
**Qualité du sol — Inhibition de la
reproduction de Collembola (*Folsomia
candida*) par des contaminants du sol**

*Soil quality — Inhibition of reproduction of Collembola (*Folsomia
candida*) by soil contaminants*

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 11267:2023

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/3f1217aa-091a-4278-839f-2356b2ad0edf/iso-11267-2023>



iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 11267:2023

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/3f1217aa-091a-4278-839f-2356b2ad0edf/iso-11267-2023>



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 Mode opératoire	7
7.1 Plan d'expérience	7
7.1.1 Généralités	7
7.1.2 Essai préliminaire	7
7.1.3 Essai définitif	7
7.2 Préparation du mélange d'essai	8
7.2.1 Essai sur un sol pollué	8
7.2.2 Essai de substances ajoutées au substrat d'essai	8
7.2.3 Préparation du récipient témoin	9
7.3 Ajout du matériel biologique	10
7.4 Conditions d'essai et mesurages	10
7.5 Détermination du nombre de collemboles survivants	10
8 Calcul et expression des résultats	10
8.1 Calcul	10
8.2 Expression des résultats	10
9 Validité de l'essai	11
10 Analyse statistique	11
10.1 Généralités	11
10.2 Essais à une seule concentration	11
10.3 Essais à plusieurs concentrations	12
10.3.1 Essai préliminaire	12
10.3.2 Essai définitif	12
11 Rapport d'essai	13
Annexe A (informative) Techniques d'élevage de <i>Folsomia candida</i>	14
Annexe B (normative) Détermination de la capacité de rétention d'eau	17
Annexe C (informative) Recommandations relatives à l'ajustement du pH d'un sol artificiel	19
Annexe D (informative) Extraction et comptage des collemboles	20
Annexe E (informative) Informations spécifiques relatives aux espèces alternatives de collemboles autres que <i>Folsomia candida</i>	21
Bibliographie	37

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'ISO attire l'attention sur le fait que la mise en application du présent document peut entraîner l'utilisation d'un ou de plusieurs brevets. L'ISO ne prend pas position quant à la preuve, à la validité et à l'applicabilité de tout droit de propriété revendiqué à cet égard. À la date de publication du présent document, l'ISO n'avait pas reçu notification qu'un ou plusieurs brevets pouvaient être nécessaires à sa mise en application. Toutefois, il y a lieu d'avertir les responsables de la mise en application du présent document que des informations plus récentes sont susceptibles de figurer dans la base de données de brevets, disponible à l'adresse www.iso.org/brevets. L'ISO ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié de tels droits de propriété et averti de leur existence.

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 11267:2014), qui a fait l'objet d'une révision technique.

La principale modification est la suivante:

- ajout d'une annexe afin de fournir des informations spécifiques relatives à l'utilisation d'espèces alternatives de collemboles pour l'essai de reproduction.

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

Des systèmes d'essais d'écotoxicité sont mis en œuvre pour obtenir des informations sur les effets des contaminants présents dans le sol et sont proposés en complément d'une analyse chimique conventionnelle (voir les Références [2] et [4]). La Référence [2] contient une liste et une brève caractérisation des systèmes d'essai recommandés et normalisés, et la Référence [4] donne des recommandations pour le choix et l'évaluation des bioessais. Les systèmes d'essais aquatiques avec un éluat de sol sont mis en œuvre pour obtenir des informations sur la fraction des contaminants susceptibles d'être entraînés jusqu'aux eaux souterraines par la circulation de l'eau (fonction de rétention des sols), alors que les systèmes d'essais terrestres sont utilisés pour évaluer la fonction d'habitat des sols.

