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

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

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 16387:2023

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/629b92c1-0041-4d29-b809-8f1950da7ec9/iso-16387-2023>



iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 16387:2023

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/629b92c1-0041-4d29-b809-8f1950da7ec9/iso-16387-2023>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2023

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
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	1
4 Principe	3
5 Réactifs et matériel	4
6 Appareillage	6
7 Environnement d'essai	7
8 Mode opératoire	7
8.1 Dispositif expérimental	7
8.1.1 Généralités	7
8.1.2 Essai préliminaire	7
8.1.3 Essai définitif	7
8.2 Préparation des mélanges d'essai	8
8.2.1 Essais sur sol contaminé	8
8.2.2 Essais sur substances ajoutées au substrat d'essai	9
8.2.3 Préparation du récipient témoin	9
8.3 Ajout de nourriture	10
8.4 Ajout du matériel biologique	10
8.5 Conditions d'essai et mesurages	10
8.6 Substance de référence	10
9 Calcul et expression des résultats	11
9.1 Calculs	11
9.2 Expression des résultats	11
10 Validité de l'essai	11
11 Analyse statistique	11
11.1 Généralités	11
11.2 Essai préliminaire	11
11.3 Essai définitif	12
12 Rapport d'essai	12
Annexe A (informative) Conditions de culture d'<i>Enchytraeus</i> sp.	14
Annexe B (informative) Mode opératoire d'essais menés avec d'autres espèces du genre <i>Enchytraeus</i>	16
Annexe C (normative) Détermination de la capacité totale de rétention d'eau	18
Annexe D (informative) Description détaillée des techniques d'extraction	20
Annexe E (informative) Présentation de l'évaluation statistique des données (détermination de la CSEO)	22
Bibliographie	23

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 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*, en collaboration avec le comité technique CEN/TC 444, *Méthodes d'essai pour la caractérisation environnementale des matrices solides*, du Comité européen de normalisation (CEN), conformément à l'Accord de coopération technique entre l'ISO et le CEN (Accord de Vienne).

Cette troisième édition annule et remplace la deuxième édition (ISO 16387:2014), qui a fait l'objet d'une révision technique.

Les principales modifications sont les suivantes:

- correction des valeurs de pression de vapeur aux fins de mise à jour de [l'Article 1](#), conformément aux recommandations de l'Agence européenne des produits chimiques (ECHA)/de l'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE);
- ajout (à [l'Annexe D](#)) d'une méthode d'extraction des enchytréides, appropriée à l'extraction d'*Enchytraeus crypticus*, et utilisant la silice colloïdale.

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 du sol et sont proposés en complément des analyses chimiques conventionnelles. L'ISO 15799^[38] comporte une liste ainsi qu'une brève caractérisation des systèmes d'essais recommandés et normalisés. Les systèmes d'essais aquatiques mis en œuvre sur éluat de sol sont utilisés pour obtenir des informations sur la fraction de contaminants susceptible d'atteindre les eaux souterraines du fait de la circulation de l'eau (fonction de rétention des sols), tandis que les systèmes d'essais terrestres servent à évaluer la fonction d'habitat des sols. Concernant les seconds, un système d'essai normalisé utilisant des *Enchytraeidae* (un essai chronique prenant la reproduction comme critère d'effet) est proposé.

Le présent document décrit une méthode basée sur la détermination des effets aigus et sublétaux des sols contaminés sur les *Enchytraeidae* adultes du genre *Enchytraeus*. La méthode peut éventuellement être utilisée pour évaluer le potentiel toxique subléthal sur les *Enchytraeidae* de substances ajoutées à un sol standard (par exemple, un sol artificiel).

