

PU-201

<p>NORME EXPÉRIMENTALE</p>	<p>QUALITÉ DES SOLS DÉTERMINATION DE LA TOXICITÉ D'UNE SUBSTANCE VIS-A-VIS DES LOMBRICIENS (ESPÈCE <i>EISENIA FETIDA</i>) Méthode « Artisol »</p>	<p><b>X 31-250</b> Octobre 1984</p>
--------------------------------	---	---

éditée par l'association française de normalisation (afnor) — tour europe cedex 7 92080 paris la défense — tél. (1) 778-13-26

EXEMPLAIRE RÉSERVÉ

**AVANT-PROPOS**

*La méthode d'essai décrite dans la présente norme est l'une des deux méthodes retenues par la CEE pour les études d'écotoxicité sur lombriciens prévues dans l'annexe VIII de la directive concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives relatives à la classification, l'emballage et l'étiquetage de substances dangereuses (directive 79/831/CEE du 18 septembre 1979 — JOCE L 259/10 du 15 octobre 1979).*

*Cette méthode a fait l'objet de nombreux essais tant au niveau français qu'européen qui ont permis d'en établir la validité. En relation avec les travaux de la CEE, la présente norme a été élaborée par la commission française de normalisation « Qualité des sols — Essais écotoxicologiques ».*

**1 OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION**

La présente norme expérimentale décrit une méthode permettant de déterminer la toxicité d'une substance vis-à-vis d'*Eisenia fetida* par contact cutané et digestif.

**2 PRINCIPE**

Détermination, après 14 jours, du pourcentage de mortalité de lombriciens adultes (espèce *Eisenia fetida*) placés dans un substrat artificiel appelé « Artisol », additionné de la substance expérimentée à différentes concentrations.

C'est un essai sans renouvellement du milieu pour lequel la substance expérimentée est ajoutée en une seule fois.

Estimation, à partir des résultats obtenus, de la concentration qui provoque la mortalité de 50 % des lombriciens (CL 50 - 14 j).

Les résultats sont validés par comparaison avec un essai témoin et un essai avec une substance de référence : la chloroacétamide.

L'essai est conduit en deux étapes :

- un essai préliminaire qui donne une indication approximative sur les concentrations responsables de la mortalité totale et de l'absence de mortalité et qui sert à déterminer la gamme des concentrations pour l'essai définitif.
- un essai définitif qui précise les concentrations causant entre 10 et 90 % de mortalité dont le résultat est le seul retenu.

Les concentrations sont exprimées en milligrammes de substance expérimentée par kilogramme de silice séchée constituant en partie le substrat d'essai (voir 3.2.2).

	<p>Les observations relatives à la présente norme expérimentale doivent être adressées à l'afnor, tour europe, cedex 7 92080 paris la défense avant le 1986-09-30</p>	<p>© afnor 1984 Droits de reproduction et de traduction réservés pour tous pays</p>
--	---	---

### 3 RÉACTIFS

#### 3.1 Matériel biologique

Il est constitué par des lombriciens adultes de l'espèce *Eisenia fetida* (1), âgés d'au moins deux mois, possédant un clitellum et dont le poids humide est compris entre 300 mg et 600 mg.

Les vers utilisés pour l'essai sont triés et sélectionnés de manière à constituer une population relativement homogène du point de vue de la taille et du poids.

Avant l'essai, ils sont lavés sous un jet d'eau courante et placés pendant 24 h dans la silice humidifiée (voir 3.2.2) à la température de l'essai.

L'annexe à la présente norme décrit à titre d'exemple une technique d'élevage d'*Eisenia fetida*.

#### 3.2 Substrat d'essai

Substrat artificiel, appelé « Artisol », constitué, pour un bac d'essai de 1,5 à 2 l, par :

**3.2.1** 1 425 g de billes de verre, pesés à une bille près, de 1,5 à 2,0 cm de diamètre (2), préalablement rincées à l'eau distillée et séchées.

**3.2.2** 90 g de silice amorphe (gel de silice en poudre impalpable), pesés à 0,5 g près, préalablement desséchée à l'étuve à  $103\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$  (3).

Note : Le port d'un masque est recommandé lors de la manipulation de ce produit.

**3.2.3** 215 ml d'eau distillée ou de qualité équivalente.

#### 3.3 Substance de référence

Chloroacétamide ( $\text{ClCH}_2\text{CONH}_2$ ) de qualité analytique reconnue.

### 4 APPAREILLAGE

Matériel courant de laboratoire et :

**4.1** Bacs d'essais, en verre, de 1,5 à 2 l, équipés d'une arrivée d'air saturée d'eau afin d'assurer l'humidité du milieu pendant la durée de l'essai.

