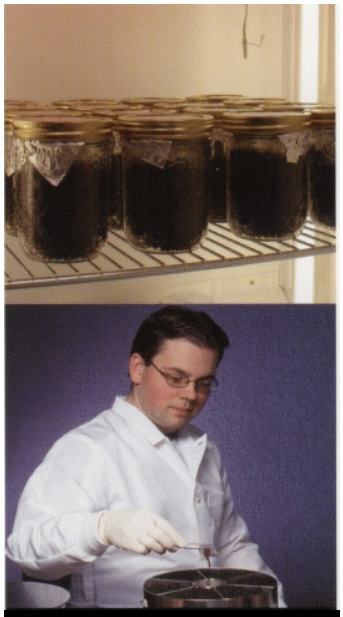
SPE 1/RM/43 — Juin 2004
Section de l'élaboration et de l'application des méthodes
Centre de technologie environnementale
Environnement Canada



SÉRIE DE LA

PROTECTION DE

L'ENVIRONNEMENT

Méthode d'essai biologique : essais pour déterminer la toxicité de sols contaminés pour les vers de terre *Eisenia andrei*, *Eisenia fetida* ou *Lumbricus terrestris*

Environment Canada Environnement Canada

Canada

Méthode d’essai biologique : Essais pour déterminer la toxicité de sols contaminés pour les vers de terre *Eisenia andrei, Eisenia fetida* ou *Lumbricus terrestris*

Section de l’élaboration et de l’application des méthodes
Centre de technologie environnementale
Environnement Canada
Ottawa

Rapport SPE 1/RM/43
juin 2004

Catalogage avant publication de Bibliothèque et Archives Canada

Vedette principale au titre :

Méthode d'essai biologique : Essais pour déterminer la toxicité de sols contaminés pour les vers de terre *Eisenia andrei, Eisenia fetida* ou *Lumbricus terrestris*

(Rapport ; SPE 1/RM/43)
Publié aussi en anglais sous le titre : Biological test method. Tests for toxicity of contaminated soil to earthworms (*Eisenia andrei, Eisenia fetida*, or *Lumbricus terrestris*)
Comprend des réf. bibliogr. : p.
ISBN 0-660-96955-6
N° de cat. En49-7/1-43F
1. Vers de terre, Effets de la pollution sur les 2. Sols — Pollution — Mesure 3. Vers de terre, Toxicologie 4. Toxicité in vitro — Méthodologie. I. Canada. Environnement Canada. II. Centre de technologie environnementale (Canada). Section de l'élaboration et de l'application des méthodes. III. Titre : Essai pour déterminer la toxicité de sols contaminés pour les vers de terre *Eisenia andrei, Eisenia fetida* ou *Lumbricus terrestris*. IV. Coll. : Rapport (Canada. Environnement Canada) ;
SPE 1/RM/43.

QL391.A6B5614 2004 628.5'5'0287 C2004-980326-3

© Sa Majesté du chef du Canada (Environnement Canada) 2004
ISBN 0-660-96955-6
N° de cat. En49-7/1-43F

Commentaires

Adresser les commentaires sur la teneur du présent rapport à :

Richard Scroggins
Chef, Division des méthodes biologiques
Centre de technologie environnementale
Environnement Canada
335, River Road
Ottawa
K1A 0H3

This report is also available in English from :

Environmental Protection Publications
Environment Canada
Ottawa, Ontario
K1A 0H3

Avis de révision

Le présent document a été révisé par le personnel de la Direction générale de l'avancement des technologies environnementales d'Environnement Canada, et sa publication a été autorisée. La mention d'appellations commerciales ou de produits offerts sur le marché ne constitue ni une recommandation ni une approbation de leur emploi par Environnement Canada. On peut se procurer d'autres produits de valeur analogue.