Les annélides endogés du genre *Enchytraeus* sont pertinents sur le plan écologique, car ils abondent dans un grand nombre de sols dans lesquels les vers de terre sont rares; cependant, ils peuvent également atteindre de fortes densités de population dans des sols largement peuplés de vers de terre. Les *Enchytraeidae* peuvent être soumis à des essais en laboratoire ainsi qu'à des études en conditions semi-naturelles et à des études in situ. D'un point de vue pratique, de nombreuses espèces d'*Enchytraeus* sont faciles à manipuler et à élever et leur temps de génération est nettement plus court que celui des vers de terre [la durée des essais de reproduction des *Enchytraeidae* est de quatre à six semaines, contre huit semaines (12 semaines en incluant la synchronisation) pour les vers de terre]. De plus, le volume de sol nécessaire pour les essais menés sur les enchytréides est nettement inférieur au volume nécessaire pour les essais sur les vers de terre.

Le présent document a été rédigé en tenant compte des protocoles d'essai recommandés par l'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE^[24],^[25]).

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/629b92c1-0041-4d29-b809-8f1950da7ec9/iso-16387-2023>

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

1 Domaine d'application

Le présent document spécifie l'une des méthodes permettant d'évaluer la fonction d'habitat des sols et de déterminer les effets des contaminants du sol et des substances sur la reproduction d'*Enchytraeus* sp. par absorption cutanée et ingestion au cours d'un essai chronique. Il est applicable 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 d'autres sites d'intérêt, et de déchets.

Le présent document fournit des informations sur la manière d'utiliser cette méthode pour évaluer des substances en conditions tempérées.

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

NOTE La méthode d'essai ne contient aucune disposition permettant de surveiller la persistance de la substance soumise à essai.

2 Références normatives

Les documents suivants sont cités dans le texte de sorte qu'ils 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, *Sols, biodéchets traités et boues — 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 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 structurels 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 <https://www.electropedia.org/>

3.1 reproduction

nombre moyen de jeunes produits par récipient d'essai après incubation dans les conditions d'essai spécifiées

Note 1 à l'article: La période d'essai d'évaluation de la reproduction (essai définitif) est de six semaines.

Note 2 à l'article: Les «jeunes produits» désignent les jeunes enchytréides ayant éclos.

3.2 CE_x

concentration efficace à x %

concentration (fraction massique) d'une substance soumise à essai qui, par rapport à un témoin, engendre x % d'un effet sur un critère d'effet donné pendant une période d'exposition définie

EXEMPLE Une CE₅₀ est une concentration estimée produire un effet, pour le critère d'effet de l'essai, chez 50 % d'une population exposée sur une période d'exposition définie.

Note 1 à l'article: La CE_x est exprimée en pourcentage du 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 la substance soumise à essai par masse sèche de sol, en milligrammes par kilogramme.

3.3 CMEO

concentration minimale avec effet observé

plus faible concentration de substance soumise à essai ayant un effet statistiquement significatif (probabilité $p < 0,05$)

Note 1 à l'article: Dans le présent essai, la CMEO est exprimée en masse de substance soumise à essai par masse sèche du sol soumis à essai. Il convient généralement que toutes les concentrations d'essai supérieures à la CMEO aient un effet statistiquement différent du témoin.

3.4 CSEO

concentration sans effet observé

plus haute concentration de substance soumise à essai immédiatement inférieure à la CMEO (3.3), pour laquelle aucun effet n'est observé

Note 1 à l'article: Dans le présent essai, la concentration correspondant à la CSEO n'a aucun effet statistiquement significatif ($p < 0,05$) par rapport au témoin au cours d'une période d'exposition définie.

3.5 mélange d'essai

mélange de sol contaminé ou de substance soumise à essai (par exemple, substance chimique, biosolide, déchet) et de *sol témoin* (3.10)

3.6 ratio de mélange d'essai

ratio entre le sol soumis à essai et le *sol témoin* (3.10) dans un *mélange d'essai* (3.5)

3.7 contaminant

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

3.8 sol de référence

sol non contaminé dont les propriétés pédologiques (concentrations en éléments nutritifs, pH, teneur en carbone organique et texture) sont similaires à celles du sol analysé

3.9

sol standard

sol prélevé sur le terrain ou sol artificiel dont les propriétés principales (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 standard peuvent être différentes de celles du sol soumis à essai.