Les collemboles, qui peuplent les sols, présentent une pertinence écologique pour les essais d'écotoxicité. Les collemboles sont des prédateurs d'un vaste éventail d'invertébrés endogés et épigés, et contribuent aux processus de décomposition dans les sols. Dans les sols acides, ils sont probablement, avec les enchytréides, les invertébrés les plus importants eu égard à cette fonction, puisque les vers de terre en sont généralement absents^[19]. En outre, les collemboles constituent une espèce d'arthropodes présentant une autre voie et un autre taux d'exposition que ceux des vers de terre^[1] et des enchytréides^[3]. Les bioessais ont impliqué diverses espèces, parmi lesquelles quatre espèces ont été les plus couramment utilisées, à savoir *Folsomia candida* Willem, *Folsomia fimetaria* L., *Onychiurus armatus* et *Orchesella cincta*^[20]. De nombreux essais de toxicité des sols, réalisés avec le soutien d'Environnement Canada (EC), ont abouti au développement et à la normalisation d'une méthode d'essai biologique pour déterminer la toxicité létale et sublétales d'échantillons d'un sol pollué pour les collemboles^[10]. La méthode élaborée par Environnement Canada (EC) concerne quatre espèces, à savoir *Orthonychiurus folsomi*, *Proisotoma minuta*, *F. candida* et *F. fimetaria*. Il existe deux autres méthodes faisant lieu de systèmes d'essais normalisés utilisant des collemboles comme organismes indicateurs pour la fonction d'habitat du sol. La première vise à évaluer les effets de substances sur la reproduction des collemboles *F. fimetaria* et *F. candida* dans le sol^{[19],[21]}, tandis que la seconde, décrite dans le présent document, s'intéresse particulièrement à l'essai d'un sol pollué. La méthode peut éventuellement être utilisée pour évaluer le pouvoir toxique aigu sur les collemboles de substances ajoutées à un sol standard (un sol artificiel, par exemple).

Le présent document décrit une méthode fondée sur la détermination des effets sublétaux des sols pollués sur les collemboles adultes de l'espèce *Folsomia candida* Willem. L'espèce est présente dans le monde entier. Elle joue un rôle écologique semblable à celui de *F. fimetaria*^{[10],[19]}. *F. candida* se reproduit par parthénogenèse et constitue une espèce facilement accessible, car elle est disponible dans le commerce et facile à élever. *F. candida* est considérée comme étant représentative des arthropodes du sol en général et des collemboles en particulier. Des informations contextuelles sur l'écologie des collemboles et sur leur utilisation dans les essais d'écotoxicité sont disponibles à la Référence [22].

Des espèces distinctes de collemboles habitent dans différentes niches écologiques, dans différents types de sols et à différentes profondeurs à travers le monde. Bien qu'elle soit considérée comme une espèce de substitution et qu'elle soit, de ce fait, fréquemment utilisée lors d'essais d'écotoxicité sur la reproduction, *F. candida* n'est pas courante dans la plupart des sols naturels^[28]. De plus, des adaptations morphologiques propres à l'espèce peuvent influencer l'exposition et les effets toxiques des produits chimiques sur les organismes^[102]. Par conséquent, le recours à plusieurs espèces de collemboles représentant différentes adaptations morphologiques peut se révéler utile afin d'obtenir un large spectre de sensibilités pour ce groupe. D'autres espèces, telles que *F. fimetaria* (espèce euédaphique, présente dans le monde entier, qui habite dans des sols agricoles^[28]), *Onychiurus yodai* (une espèce asiatique euédaphique^[31]), *Proisotoma minuta* (espèce hémiedaphique, présente dans le monde entier, qui habite dans les sols agricoles^{[31],[36]}), *Protaphorura fimata* (espèce euédaphique, présente dans les zones tempérées à froides^{[31],[37]}), et *Sinella curviseta* (espèce épédaphique, présente de l'Amérique du Nord à l'Europe, en Asie du Sud-Est et au Japon^[42]) ont été ajoutées comme espèces d'essai alternatives potentielles (Annexe E). Bien que ces espèces aient déjà servi d'espèces d'essai d'écotoxicité, les informations d'essai disponibles à leur sujet sont limitées.

Les effets des substances sont évalués à l'aide d'un sol standard, de préférence un substrat de sol artificiel défini. Pour les sols pollués, les effets sont déterminés dans le sol soumis à essai et dans un sol

témoin. Selon l'objectif de l'étude, le substrat pour le témoin et les dilutions (série de dilutions d'un sol pollué) est soit un sol non pollué comparable au sol à évaluer (sol de référence) soit un sol standard (par exemple un sol artificiel).