Résumé

*Le présent document expose, conseils à l'appui, les modes opératoires détaillés et les conditions suivre pour la préparation et la réalisation de trois méthodes servant à mesurer la toxicité des sols à l'aide de vers de terre (*Eisenia andrei, E. fetida *ou* Lumbricus terrestris*) : (1) essai de « létalité aiguë » (14 jours), avec des vers adultes ; (2) essai rapide (48 ou 72 h) sur le comportement d'évitement du sol contaminé par des vers adultes ; (3) essai (56 j ou, dans certains cas, de 63 j) pour déterminer les effets d'une exposition prolongée de vers adultes (*E. andrei *d'élevage, uniquement) et de leur progéniture à un ou à plusieurs échantillons ou concentrations de sol éventuellement ou effectivement contaminé. Appliquée dans des conditions statiques (sans renouvellement du milieu), chaque méthode emploie un ou plusieurs échantillons de sol effectivement ou éventuellement contaminé ou une ou plusieurs concentrations de substance(s) ou de produit(s) chimique(s) ajoutés à un sol servant de témoin négatif (ou à un autre sol). On ne nourrit les vers que pendant l'essai de 56 j (de flocons d'avoine bouillis).*

L'essai de létalité aiguë (14 j) se déroule dans des bocaux de verre de 500 ml, en présence d'une masse humide mesurée, équivalant à un volume d'environ 350 ml de sol et avec, selon le cas, 5 E. andrei ou fetida *ou 3* L. terrestris. *On compte au moins 5 répétitions par concentration si l'essai porte sur une seule concentration* ***ou*** *emploie* L. terrestris *et au moins 3 répétitions par concentration s'il porte sur plusieurs concentrations* ***et*** *s'il emploie* E. andrei *ou* E. fetida.

Effectué en tant qu'essai sublétal, l'essai rapide sur le comportement d'évitement dure 48 h (avec E. andrei *ou* E. fetida*) ou 72 h (avec* L. terrestris*), dans des enceintes circulaires d'acier inoxydable ou de plexiglas, chacune possédant une alvéole centrale circulaire, dépourvue de substrat (où on dépose, au début de l'essai, 10 congénères) et percée d'orifices donnant chacun sur l'un des six compartiments communicants, en forme de pointe de tarte. Trois compartiments renferment des aliquotes du même échantillon (ou de la même concentration) de matière. Ils sont séparés l'un de l'autre par autant de compartiments renfermant des aliquotes de sol propre (c'est-à-dire, de témoin négatif ou de sol de référence). À la fin de l'essai, on détermine le nombre de vers répartis dans les différents compartiments. On emploie au moins 5 enceintes si on utilise une seule concentration et normalement 1 ou 2 enceintes par concentration si les concentrations sont multiples.*

L'essai visant à déterminer les effets de l'exposition prolongée à un sol effectivement ou éventuellement contaminé n'utilise que des E. andrei *élevés en laboratoire. On commence par en placer deux par bocal de verre dans une série de bocaux de 500 ml (10 répétitions par concentration) renfermant une masse humide mesurée, équivalant à environ 350 ml de sol d'essai ou de sol propre (témoin négatif ou sol de référence). Après 28 j, on détermine le taux de survie des groupes exposés à chaque concentration, puis on poursuit l'essai pendant encore 28 j, en ne gardant que la progéniture de ces vers. À la fin des 56 j, on détermine le nombre de jeunes vers produits dans chaque enceinte et à chaque concentration, et on compare les moyennes relatives à chaque concentration. En outre, on détermine le poids sec de chaque jeune ver survivant à l'essai, pour chaque répétition, et on compare les moyennes obtenues pour chaque concentration.*

Pour la préparation et l'exécution des essais, on expose des conditions et des modes opératoires généraux ou universels. S'y ajoutent des conditions ou des modes opératoires propres à la destination de chacun des essais. Chacune des méthodes permet de mesurer et d'évaluer la toxicité : d'échantillons de solides biologiques, de boues ou de sols prélevés sur le terrain ou de matières particulaires semblables ; de sols naturels ou artificiels enrichis, au laboratoire, du ou des produits chimiques ou substances d'essai. Elle est augmentée d'instructions et d'exigences sur les installations expérimentales, le prélèvement, la manipulation et l'entreposage des échantillons, l'élevage et l'acclimatation des vers, la préparation de mélanges de sols ou de sols enrichis et la mise en branle des essais, leurs conditions particulières, les observations et les mesures à faire, les effets mesurés (ou paramètres de mesure), les méthodes de calcul, l'emploi d'un toxique de référence.