3.10

sol témoin

sol de référence (3.8) ou *sol standard* (3.9) satisfaisant aux critères de validité, et utilisé comme témoin et comme milieu pour la préparation des gammes de dilutions avec les sols soumis à essai ou avec une substance de référence

Note 1 à l'article: Dans le cas d'un sol naturel, il est recommandé de démontrer son aptitude aux essais et sa capacité à satisfaire aux critères de validité de l'essai avant de l'utiliser dans un essai définitif.

4 Principe

Les effets sur la survie et la reproduction d'*Enchytraeidae* (*Enchytraeus* sp.) adultes exposés à une série de dilutions d'un sol contaminé ou à une gamme de concentrations d'une substance soumise à essai sont déterminés. 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 peut être scindé en deux étapes distinctes: un essai de courte durée (deux semaines), au cours duquel la gamme de concentrations entraînant des effets toxiques (principalement la mortalité) est déterminée, et un essai définitif à long terme (six semaines), au cours duquel la survie des vers adultes et la fécondité (nombre de jeunes) sont mesurées. Les résultats obtenus lors des essais sont comparés à ceux obtenus avec un témoin et utilisés pour déterminer les dilutions ou les concentrations qui ne provoquent pas d'effet sur la survie et la reproduction (CSEO) ainsi que la concentration (dilution) qui entraîne une réduction de x % du nombre de jeunes éclos des cocons par rapport au témoin (CE_x, 42 j).

Toutes les dilutions/concentrations d'essai supérieures à la CME0 ont un effet nocif égal ou supérieur à celui observé à la CME0. Lorsque la dilution/concentration à laquelle la substance soumise à essai est susceptible de produire un effet n'est pas connue au préalable, il est utile de réaliser l'essai en deux étapes:

- un essai de toxicité aiguë (essai préliminaire), pour obtenir une indication de la dilution/concentration produisant un effet et de la dilution/concentration n'entraînant pas de mortalité (CSEO). Les dilutions/concentrations à utiliser pour l'essai définitif peuvent ensuite être choisies;
- un essai définitif sur la reproduction, pour déterminer les effets sublétaux (des dilutions) du sol contaminé ou de la concentration d'une substance qui, mélangé(e) de façon homogène dans le sol standard, n'a pas d'effet significatif sur le nombre de jeunes produits éclos des cocons comparé au témoin (CSEO), ainsi que la plus faible concentration produisant un effet (CME0).

NOTE Un sol de référence approprié est utilisé pour démontrer le bon état de la population soumise à essai et pour éviter toute erreur d'interprétation des résultats.

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 sont déterminés dans le sol soumis à essai et dans un sol témoin. Selon l'objectif de l'étude, les substrats témoin et de dilution (série de dilutions d'un sol contaminé) correspondent à un sol non contaminé comparable au sol soumis à essai (sol de référence) ou à un sol standard (par exemple, sol artificiel).

5 Réactifs et matériel

5.1 Matériel biologique, l'espèce recommandée pour l'essai est *Enchytraeus albidus* Henle 1837 (enchytréide; *Enchytraeidae*, sous-classe: *Oligochaeta*, embranchement: *Annelida*). *E. albidus*, l'une des plus grandes espèces d'enchytréides, se caractérise par une taille de 15 mm à 40 mm et une répartition géographique mondiale (voir, par exemple, les Références [22] et [32]). Cette espèce est facilement reconnaissable grâce à deux caractéristiques: quatre soies par faisceau sur la face ventrale et un très long canal séminal dans la région du clitellum et de quelques segments postérieurs. Cette espèce peut être présente en habitat marin, limnique et terrestre, principalement dans les matières organiques en décomposition (varech, compost) et seulement rarement dans les prairies. Cette tolérance écologique très étendue, ainsi que certaines variations morphologiques, indiquent que cette espèce englobe probablement plusieurs races (ou écotypes). *E. albidus* peut être obtenue dans le commerce, puisqu'elle est vendue comme nourriture pour poissons. Il convient de vérifier si ce type de culture n'est pas contaminé par d'autres espèces de taille généralement inférieure (voir, par exemple, les Références [7], [10] et [33]). En cas de contamination de la culture, tous les vers sont lavés à l'eau dans une boîte de Petri. Les spécimens adultes d'*E. albidus* de grande taille sont sélectionnés à l'aide d'un stéréomicroscope pour démarrer une nouvelle culture. Tous les autres vers issus de la culture initiale sont éliminés. *E. albidus* peut être facilement élevée dans un grand nombre de matériaux organiques (voir l'Annexe A); cette espèce présente un cycle de vie court, la maturité étant atteinte entre 33 j (à 18 °C) et 74 j (à 12 °C). Seules les cultures ayant été conservées au laboratoire pendant au moins cinq semaines (soit un cycle de génération) sans problème doivent être utilisées pour les essais.