NOTE La stabilité de la substance d'essai ne peut pas être garantie pendant toute la durée de l'essai. La méthode d'essai ne prévoit aucune disposition permettant de surveiller la rémanence de la substance soumise à essai.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 11267:2023](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/3f1217aa-091a-4278-839f-2356b2ad0edf/iso-11267-2023)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/3f1217aa-091a-4278-839f-2356b2ad0edf/iso-11267-2023>

Qualité du sol — Inhibition de la reproduction de *Collembola (Folsomia candida)* par des contaminants du sol

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 de contaminants du sol et de substances sur la reproduction de *Folsomia candida* Willem par absorption cutanée et ingestion. Le présent document fournit des informations sur la manière d'utiliser cette méthode pour évaluer des substances dans des conditions tempérées.

L'essai chronique décrit s'applique aux sols et matériaux du sol de qualité inconnue, par exemple provenant de sites pollués, de sols amendés, de sols après remédiation, de sites industriels, agricoles ou d'autres sites d'intérêt et de déchets.

La méthode ne s'applique pas aux substances volatiles, c'est-à-dire aux substances pour lesquelles H (constante de Henry) ou le coefficient de partage air/eau est supérieur à 1, ou pour lesquelles la pression de vapeur excède 300 Pa à 25 °C.

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).

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/3f1217aa-091a-4278-839f-2356b2ad0edf/iso-11267:2023>
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
contaminant

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

3.2
CEx

concentration efficace à x %

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

EXEMPLE Une CE50 est une concentration estimée produire un effet sur un résultat final de l'essai dans 50 % d'une population exposée durant une période d'exposition déterminée.

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

3.3
TE_x

taux efficace à x %

taux d'un sol pollué qui engendre un effet de x % sur un résultat final donné durant une période d'exposition déterminée, par rapport au témoin

3.4
essai limite

essai à une seule concentration comprenant au moins quatre réplicats pour chaque concentration, le sol soumis à essai sans dilution ou la concentration la plus élevée de substance soumise à essai mélangée dans le *sol témoin* (3.11) et le témoin

3.5
CMEO

concentration minimale avec effet observé

concentration la plus faible d'une substance soumise à essai ayant un effet statistiquement significatif ($p < 0,05$) en comparaison avec le témoin

Note 1 à l'article: Dans cette méthode d'essai, la CMEO est exprimée en masse de substance soumise à essai par poids sec du sol soumis à essai. Il convient que toutes les concentrations d'essai supérieures à la CMEO présentent un effet statistiquement différent du témoin.

3.6
TMEO

taux minimal avec effet observé

taux le plus faible d'un sol pollué soumis à essai dans un *sol témoin* (3.11) ayant un effet statistiquement significatif ($p < 0,05$) en comparaison avec le témoin

3.7
CSEO

concentration maximale sans effet observé

concentration la plus élevée d'une substance soumise à essai, immédiatement inférieure à la CMEO (3.5), à laquelle aucun effet statistiquement significatif n'est observé en comparaison avec le témoin

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

3.8
TSEO

taux maximal sans effet observé

taux le plus élevé d'un sol pollué soumis à essai, immédiatement inférieur au TMEO (3.6), auquel aucun effet statistiquement significatif n'est observé en comparaison avec le témoin

3.9**sol de référence**

sol non pollué présentant des propriétés pédologiques comparables (concentrations d'éléments nutritifs, pH, teneur en carbone organique et texture) à celles du sol étudié

3.10**sol standard**

sol prélevé sur le terrain ou sol artificiel dont les propriétés principales (pH, texture, teneur en matières organiques) se situent dans une plage 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 soumis à essai.

3.11**sol témoin**

sol de référence (3.9) ou *sol standard* (3.10) utilisé comme témoin et comme milieu pour préparer une série de dilutions avec les sols soumis à 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 atteindre les critères de validité de l'essai avant d'utiliser un essai définitif.