**4.2** Etuve thermostatée ( $103\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ ).

(1) Les taxonomistes distinguent deux sous-espèces d'*Eisenia fetida* qui sont morphologiquement similaires : *E. fetida fetida* et *E. fetida andrei*. Utiliser si possible la seconde bien que les deux espèces soient prises en compte dans la présente norme. A titre indicatif, les lombriciens *E. fetida andrei* sont disponibles au : CAPENE — Domaine de Grammont — 34000 MONTPELLIER — Tél. : (67) 64 40 62.

(2) Les billes de verre techniques distribuées par VETROTEX, Saint Gobain, 767 Quai des Allobroges, BP 73001 CHAMBERY CEDEX (Tél. (79) 62.93.30), sous la référence billes de verre E 14,5 g, conviennent.

(3) Le gel de silice en poudre impalpable distribué sous la marque Lévilite par PROLABO (produits chimiques) Référence 24 973 297 convient.

## 5 ENVIRONNEMENT DE L'ESSAI

Pendant la durée de l'essai, placer les bacs dans une enceinte ou un local thermostaté à  $20\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ , à l'obscurité. Les bacs sont totalement recouverts d'un film plastique transparent finement perforé.

## 6 MODE OPÉRATOIRE

### 6.1 Mise en place de l'essai

#### 6.1.1 Substance hydrosoluble

Immédiatement avant le début de l'essai, dissoudre dans l'eau distillée utilisée pour humidifier la silice (3.2.3), la quantité de substance expérimentée nécessaire pour obtenir la concentration désirée.

Dans le bac d'essai (4.1), préalablement rincé trois fois à l'eau distillée et séché, placer les billes de verre (3.2.1), la silice (3.2.2) et la solution de la substance dans l'eau distillée. Homogénéiser soigneusement l'ensemble.

Placer les bacs dans le local ou l'enceinte d'essai (5). Ajouter à la surface du substrat 10 vers préparés comme indiqué en 3.1, préalablement lavés à l'eau et essuyés avec précaution sur papier filtre.

Recouvrir les bacs comme indiqué au chapitre 5.

#### 6.1.2 Substance non-hydrosoluble

Dissoudre dans un solvant volatil (par exemple acétone ou hexane) la quantité de substance expérimentée nécessaire pour obtenir la concentration désirée.

Dans le bac d'essai (4.1), préalablement rincé trois fois à l'eau distillée et séché, placer la silice (3.2.2) et la solution de substance dans le solvant. Homogénéiser soigneusement et évaporer le solvant en plaçant le bac sous une hotte aspirante. Ajouter ensuite l'eau distillée (3.2.3) et les billes de verre (3.2.1). Homogénéiser soigneusement l'ensemble et poursuivre comme en 6.1.1.

Dans le cas d'une substance insoluble dans un solvant volatil, préparer un mélange de 10 g de silice (3.2.2) et de la quantité de substance expérimentée nécessaire pour obtenir la concentration désirée. Dans le bac d'essai (4.1), placer ce mélange, les billes de verre (3.2.1), l'eau distillée (3.2.3) et 80 g de silice (3.2.2). Homogénéiser soigneusement l'ensemble et poursuivre comme en 6.1.1.

#### 6.1.3 Substance de référence

Les essais avec la chloroacétamide sont mis en place selon le mode opératoire décrit en 6.1.1.

### 6.2 Essai préliminaire

Effectuer un essai préliminaire pour 5 concentrations de la substance expérimentée (par exemple 0,001 ; 0,01 ; 0,1 ; 10 et 100 mg/kg, les concentrations étant exprimées en milligrammes de substance expérimentée par kilogramme de silice séchée) sur 10 vers par concentration et par bac.

Mettre en place l'essai comme indiqué en 6.1.

Au cours de l'essai, vérifier que les vers ne quittent pas les bacs et réintroduire éventuellement dans le milieu ceux qui ont tendance à s'échapper.

Après 14 j, dénombrer dans chaque bac les vers vivants et les vers morts (un ver est considéré comme mort lorsqu'il ne présente aucune réaction à une piqûre d'aiguille appliquée sur sa partie antérieure). Les vers peuvent être séparés du substrat sur un tamis lavé à l'eau courante.

Calculer pour chaque bac le pourcentage de mortalité. Noter les symptômes observés sur les animaux.

### 6.3 Essai définitif

À partir des résultats de l'essai préliminaire, effectuer l'essai définitif sur 5 concentrations de la substance de référence et de la substance expérimentée se situant en progression géométrique entre la plus haute concentration ne produisant aucune mortalité et la plus basse concentration produisant une mortalité totale.