Abstract

This document provides detailed procedures, conditions, and guidance for preparing for and conducting each of three discrete biological test methods for measuring soil toxicity using earthworms (Eisenia andrei, Eisenia fetida, *or* Lumbricus terrestris). *The test methods described herein are as follows:*

(1) an acute (14-day) lethality test, using adult or sub-adult earthworms;
(2) an acute (48 or 72 h) test for avoidance of contaminated soil by adult earthworms; and
(3) a 56-day (or, in certain instances, 63-day) test for effects of prolonged exposure of adult earthworms (cultured E. andrei *only) and their progeny to one or more samples or concentrations of contaminated or potentially contaminated soil.*

Each test method is conducted as a static (i.e., no renewal) test, using one or more samples of contaminated or potentially contaminated soil or one or more concentrations of chemical(s) or chemical product(s) spiked in negative control (or other) soil. Worms are fed (cooked oatmeal) only during the 56-day test for effects of prolonged exposure to the sample(s) of test soil.

The acute lethality test is performed as a 14-day test using 500-mL glass jars containing a measured wet weight equivalent to a volume of ~350 mL of test soil. Worms of one of the three species are used with five adult worms (if E. andrei/fetida*) or three adult worms (if* L. terrestris*) being used per jar. This test uses ≥5 replicates/treatment if a single-concentration test, ≥3 replicates/treatment if a multi-concentration test with* E. andrei or E. fetida, *and ≥5 replicates/treatment if a multi-concentration test with* L. terrestris.

The acute avoidance test is performed as a 48-h (if E. andrei or E. fetida*) or 72-h (if* L. terrestris*) sublethal test using a series of circular test units constructed of stainless steel or Plexiglas. Each test unit has a circular central chamber devoid of substrate (where 10 adult worms of the same species are initially placed) with holes leading to each of six pie-shaped, interconnected test compartments. Three of the test compartments contain aliquots of the same sample (or concentration) of test material, and three (in alternating positions) contain aliquots of clean (i.e., negative control or reference) soil. The number in each of the test compartments is determined following a test period of 48 or 72 h for the worms in each test unit to distribute themselves in clean or test soil. This test uses ≥5 replicated test units/treatment if a single-concentration test, and normally one or two test units/concentration if a multi-concentration test.*

The test for effects of prolonged exposure to contaminated or potentially contaminated soil uses laboratory-cultured E. andrei only. *This test is initiated by placing two adult worms in each of a series of 500-mL glass jars (10 replicate jars/treatment) containing a measured wet weight equivalent to ~350 mL of test or clean (negative control or reference) soil. Following a 28-day exposure, the survival rate for the replicate groups of adult worms in each treatment is determined, and they are discarded. The test is continued for an additional 28 days with their progeny. At the end of the 56-day test period, the number of live juvenile worms produced in each replicate and treatment is determined and the treatment means compared. Additionally, the dry weight of individual juvenile worms surviving at test end is determined for each replicate, and the treatment means compared.*

General or universal conditions and procedures are outlined for test preparation and performance. Additional conditions and procedures are stipulated that are specific to the intended use of each test. Each of these three biological test methods is suitable for measuring and assessing the toxicity of samples of field-collected soil, biosolids, sludge, or similar particulate material; or of natural or artificial soil spiked (mixed) in the laboratory with test chemical(s) or chemical product(s). Instructions and requirements are included on test facilities, sample collection, handling and storing samples, culturing and/or holding and acclimating test organisms, preparing soil or spiked-soil mixtures and initiating tests, specific test conditions, appropriate observations and measurements, endpoints and methods of calculation, and the use of a reference toxicant.