3.12**mélange d'essai**

mélange d'un sol pollué ou de la substance soumise à essai (par exemple, substance chimique, matière biosolide, déchets) avec un *sol témoin* (3.11)

3.13**rapport de mélange d'essai**

rapport entre le sol soumis à essai et le *sol témoin* (3.11) dans un *mélange d'essai* (3.12)

4 Principe

Les effets sur la reproduction de collemboles (*F. candida*) âgés de 10 à 12 jours et exposés au sol soumis à essai sont comparés à ceux observés chez des collemboles dans un sol témoin. Si cela est approprié, les effets observés sont déterminés sur la base de l'exposition à un mélange d'essai de sol pollué et de sol témoin ou à une gamme de concentrations d'une substance soumise à 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.

Les collemboles sont incubés jusqu'à ce que les descendants (F_1) sortent des œufs pondus par les adultes et le nombre de descendants est déterminé. L'éclosion des œufs intervient généralement dans un délai de 28 jours lors d'expérimentations témoins. Les résultats obtenus lors des essais sont comparés avec un témoin, ou, le cas échéant, sont utilisés pour déterminer respectivement les concentrations qui ne provoquent pas d'effets sur la mortalité et la reproduction (TSEO/CSEO) et la concentration entraînant une réduction de x % du nombre de juvéniles éclos des œufs par rapport au témoin (TE_x/CE_x, 28 j).

Lorsqu'une gamme de concentration est soumise à essai, toutes les dilutions/concentrations d'essai supérieures au TMEO/à la CMEO ont un effet nocif supérieur ou égal à celui observé au TMEO/à la CMEO. Lorsque l'on ne connaît pas la concentration à laquelle le sol ou la substance soumis à essai est susceptible de produire un effet, il est utile de conduire l'essai en deux étapes:

- un essai de toxicité aiguë (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 (TSEO/CSEO). Les dilutions/concentrations à utiliser au cours de l'essai définitif peuvent ensuite être choisies;
- un essai définitif concernant l'efficacité de la reproduction détermine les effets sublétaux du (des dilutions de) sol pollué ou de la concentration d'une substance qui, lorsqu'elle est uniformément

répartie dans le sol standard, n'a pas d'effet significatif sur le nombre de descendants éclos des œufs comparé au témoin (TSEO/CSEO), et la plus faible concentration produisant un effet (TMEO/CMEO).

Un sol de référence doit être utilisé pour démontrer l'état approprié de la population soumise à essai et éviter une mauvaise interprétation des résultats.

5 Réactifs et matériel

5.1 Matériel biologique: au cours de cet essai, des collemboles juvéniles âgés de 10 à 12 jours, de l'espèce *Folsomia candida* (Willem), sont utilisés (voir [A.1](#) pour les détails concernant la synchronisation de l'élevage).

5.2 Mélange d'essai, pouvant être constitué d'un sol prélevé sur le terrain, de déchets ou d'un sol témoin amendé par la substance soumise à essai.

5.2.1 Sol ou déchets prélevés sur le terrain

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

Les sols prélevés sur le terrain et utilisés au cours de l'essai doivent être passés dans un tamis à mailles carrées de 4 mm et être soigneusement mélangés. Si nécessaire, le sol peut être séché à l'air libre sans chauffage avant le tamisage. Il convient que les sols soumis à essai soient conservés le moins longtemps possible. Le sol doit être conservé conformément à l'ISO 18400-206 en utilisant des récipients qui réduisent le plus possible 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 corriger le pH du sol, car il peut avoir une incidence sur la biodisponibilité des contaminants du sol.

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

- a) pH conformément à l'ISO 10390;
- b) texture (sable, limon, vase) 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) carbone organique conformément à l'ISO 10694;
- g) pourcentage de matériel (minéral et organique) retenu par le tamis de 4 mm.

Il convient également de mesurer la capacité de rétention d'eau de tous les mélanges utilisés au cours de l'essai.

5.2.2 Sol témoin, soit un sol de référence soit un sol standard permettant la présence de collemboles. 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 un sol de référence soit un sol standard).