D'autres espèces du genre *Enchytraeus*, telles que *E. crypticus* Westheide et Graefe 1992 ou *E. buchholzi* Vejdovsky 1879, espèces vivant spécifiquement dans le sol, mais plus petites, sont également admises en tant qu'organismes soumis à essai (voir l'Annexe B). Si d'autres espèces du genre *Enchytraeus* sont utilisées, elles doivent être clairement identifiées et il convient de mentionner les raisons pour lesquelles ces espèces ont été choisies, ainsi que les écarts par rapport à la méthode d'essai.

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

Pour un essai, il convient de prélever dans la boîte d'élevage un échantillon surnuméraire de vers adultes possédant un clitellum, sans les observer en détail, afin de disposer d'une population de vers appropriée suffisante. Au terme de la période d'acclimatation, seuls les vers porteurs d'œufs et présentant un comportement habituel (par exemple, n'essayant pas de s'échapper du sol artificiel) sont sélectionnés pour l'essai. La sélection est effectuée en observant au stéréomicroscope les vers placés dans une boîte de Petri contenant une faible quantité d'eau et en éliminant les animaux dépourvus d'œufs. Il convient d'utiliser, de préférence, un milieu d'eau douce (par exemple, de l'eau reconstituée selon la méthode décrite dans la Référence [23]), car l'eau déminéralisée ou l'eau du robinet (risque de contamination au cuivre) peut s'avérer nocive pour les *Enchytraeidae*. Au cours de ce processus, les autres organismes vivant dans les cultures, tels que les acariens, sont également séparés des vers.

NOTE Un exemple d'élevage d'*Enchytraeus* sp. figure à l'Annexe A.

5.2 Mélange d'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 Sol prélevé sur le terrain ou déchets

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

Les sols prélevés sur le terrain et utilisés pour l'essai doivent être tamisés au moyen d'un tamis à mailles carrées de 4 mm pour éliminer les fragments grossiers; ils doivent être ensuite soigneusement mélangés. Si nécessaire, le sol peut être séché à l'air, sans chauffage, avant d'être tamisé. Il convient que la durée de conservation des sols soumis à essai soit la plus courte possible. Le sol doit être conservé conformément à l'ISO 18400-206, en utilisant des récipients qui réduisent au minimum les pertes de contaminants du sol par volatilisation et par sorption sur les parois du récipient. Il convient de ne pas corriger le pH du sol car il peut influencer 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 site:

- a) le pH conformément à l'ISO 10390;
- b) la texture (sable, limon, vase) conformément à l'ISO 11277;
- c) la teneur en eau conformément à l'ISO 11465;
- d) la capacité de rétention d'eau selon l'[Annexe C](#);
- e) la capacité d'échange cationique conformément à l'ISO 11260;
- f) la teneur en carbone organique conformément à l'ISO 10694.

Il convient également 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 ([3.8](#)), soit b) un sol standard ([3.9](#)) qui permet la présence des *Enchytraeidae* (les critères de validité doivent être satisfaits, au minimum). Le sol témoin et le sol utilisé pour les dilutions doivent être les mêmes dans tous les essais [soit a), soit b)].