Procéder simultanément à 4 répétitions par concentration et pour un essai témoin sans substance expérimentée.

Dans le cas où la mise en place de l'essai a nécessité l'utilisation d'un solvant (voir 6.1.2), traiter les bacs témoins comme les bacs d'essais, sans la substance expérimentée.

Au cours de la durée de l'essai et après 14 j, opérer comme indiqué en 6.2.

## 7 VALIDITÉ DES RÉSULTATS

En cas de difficulté d'appréciation de la mortalité des lombriciens après 14 j, faire un essai avec une durée d'exposition plus longue (par exemple 21 j).

Les résultats sont considérés comme valables si :

7.1 Le pourcentage de mortalité observé pour chaque témoin est au plus égal à 10 %.

7.2 La CL 50 — 14 j pour la chloroacétamide est comprise entre 35 et 160 mg/kg.

## 8 INTERPRÉTATION ET EXPRESSION DES RÉSULTATS

### 8.1 Interprétation des résultats

Pour chaque concentration, déterminer le pourcentage de mortalité obtenu dans l'essai définitif.

Etablir un diagramme gaussien-logarithmique en portant en ordonnées les pourcentages de mortalité et en abscisses les concentrations correspondantes de la substance expérimentée en milligrammes de substance par kilogramme de silice séchée.

Tracer au mieux la droite de régression à partir d'au moins trois points pour lesquels les pourcentages de mortalité sont compris entre 10 et 90 % et en déduire la CL 50 — 14 j de la substance expérimentée. La méthode de Litchfield et Wilcoxon (voir référence 10.1) peut être utilisée pour déterminer la limite de confiance à 95 %. Au cas où deux concentrations consécutives dans un rapport de 1,8 donnent respectivement 0 et 100 % de mortalité, elles suffisent à indiquer le domaine dans lequel se situe la CL 50 — 14 j.

### 8.2 Expression des résultats

Indiquer, en milligrammes par kilogramme de silice séchée, la CL 50 — 14 j (ou plus si l'essai a été poursuivi au-delà — voir chapitre 7), la plus forte concentration essayée causant 0 % de mortalité et la plus faible concentration essayée causant 100 % de mortalité.

## 9 PROCÈS-VERBAL D'ESSAI

Le procès-verbal d'essai doit faire référence à la présente norme et comporter, outre les résultats exprimés comme en 8.2, les indications suivantes :

- la description complète du matériel biologique utilisé (espèce, âge, gamme de poids, conditions d'élevage, fournisseur).
- les références de la substance expérimentée.

- le mode de préparation du substrat d'essai et notamment indiquer le solvant utilisé dans le cas d'une substance non hydrosoluble.
- le comportement de la substance dans le milieu d'essai : répartition, interactions éventuelles.
- les résultats obtenus avec la substance de référence.
- les conditions de l'environnement de l'essai.
- la droite de régression tracée lors de l'essai définitif.
- tous les détails opératoires non prévus par la norme et tous les incidents susceptibles d'avoir agi sur les résultats.

## 10 RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

10.1 LITCHFIELD, J.T. and F. WILCOXON, 1949. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 96, 99-113.

10.2 BOUCHE, M.B., 1972. *Lombriciens de France, Ecologie et Systématique*. Publication Institut National de la Recherche Agronomique, 671 pp.

10.3 EDWARDS, C.A. and LOFTY, 1977. *Biology of Earthworms*. London : Chapman and Hall, 331 pp.

10.4 JEANSON, C.Y., 1968. Essai de pédozoologie expérimentale : morphologie d'un sol artificiel structuré par des lombricidés. *Mémoires du Muséum national d'histoire naturelle, A, Zoologie*, 46,3,212-357. Editions du Muséum - Paris.

## ANNEXE

### EXEMPLE DE TECHNIQUE D'ÉLEVAGE D'*EISENA FETIDA*

Les lombriciens *Eisena fetida* peuvent être élevés dans les conditions suivantes :

- local thermostaté à  $23\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  ;
- éclairage naturel atténué ;
- boîtes d'élevage en bois blanc (40 cm × 40 cm × 40 cm) avec 30 cm de milieu d'élevage pour une trentaine de vers ;
- milieu d'élevage constitué à 50/50 (V/V) de terreau de feuilles de chênes stérilisé à 120 °C et de crottin de cheval frais. Dans ces conditions, le pH doit rester constamment vers 7 et il n'est pas nécessaire d'ajouter du carbonate de calcium. Le milieu d'élevage est maintenu à une humidité convenable par ajout intermittent d'un peu d'eau déchlorée et recouvert d'une couche superficielle de paille ;
- alimentation supplémentaire en discontinu avec un peu de son.