- a) Si des sols de référence provenant de zones non polluées voisines d'un site pollué sont disponibles, il convient de les traiter et de les caractériser de la même manière que les sols soumis à essai. S'il est impossible d'exclure une contamination toxique ou des propriétés inhabituelles, il convient de privilégier des sols témoins standards.

- b) Afin d'évaluer les effets de substances mélangées au sol, des sols standards (par exemple, sol artificiel, sol LUF_A) doivent être utilisés comme substrat d'essai. Les propriétés du sol standard prélevé sur le terrain doivent être consignées dans le rapport.

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

	Pourcentage exprimé en poids sec
— Tourbe de sphaignes, finement moulue [une classe granulométrique 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 dans la classe granulométrique de 0,05 mm à 0,2 mm)	69 %

Environ 0,3 % à 1,0 % de carbonate de calcium (CaCO_3 , pulvérisé, de qualité analytique) est nécessaire pour obtenir un pH de $6,0 \pm 0,5$. L'[Annexe C](#) fournit des recommandations supplémentaires relatives à la manière de procéder à l'ajustement du pH du sol artificiel.

NOTE 1 Compte tenu des propriétés des substances fortement non polaires ($\log K_{ow} > 2$) ou ionisantes, 5 % de tourbe se sont avérés suffisants pour maintenir la structure souhaitée du sol artificiel.

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

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 grande dimension. 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 soumise à essai dans le sol. La quantité de carbonate de calcium nécessaire peut varier selon les propriétés du lot particulier de tourbe de sphaignes, et il convient qu'elle soit déterminée par des mesurages effectués sur des sous-échantillons immédiatement avant l'essai. Conserver le sol artificiel mélangé à température ambiante pendant au moins deux jours pour équilibrer l'acidité. Afin de déterminer le pH et la capacité maximale de rétention d'eau, le sol artificiel sec est 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 finale en eau requise comprise entre 40 % et 60 % de la capacité maximale de rétention d'eau.

La capacité totale de rétention d'eau doit être déterminée conformément à l'[Annexe B](#), le pH doit être déterminé conformément à l'ISO 10390.

5.3 Alimentation

Une source de nourriture appropriée, constituée d'une quantité suffisante, de 2 mg à 10 mg par exemple, de levure de boulanger sèche en granulés, disponible dans le commerce pour un usage domestique, est ajoutée à chaque récipient au début de l'essai puis deux semaines environ après le début de l'essai.

5.4 Substance de référence

Afin de garantir la qualité du système d'essai, il convient d'effectuer des essais à intervalles réguliers (une ou deux fois par an) en utilisant une substance de référence.

De l'acide borique et le produit phytosanitaire Betosip¹⁾ (c'est-à-dire 157 g/l de phenmedipham) ont été soumis à essai lors d'un essai interlaboratoires, et leur utilisation en tant que substances de référence est recommandée.

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.

NOTE 1 Acide borique: Des effets sur la reproduction (c'est-à-dire la CE50) sont observés à des concentrations de 147 mg d'acide borique par kilogramme de sol artificiel (poids sec), 111 mg d'acide borique par kilogramme de sol artificiel avec 5 % de tourbe et 169 mg d'acide borique par kilogramme de sol de limon argileux pour *F. candida*^{[5],[24]}. En tenant compte de ces données et en raison de la variabilité de la sensibilité des organismes, une CE50 comprise entre 50 mg et 175 mg d'acide borique/kg de sol artificiel en poids sec constitue une valeur acceptable selon l'expérience actuelle du laboratoire et des études antérieures^{[103],[104]}.

NOTE 2 Betosip: Des effets sur la reproduction ($\alpha = 0,05$) sont observés à des concentrations comprises entre 100 mg et 200 mg du produit par kilogramme de substrat (poids sec).

6 Appareillage

Utiliser du matériel de laboratoire et l'appareillage suivant:

6.1 Récipients d'essai, en verre ou autre matériau chimiquement inerte, d'une capacité d'environ 100 ml et d'un diamètre d'environ 5 cm, munis de couvercles (par exemple, couvercle en plastique, disque en verre ou film plastique) pouvant être fermés hermétiquement.