Avant-propos

Voici une série de ***méthodes recommandées*** *pour évaluer et mesurer l'effet ou les effets toxiques subis par un organisme terrestre ou aquatique après exposition à des échantillons de substances ou de matières effectivement ou potentiellement toxiques, dans les conditions contrôlées et définies du laboratoire. Ces méthodes ont été évaluées par Environnement Canada et elles sont recommandées :*

- *pour les laboratoires d'écotoxicologie d'Environnement Canada ;*
- *pour les essais impartis par Environnement Canada ou demandés à l'industrie ou à des organismes tiers ;*
- *dans les cas où on ne possède pas d'instructions plus précises, comme celles que prévoient les règlements ;*
- *en tant que fondement d'instructions très* explicites, *comme celles qui pourraient être exigées dans un* protocole *réglementaire ou dans une* méthode normalisée *de référence.*

Les différents types d'essais choisis pour faire partie de cette collection ont été retenus parce qu'ils répondaient de façon acceptable aux besoins des programmes de protection et de gestion de l'environnement exécutés par Environnement Canada. Les rapports qui leur sont consacrés visent à guider et à faciliter l'emploi de modes opératoires cohérents, adaptés et exhaustifs pour l'obtention de données sur la toxicité de substances ou de matières particulières, présentes dans le milieu ou destinées à y aboutir, à l'égard des formes de vie aquatiques ou terrestre. Selon la méthode d'essai biologique choisie et la partie de l'environnement à laquelle on s'intéresse, ces substances ou matières pourraient englober des échantillons de substance ou de produit chimique, de sol, de sédiment ou de matière particulaire semblable, d'effluent, d'élutriat, de percolat ou d'eau réceptrice. Dans l'annexe A sont énumérés les méthodes d'essai biologique et les guides à l'appui que la Section de l'élaboration et de l'application des méthodes d'Environnement Canada, à Ottawa, a publiés jusqu'à maintenant.

Les notions définies sous la rubrique « Terminologie » figurent une première fois en italiques dans le corps du texte. Les italiques servent également à mettre ces notions et d'autres termes en évidence dans tout le document.

Table des matières

Résumé v
Abstract vi
Avant-propos vii
Liste des tableaux xiii
Liste des figures xiii
Liste des abréviations, des symboles et des formules chimiques xiv
Terminologie xv
Remerciements xxvi

Section 1
Introduction 1
1.1 Contexte 1
1.2 Identification, aire de répartition et cycle reproductif des vers Eisenia *spp. et L. terrestris* 2
1.2.1 Eisenia andrei/fetida 4
1.2.2 Lumbricus terrestris 5
1.3 Utilisation traditionnelle des vers de terre dans les essais de toxicité 6
1.3.1 Essais de létalité aiguë 7
1.3.2 Essais de réaction aiguë d'évitement 8
1.3.3 Essais pour mesurer les effets d'une exposition prolongée sur la survie, la reproduction et la croissance 10

Section 2
Organismes d'expérience 12
2.1 Espèces et stade de leur développement 12
2.2 Sources 12
2.3 Élevage d'*E. andrei/fetida* 14
2.3.1 Généralités 14
2.3.2 Équipements et appareillage 16
2.3.3 Éclairage 16
2.3.4 Température 16
2.3.5 Substrat d'élevage 16
2.3.6 Alimentation des vers 17
2.3.7 Manipulation des organismes et maintien des élevages 18
2.3.8 Vers destinés aux essais de toxicité 20
2.3.9 Indices de santé et de performances 20
2.4 Entretien et acclimatation des vers 21
2.4.1 Généralités 21
2.4.2 Équipement et appareillage 23
2.4.3 Éclairage 23
2.4.4 Température 23
2.4.5 Substrat 24
2.4.6 Alimentation 24
2.4.7 Manipulation et maintien des organismes 24
2.4.8 Vers destinés aux essais de toxicité 25

2.4.9 Indices de santé et de performances 25

Section 3
Système expérimental 27
3.1 Installations et appareillage 27
3.1.1 Essais initiaux 29
3.1.2 Essai de létalité aiguë 29
3.1.3 Essai de réaction aiguë d'évitement 29
3.1.4 Essai pour mesurer les effets d'une exposition prolongée sur la survie, la reproduction et la croissance 30
3.2 Sol témoin négatif 30
3.2.1 Sol naturel 31
3.2.2 Sol artificiel 31
3.3 Sol témoin positif 32
3.4 Sol de référence 33
3.5 Sol à l'étude 34

