286^[4]. Tous les acariens utilisés dans un essai doivent provenir de la même population et avoir la même origine. Les animaux à utiliser pour établir les élevages peuvent provenir de laboratoires publics ou privés élevant *Oppia nitens* pour des essais de toxicité du sol, ou de fournisseurs biologiques du commerce^[24].

5.2 Mélange d'essai, comprenant le sol prélevé sur le terrain ou le sol témoin mélangé avec le sol d'essai ou dopé avec la substance d'essai.

5.2.1 Sol ou déchets prélevé(s) sur le terrain

L'échantillon ou les échantillons peuvent être un sol prélevé sur un site industriel, agricole ou sur un autre site d'intérêt, ou des déchets (par exemple, matériau de dragage, boue résiduaire des stations d'épuration des eaux usées, compost végétal ou fumier) envisagés pour un épandage éventuel.

Les sols prélevés sur le terrain et utilisés au cours de cet essai doivent être tamisés entre 4 mm et 10 mm (tamis à mailles carrées), pour éliminer les gros fragments, et être soigneusement mélangés. Si nécessaire, le sol peut être séché à l'air, sans chauffer, avant le tamisage. Il convient que la durée de conservation du sol d'essai soit la plus courte possible. Le sol doit être conservé conformément à l'ISO 18400-206 en utilisant des récipients qui limitent les pertes de contaminants du sol par volatilisation et sorption sur les parois des récipients. Si des sols ou des mélanges d'essai ont été conservés, il convient de les mélanger une nouvelle fois avant de les utiliser. Il convient de ne pas rectifier le pH du sol car il peut avoir une incidence sur la biodisponibilité des contaminants du sol.

NOTE Un tamis de 4 mm peut être utilisé pour tout sol minéral ayant une teneur relativement faible en matière organique (par exemple, sol agricole). Cependant, pour les sols forestiers ou les sols de zones humides ayant une teneur en matière organique élevée, des tamis plus larges (par exemple, de 6 mm à 8 mm pour les sols forestiers et de 8 mm à 10 mm pour les sols de zones humides) peuvent être requis.

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

- a) pH conformément à l'ISO 10390;
- b) texture (sable, loam, limon) conformément à l'ISO 11277;
- c) teneur en eau conformément à l'ISO 11465;
- d) capacité de rétention d'eau conformément à l'[Annexe B](#);
- e) capacité d'échange cationique conformément à l'ISO 11260;
- f) conductivité électrique conformément à l'ISO 11265;
- g) carbone organique conformément à l'ISO 10694;
- h) pourcentage de matériel retenu par le tamis.

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) un sol de référence (3.11) soit b) un sol standard (3.12) permettant la présence d'acariens oribates. Le sol témoin et le sol utilisé pour la dilution ne doivent pas différer l'un de l'autre au cours d'un essai [soit a) soit b)].

- a) 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 sols d'essai. S'il est impossible d'exclure une contamination toxique ou des propriétés inhabituelles du sol, il convient de privilégier les sols témoins standards.
- b) Pour évaluer les effets de substances mélangées au sol, des sols standards (par exemple, sol artificiel, sol standard LUFA) doivent être utilisés comme substrat d'essai. Les propriétés du sol standard prélevé sur le terrain doivent être consignées dans le rapport.

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

	Pourcentage exprimé en masse sèche
— Tourbe de sphaignes, finement moulue [une granulométrie de (2 ± 1) mm est acceptable], 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 d'une granulométrie de 0,05 mm à 0,2 mm)	70 %

NOTE Il a été démontré qu'*Oppia nitens* peut remplir les critères de validité (survie et reproduction) lorsqu'il est soumis à essai dans des sols ayant une plus faible teneur en carbone organique (par exemple 2,6 %)^[24] et l'expérience montre que les critères de validité peuvent être remplis dans un sol artificiel contenant 10 % 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 remplir les critères de validité, sauf si la teneur en tourbe est inférieure à la valeur spécifiée ci-dessus^[24].

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. L'Annexe C fournit des recommandations relatives à l'ajustement du pH du sol artificiel; la gamme de pH optimale pour l'essai sur *O. nitens* est de (7,0 ± 0,5) unités de pH^[24]. 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 trois 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 ou deux jours avant le début de l'essai en ajoutant de l'eau déionisée de manière à atteindre environ la moitié de la teneur finale en eau requise, comprise entre 50 % et 70 % de la capacité maximale de rétention d'eau.

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

5.3 Nourriture

Une source de nourriture appropriée est la levure du boulanger sèche granulée, disponible dans le commerce pour l'usage domestique, fournie en quantité suffisante, par exemple de 0,5 mg à 1 mg. Elle est ajoutée à chaque récipient au début de l'essai (Jour 0) et tous les 7 jours jusqu'au Jour 21 inclus.

5.4 Substance de référence

La CEx d'une substance de référence doit être déterminée pour s'assurer que les conditions d'essai en laboratoire sont adéquates et pour vérifier que la réponse des organismes d'essai n'a pas évolué dans le temps. La substance de référence peut être soumise à essai parallèlement à la détermination de la toxicité de chaque échantillon pour essai à une concentration qui doit être démontrée au préalable lors d'une étude dose-réponse comme produisant un effet d'environ 50 %. Dans ce cas, il convient que le nombre de réplicats soit identique à celui des témoins. En variante, la substance de référence est soumise à essai une à deux fois par an lors d'un essai dose-réponse. Selon le dispositif choisi, le nombre de concentrations et de réplicats ainsi que le facteur de séparation diffèrent (voir 7.1.3), mais il convient d'obtenir une réponse de 10 % à 90 % d'effet (facteur de séparation de 1,8). L'acide borique est une substance de référence appropriée ayant montré un effet sur la reproduction^{[14][15][19]}.

Il convient que la CE50 de l'acide borique basée sur le nombre de juvéniles se situe entre 290 mg/kg (masse sèche) de sol et 410 mg/kg (masse sèche) de sol dans le sol artificiel, et entre 80 mg/kg (masse sèche) de sol et 120 mg/kg (masse sèche) de sol dans le sol prélevé sur le terrain, notamment le sol standard LUFA 2.2^[15].

5.4.1 Acide borique (CAS 10043-35-3), H₃BO₃ (99 %).

AVERTISSEMENT — Lors de la manipulation de ces substances, il convient de prendre toutes les précautions nécessaires pour éviter toute ingestion ou tout contact avec la peau.

6 Appareillage

Utiliser du matériel de laboratoire et l'appareillage suivant.

6.1 Récipients d'essai, en verre (par exemple, flacons en verre) ou autre matériau chimiquement inerte, d'une capacité d'environ 30 ml (environ 2,6 cm de diamètre intérieur). Les récipients d'essai doivent être couverts pour empêcher les acariens de sortir mais doivent permettre les échanges gazeux et une pénétration de la lumière (par exemple, couvercle transparent perforé ou amovible permettant une aération hebdomadaire).

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 du mélange d'essai (5.2).

6.4 Balance de précision adaptée.

6.5 Appareillage permettant de mesurer la température, le pH et la teneur en eau du substrat d'essai.

6.6 Appareillage d'extraction à la chaleur des acariens, comme décrit à l'Annexe D.

6.7 Environnement d'essai

6.7.1 Enceinte, thermostatée à (20 ± 2) °C.

6.7.2 Source lumineuse, permettant de fournir aux récipients une intensité lumineuse de 400 lux à 800 lux à la surface du substrat, selon un cycle contrôlé lumière/obscurité compris entre 12 h:12 h et 16 h:8 h.