6.2 Appareillage permettant de déterminer le poids sec du substrat conformément à l'ISO 11465.

6.3 Mélangeur de laboratoire de grande dimension pour la préparation du mélange d'essai (5.2).

6.4 Balances de précision adaptées. [ISO 11267:2023](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/3f1217aa-091a-4278-839f-2356b2ad0edf/iso-11267-2023)
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/3f1217aa-091a-4278-839f-2356b2ad0edf/iso-11267-2023>

6.5 Appareillage permettant de mesurer le pH.

6.6 Appareillage permettant de déterminer la capacité de rétention d'eau du substrat (voir B.2).

6.7 Appareil d'aspiration pour le transfert des collemboles (voir A.2).

6.8 Environnement d'essai.

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

6.8.2 Source lumineuse, permettant de soumettre les récipients à une intensité lumineuse constante de 400 lx à 800 lx à la surface du substrat, selon un cycle contrôlé lumière/obscurité compris entre 12 h:12 h et 16 h:8 h.

1) Betosip est un exemple de produit approprié disponible sur le marché. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs du présent document et ne signifie nullement que l'ISO approuve ou recommande l'emploi exclusif du produit ainsi désigné. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

7 Mode opératoire

7.1 Plan d'expérience

7.1.1 Généralités

Un échantillon de sol prélevé sur le terrain peut être soumis à essai à une seule concentration (généralement 100 %) ou être évalué afin de déterminer sa toxicité au moyen d'un essai à plusieurs concentrations pour lequel une gamme de concentrations (dilutions) est préparée en mélangeant des quantités mesurées avec un sol témoin (5.2.2). Lorsque des substances sont soumises à essai, une gamme de concentrations est préparée en mélangeant différentes quantités de la substance soumise à essai avec un sol standard (par exemple un sol artificiel). Les concentrations étant exprimées en milligrammes de substance soumise à essai par kilogramme de sol témoin équivalent sec (5.2.2). Selon que les niveaux de réponse pertinents sont connus ou non, un essai préliminaire peut précéder l'essai définitif. Chaque essai définitif comprend une série de mélanges de sols (traitements).

7.1.2 Essai préliminaire

L'essai permettant de déterminer la gamme de rapports de mélange de sols pollués (par exemple, 0 %, 1 %, 5 %, 25 %, 50 %, 75 %, 100 %) ou concentrations de substances (par exemple, 0 mg/kg, 1 mg/kg, 10 mg/kg, 100 mg/kg, 1 000 mg/kg) affectant les collemboles est facultatif. L'essai préliminaire est effectué sans répétition.

Lorsqu'aucun effet n'est observé, même avec un sol pollué à 100 % ou à une concentration de substance soumise à essai de 1 000 mg par kilogramme de sol standard (poids sec), l'essai définitif peut être conçu comme un essai limite.

Chaque récipient d'essai (réplicat) est rempli de 30 g d'échantillon d'essai en poids humide. Pour faciliter la migration des collemboles, il convient de ne pas tasser le substrat dans le récipient d'essai.

Utiliser 10 spécimens de collemboles âgés de 10 à 12 jours par récipient. Préparer les récipients d'essai en procédant comme indiqué en 7.2.1. Placer les récipients d'essai dans l'enceinte d'essai (6.8.1) avec la source lumineuse (6.8.2).

Au début de l'essai, ajouter environ 2 mg de levure sèche en granulés (5.3) dans chaque récipient d'essai et fermer hermétiquement les récipients (par exemple, à l'aide d'un couvercle en plastique, d'un disque en verre ou d'un film plastique). Ouvrir les récipients d'essai brièvement deux fois par semaine pour les aérer.

Au bout de 14 jours, compter le nombre de collemboles vivants dans chaque récipient et déterminer le pourcentage de mortalité pour chaque concentration de substance soumise à essai. Observer également les collemboles survivants et noter tout symptôme. En raison de la dégradation rapide des collemboles morts, on présume que les collemboles manquants sont morts durant la période d'essai.