Section 4
Modes opératoires universels 35
4.1 Essai de létalité aiguë 35
4.1.1 Début de l'essai 38
4.1.2 Conditions expérimentales 39
4.1.3 Critère de validité de l'essai 40
4.1.4 Alimentation 40
4.1.5 Observations et mesures pendant l'essai 40
4.1.6 Fin de l'essai 41
4.1.7 Effets mesurés (paramètres) et calculs 42
4.1.8 Essais avec un toxique de référence 42
4.2 Essai de réaction aiguë d'évitement 46
4.2.1 Début de l'essai 47
4.2.2 Conditions expérimentales 51
4.2.3 Critère de validité de l'essai 52
4.2.4 Alimentation 52
4.2.5 Observations et mesures pendant l'essai 52
4.2.6 Fin de l'essai 52
4.2.7 Effets mesurés (paramètres) et calculs 53
4.2.8 Essais employant un toxique de référence 53
4.3 Essai pour mesurer les effets d'une exposition prolongée sur la survie, la reproduction et la croissance 56
4.3.1 Début de l'essai 57
4.3.2 Conditions expérimentales 59
4.3.3 Critères de validité de l'essai 59
4.3.4 Alimentation 59
4.3.5 Observations et mesures pendant l'essai 60
4.3.6 Fin de l'essai 62
4.3.7 Effets mesurés (paramètres) et calculs 63
4.3.8 Essais employant un toxique de référence 64

Section 5
Modes opératoires particuliers pour l'essai de toxicité d'un sol prélevé sur le terrain ou d'une matière particulaire semblable 66
5.1 Prélèvement des échantillons 66
5.2 Étiquetage, transport, entreposage et analyse des échantillons 68
5.3 Préparation de l'échantillon en vue de l'essai 69
5.4 Observations et mesures pendant l'essai 74
5.5 Effets mesurés et calculs 74
5.5.1 Variations des plans d'étude et de l'analyse 76
5.5.2 Calcul de la puissance 77

Section 6
Modes opératoires particuliers de l'essai sur un sol additionné d'une substance 79
6.1 Propriétés, étiquetage et entreposage des échantillons 79
6.2 Préparation des mélanges d'essai 80
6.3 Observations et mesures pendant l'essai 84
6.4 Paramètres ultimes (effets mesurés) et calculs 84
6.4.1 CL 50 ou CE 50 85
6.4.2 Concentration inhibitrice CI p 88
6.4.2.1 Emploi de la régression 88
6.4.2.2 Interpolation linéaire au moyen du programme ICPIN 92

Section 7
Rapports à produire 94
7.1 Exigences minimales pour le rapport sur l'essai 94
7.1.1 Substance ou matière à l'étude 94
7.1.2 Organismes utilisés 94
7.1.3 Installations expérimentales 95
7.1.4 Méthode d'essai 95
7.1.5 Conditions expérimentales et modes opératoires 95
7.1.6 Résultats 95
7.2 Exigences supplémentaires 96
7.2.1 Substance ou matière étudiée 96
7.2.2 Organismes employés 96
7.2.3 Installations et appareillage expérimentaux 96
7.2.4 Sol témoin négatif ou sol de référence 96
7.2.5 Méthode d'essai 97
7.2.6 Conditions expérimentales et modes opératoires 97
7.2.7 Résultats de l'essai 97

Références

Annexe A
Méthodes d'essai biologique et guides à l'appui publiés par la Section de l'élaboration et de l'application des méthodes d'Environnement Canada 109

Annexe B
Composition du Groupe intergouvernemental sur l'écotoxicité (en décembre 2003) . 112

Annexe C
Administration centrale et bureaux régionaux d'Environnement Canada 114

Annexe D
Composition du Groupe consultatif scientifique (GCS) 115

Annexe E
Variantes de modes opératoires pour l'élevage d'*Eisenia andrei/fetida*, décrites dans les méthodes d'essai et les guides internationaux pour la mesure de la toxicité de sols à l'aide de ces espèces de vers de terre 117