- a) Si des sols de référence provenant de zones non contaminées proches d'un site contaminé sont disponibles, il convient de les traiter et de les caractériser de la même manière que les sols soumis à essai. Si une contamination toxique ou des propriétés pédologiques inhabituelles ne peuvent être exclues, il convient de privilégier des sols témoins standard.
- b) Pour évaluer les effets des substances mélangées au sol, des sols standard (par exemple, sol artificiel, sol LUFA) doivent être utilisés comme substrat d'essai. Les propriétés des sols standard prélevés sur le terrain doivent être consignées dans le rapport.

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

	Pourcentage exprimé sur la base de la masse sèche
— Tourbe de sphaignes finement broyée et exempte de tout résidu végétal visible	10 %
— Argile kaolinite contenant au minimum 30 % de kaolinite	20 %
— Sable de quartz industriel (sable fin dominant, avec plus de 50 % des grains présentant une granulométrie de 0,05 mm à 0,2 mm)	69 %

Une quantité de 0,3 % à 1,0 % environ de carbonate de calcium (CaCO_3 , pulvérisé, de qualité analytique) est nécessaire pour obtenir un pH de $6,0 \pm 0,5$.

NOTE Afin de prendre en compte les propriétés des substances fortement apolaires ($\log K_{ow} > 2$, K_{ow} étant le coefficient octanol-eau) ou des substances ionisantes, il a été démontré qu'un pourcentage de 5 % de tourbe était suffisant pour maintenir la structure souhaitée du sol artificiel^[25].

Préparer le sol artificiel au moins trois jours avant le début de l'essai, en mélangeant soigneusement les constituants secs énumérés ci-dessus dans un mélangeur de laboratoire de grande capacité. Une partie de l'eau déionisée nécessaire est ajoutée au cours du mélange. La quantité de carbonate de calcium

requis peut varier en fonction des propriétés du lot de tourbe de sphaignes concerné; il convient par conséquent de la déterminer en mesurant des sous-échantillons juste 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 totale 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 la moitié de la teneur en eau finale requise, correspondant à 40 % à 60 % de la capacité totale 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.

5.3 Alimentation

Les flocons d'avoine, de préférence autoclavés (ou éventuellement chauffés) avant usage afin d'éviter l'infection par d'autres organismes, se sont révélés adaptés^[32]. La première distribution de nourriture est effectuée en mélangeant au sol 50 mg de flocons d'avoine broyés par récipient d'essai (après application de la substance soumise à essai, mais avant d'ajouter les vers); les distributions ultérieures (25 mg par récipient et par semaine, sauf au-delà de 28 j) sont effectuées uniquement en surface, afin d'éviter de blesser les vers. Les besoins en nourriture pouvant varier d'un récipient à l'autre, il convient d'ajuster la distribution à la demande (en d'autres termes, toute suralimentation doit être évitée). Il convient de recouvrir les flocons de quelques particules de sol afin de réduire le développement de champignons.

5.4 Réactifs

5.4.1 Rose Bengale.

5.4.2 Éthanol.

5.4.3 Acide borique, adapté pour servir de substance de référence.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/629b92c1-0041-4d29-b809-8f1950da7ec9/iso-16387-2023>

6 Appareillage

Le matériel courant de laboratoire, ainsi que les éléments suivants, doivent être utilisés.

6.1 Récipients d'essai, de 0,20 l à 0,25 l de contenance et d'un diamètre permettant de recevoir une épaisseur de sol de 1,5 cm à 2 cm (par exemple, 5 cm), munis de couvercles (par exemple, verre ou film plastique perforé). Les béciers doivent être appropriés à une utilisation comme récipients d'essai, et contiennent une quantité de sol artificiel équivalant à 20 g de masse sèche. Les couvercles doivent permettre les échanges gazeux entre le substrat du sol et l'atmosphère.

6.2 Armoire de séchage.

6.3 Stéréomicroscope.

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

6.5 Balance d'analyse permettant des pesées de 10 mg à 200 g et d'une précision d'au moins 1 mg.

6.6 pH-mètre.

6.7 Dispositif d'enregistrement de la température (par exemple, thermomètre/hygromètre).

6.8 Luxmètre.