NOTE Afin d'obtenir des informations supplémentaires relatives à la détermination de la gamme de concentrations pour l'essai final, la période d'essai peut être étendue à quatre semaines afin de permettre une détermination qualitative des effets à des concentrations auxquelles des effets sur la reproduction peuvent être attendus.

7.1.3 Essai définitif

Le plan de l'essai définitif dépend des objectifs de l'essai. Les propriétés d'habitat des échantillons de sol prélevé sur le terrain sont généralement caractérisées en comparant les effets biologiques observés dans le ou les sols soumis à essai avec ceux observés dans un sol de référence, ou si celui-ci n'est pas disponible ou n'est pas approprié en raison de sa toxicité ou de caractéristiques physico-chimiques atypiques, dans un sol standard. Les résultats pour le sol standard contribuent à distinguer les effets liés aux contaminants et les effets non liés aux contaminants provoqués par des propriétés physico-chimiques. Indépendamment du fait qu'un sol de référence ou un sol standard soit utilisé pour les

comparaisons statistiques, les résultats obtenus à partir du sol standard doivent être utilisés pour évaluer la validité et l'acceptabilité de l'essai^[20].

Si, à des fins de caractérisation, un plan d'expérience incluant une série de dilutions est nécessaire, trois plans sont possibles (les concentrations doivent être espacées par un facteur inférieur ou égal à 2).

- Pour la méthode CSEO/TSEO, il convient d'utiliser une série géométrique d'au moins cinq concentrations. Il est recommandé d'utiliser quatre réplicats pour chaque concentration et huit témoins.
- Pour la méthode TEx/CE_x, il convient d'utiliser 12 concentrations. Il est recommandé d'utiliser deux réplicats pour chaque concentration et six témoins. Le facteur de séparation peut être variable: plus petit à de faibles concentrations, plus grand à des concentrations élevées.
- Dans le cadre de la méthode mixte, il convient d'utiliser une série géométrique de six à huit concentrations. Il est recommandé d'utiliser quatre réplicats pour chaque concentration et huit témoins. Cette méthode mixte permet d'évaluer la CSEO ainsi que le TEx/CE_x.

Un essai limite peut suffire en l'absence d'effets toxiques observés au cours de l'essai préliminaire.

Afin de faciliter la vérification du pH et de l'humidité de l'échantillon d'essai, il est recommandé d'utiliser des récipients supplémentaires pour chaque concentration, ainsi que pour le témoin.

Chaque récipient d'essai (réplicat) est rempli de 30 g d'échantillon d'essai en poids humide. Afin de faciliter la migration des collemboles, il convient de ne pas tasser le substrat dans le récipient d'essai.

7.2 Préparation du mélange d'essai

7.2.1 Essai sur un sol pollué

Conformément à la gamme de dilutions choisie, le sol soumis à essai est soigneusement mélangé au sol de référence ou au sol standard (manuellement ou à l'aide d'un mélangeur à main). L'homogénéité du mélange est contrôlée visuellement. Le poids total du sol soumis à essai et du sol de référence ou du sol standard doit être de 30 g (poids humide) dans chaque récipient d'essai (6.1). Le mélange d'essai doit être humidifié avec de l'eau déionisée pour atteindre 40 % à 60 % de sa capacité totale de rétention d'eau déterminée conformément à l'Annexe B. Dans certains cas, par exemple lorsque l'essai est réalisé sur des déchets, des pourcentages plus élevés sont nécessaires. Une vérification sommaire de la teneur en eau du sol peut être effectuée en comprimant légèrement le sol dans la main. Si la teneur en eau est correcte, de petites gouttes d'eau devraient apparaître entre les doigts.

Déterminer le pH pour chaque mélange d'essai (un récipient par concentration) conformément à l'ISO 10390 au début et à la fin de l'essai (lorsque des substances acides ou basiques sont soumises à essai, ne pas ajuster le pH).

Procéder à l'essai simultanément sur au moins quatre réplicats par concentration et sur le ou les témoins.