Annexe F
Variantes de modes opératoires des essais de létalité d'une durée de 14 jours visant à mesurer la toxicité de sols pour des vers de terre (*Eisenia andrei/fetida*), décrites dans les méthodes internationales 124

Annexe G
Variantes de modes opératoires des essais visant à mesurer les effets d'un sol contaminé sur la reproduction de vers de terre (*Eisenia andrei/fetida*), décrites dans les méthodes internationales 134

Annexe H
Sols témoins négatifs, naturels et artificiels, utilisés pour l'élaboration des méthodes et l'établissement des critères de validité des essais 143

Annexe I
Séries logarithmiques de concentrations convenant aux essais de toxicité 147

Annexe J
Initiation au calcul de concentrations inhibitrices d'un pourcentage donné (CI p) par régression linéaire et non linéaire 148

Liste des tableaux

1. — Liste de contrôle des conditions et des modes opératoires recommandés pour l'élevage d'*Eisenia andrei* ou d'*Eisenia fetida* destinés à des essais de mesure de la toxicité des sols 15

2. — Liste de contrôle des conditions et des modes opératoires recommandés pour l'entretien et l'acclimatation des vers des espèces *Eisenia andrei, Eisenia fetida* ou *Lumbricus terrestris* destinés à des essais de toxicité des sols 22

3. — Liste de contrôle des conditions et des modes opératoires recommandés pour les essais de létalité d'une durée de 14 jours pour la mesure de la toxicité d'un sol pour les vers de terre *Eisenia andrei, Eisenia fetida* ou *Lumbricus terrestris* 36

4. — Liste de contrôle des conditions et des modes opératoires recommandés pour un essai visant à mesurer les effets sublétaux aigus (48 ou 72 h) d'un sol contaminé sur la réaction d'évitement de vers de terre (*Eisenia andrei, Eisenia fetida* ou *Lumbricus terrestris*) 48

5. — Liste de contrôle des conditions et des modes opératoires recommandés pour les essais visant à mesurer les effets d'une exposition prolongée de vers de terre (*Eisenia andrei*) à un sol contaminé sur leur survie, leur reproduction et leur croissance 54

Liste des figures

1. — Points à considérer dans les préparatifs et l'exécution d'essais de toxicité des sols employant des vers de terre (*Eisenia* sp. ou *Lumbricus terrestris*) et divers types de matières ou de substances 3

2. — Caractéristiques recommandées de l'enceinte devant servir à l'essai de réaction aiguë d'évitement employant des vers de terre (*E. andrei, E. fetida* ou *L. terrestris*) dans un sol *non contaminé* ou contaminé 28

3. — Estimation de la concentration létale médiane par report des taux de mortalité sur papier graphique à échelle log-probabilité 87

4. — Processus général de l'analyse statistique et de la sélection du modèle convenant le mieux aux données quantitatives sur la toxicité 91

Liste des abréviations, des symboles et des formules chimiques

α	alpha ou degré de signification statistique
ANOVA	analyse de variance
C.V.	coefficient de variation
$Ca(OH)_2$	hydroxyde de calcium
$CaCl_2$	chlorure de calcium
$CaCO_3$	carbonate de calcium
CCME	Conseil canadien des ministres de l'environnement
CE 50	concentration efficace médiane
CEMO	concentration avec effet minimal observé
CE x	concentration efficace ayant *x %* d'effet
cf.	(*confer*) reportez-vous à
CI p	concentration inhibitrice ayant *p %* d'effet
CL 50	concentration létale médiane
CLHP	chromatographie liquide à haute performance (ou à haute pression)
cm	centimètre(s)
COT	carbonique total
CRE	capacité de rétention en eau
CSEO	concentration sans effet observé
d. e.	diamètre extérieur
d. i.	diamètre intérieur
fig.	figure
g	gramme(s)
G	moyenne géométrique
h	heure(s)
H_0	hypothèse nulle
H_2O	eau
HAP	aromatique polycyclique
HCl	acide chlorhydrique
HNO_3	acide nitrique
ICAP	plasma inductif d'argon
j	jour
KCl	chlorure de potassium
kg	kilogramme(s)
L	litre(s)
ln	logarithme naturel
Log	logarithme naturel
lx	lux
m	mètre(s)
M	concentration molaire
M.M.	masse moléculaire
mg	milligramme(s)
mL	millilitre(s)
mm	millimètre(s)
MO	matière organique
mS	millisiemens
n	taille de l'échantillon
nm	nanomètre(s)
p/p	poids sur poids
P	probabilité
s	seconde(s)
SEA	spectrophotométrie d'émission atomique
sp.	espèce
spp.	espèces
syn.	synonyme
t	temps
TL 50	temps létal médian
v/v	volume sur volume
v.	voir
°C	degré(s) Celsius
/	divisé par
÷	divisé par
σ	écart-type
=	égale(nt)
~	environ
≤	inférieur ou égal à
MD	marque déposée
µg	microgramme(s)
µm	micromètre(s)
µmol	micromole(s)
µS	microsiemens
−	moins
×	multiplié par
§	paragraphe(s)
<	plus petit que
+	plus
±	plus ou moins
>	plus grand que
%	pour cent
≥	supérieur ou égal à