AVERTISSEMENT — Les sols pollués peuvent contenir des mélanges inconnus de substances 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 ainsi que par contact cutané pendant la manipulation et l'incubation.

7.2.2 Essai de substances ajoutées au substrat d'essai

Un sol standard (5.2.2) est utilisé pour préparer l'échantillon d'essai. Pour chaque récipient d'essai (6.1), le poids du substrat utilisé doit être de 30 g (poids humide). Des substances sont ajoutées au substrat d'essai, puis le tout est soigneusement mélangé.

Pour l'introduction des substances soumises à essai, utiliser la méthode a), b) ou c), selon le cas:

a) Substance hydrosoluble

- Immédiatement avant le début de l'essai, dissoudre la quantité de substance soumise à essai dans l'eau ou une partie nécessaire de cette substance pour humidifier les échantillons de sol pour les réplicats d'une concentration afin de satisfaire aux exigences de [5.2.2](#), puis mélanger soigneusement avec le sol avant d'introduire le tout dans le récipient d'essai.

b) Substances insolubles dans l'eau, mais solubles dans les solvants organiques

- Dissoudre dans un solvant volatil (tel que l'acétone ou l'hexane) la quantité de substance soumise à essai nécessaire pour obtenir la concentration souhaitée et la mélanger avec la quantité nécessaire de sable quartzique. Après avoir évaporé le solvant en installant le récipient sous une hotte aspirante, ajouter le reste du sol et l'eau et mélanger soigneusement avant d'introduire le tout dans les récipients d'essai.

Afin de disperser les substances peu solubles dans l'eau, il est possible d'avoir recours aux ultrasons, à des solvants organiques, à des émulsifiants ou à des dispersants. Dans ce cas, il convient que les concentrations soumises à essai et un témoin supplémentaire contiennent la même quantité minimale de substance auxiliaire.

AVERTISSEMENT — Prendre des précautions appropriées en cas d'exposition à des vapeurs de solvants pour éviter les risques d'inhalation ou d'explosion, et pour éviter d'endommager le matériel d'extraction, les pompes, etc.

c) Substances insolubles dans l'eau ou dans les solvants organiques

- Pour une substance insoluble dans un solvant volatil, préparer un mélange de 10 g de sable quartzique industriel finement broyé (voir [5.2.2](#)) et la quantité de substance soumise à essai nécessaire pour obtenir la concentration souhaitée. Ajouter ce mélange au reste du sol et à l'eau, et mélanger soigneusement avant d'introduire le tout dans un récipient d'essai.

Les concentrations permettant d'obtenir la CMEO/CSEO doivent être choisies sur la base des résultats de l'essai préliminaire. Choisir le nombre approprié de concentrations d'essai au-dessus et en dessous de la CMEO/CSEO, et utiliser un facteur de séparation ne dépassant pas 2.

Il n'est pas nécessaire de soumettre à essai les substances mélangées au substrat à des concentrations supérieures à 1 000 mg/kg d'échantillon d'essai.

Réaliser l'essai simultanément sur tous les réplicats par concentration et sur le ou les témoins nécessaires conformément à l'approche choisie.

Déterminer le pH pour chaque mélange d'essai (un récipient par concentration) conformément à l'ISO 10390 au début et à la fin de l'essai.

7.2.3 Préparation du récipient témoin

Le récipient témoin contient le sol témoin ([5.2.2](#)) humidifié avec de l'eau déionisée pour atteindre 40 % à 60 % de la capacité totale de rétention d'eau (déterminée conformément à l'[Annexe B](#)).

Préparer un récipient témoin pour l'essai préliminaire et six à huit récipients témoins pour l'essai définitif selon le plan d'expérience (voir [7.1.3](#)).

Préparer les récipients témoins de la même manière que les récipients d'essai. Si la préparation de l'essai nécessite l'utilisation d'un solvant (voir [7.2.2](#)), utiliser un témoin supplémentaire préparé avec le solvant, mais sans la substance soumise à essai. Couvrir les récipients comme indiqué en [6.1](#).