Terminologie

Nota : Toutes les définitions ci-après s'inscrivent dans le contexte du présent rapport. Elles pourraient ne pas être adaptées à d'autres contextes.

Verbes auxiliaires

L'auxiliaire *doit* (*doivent*) exprime l'obligation absolue.

L'auxiliaire *devrait* (*devraient*) et le conditionnel d'obligation *il faudrait* expriment une recommandation ou la nécessité de respecter dans la mesure du possible la condition ou la marche à suivre.

L'auxiliaire *peut* (*peuvent*) expriment l'autorisation ou la capacité d'accomplir une action.

L'auxiliaire *pourrait* (*pourraient*) indiquent la possibilité ou l'éventualité.

Termes techniques

acclimatation, accoutumance physiologique à une valeur particulière d'un ou de plusieurs facteurs du milieu tels que la température. Le terme s'applique habituellement l'accoutumance aux conditions contrôlées de laboratoire.

*adult*e, se dit d'un ver de terre ayant atteint la maturité sexuelle et qui est doté d'un *clitellum* bien visible. (V. *clitellum, jeune, subadulte*.)

anécique, se dit des vers de terre actifs dans toutes les strates du sol, normalement dans des galeries permanentes qui s'ouvrent à la surface du sol ; ces espèces se nourrissent de la litière en surface et l'enfouissent.

assurance de la qualité, programme appliqué dans un laboratoire pour que les travaux scientifiques et techniques arrivent à des résultats précis et exacts. Cela comprend la sélection des bons modes opératoires, le prélèvement des échantillons, le choix des limites, l'évaluation des données, la *maîtrise de la qualité* ainsi que les compétences et la formation du personnel.

biomasse, masse totale d'un groupe d'animaux ou de végétaux.

clitellum, anneau ou selle de tissu glandulaire située sur certains segments du milieu du corps des lombricidés. C'est la caractéristique la plus visible du ver de terre adulte et il n'est proéminent que chez les individus parvenus à la maturité sexuelle, c'est-à-dire les adultes. Les jeunes vers qui n'ont pas atteint la maturité sexuelle se distinguent des adultes par l'absence de clitellum. Le *clitellum* sécrète le cocon dans lequel les ovules et les spermatozoïdes sont déposés. Pendant l'accouplement, il sécrète également un mucus qui enveloppe les extrémités antérieures des deux vers.

cocon, enveloppe de protection des œufs formée par le clitellum d'où sortent les jeunes. (V. *clitellum.*)

conductivité, grandeur physique caractérisant la capacité de conduction du courant électrique par une solution aqueuse. Cette capacité dépend de la concentration des ions dans la solution, de leur valence et de leur mobilité ainsi que de la température de la solution. La conductivité se mesure à 25 °C et elle s'exprime en millisiemens par mètre (mS/m).

conformité, respect des exigences officielles énoncées dans les règlements ou sur les permis.

crête de puberté, syn. de *tubercule de puberté.*

croissance, augmentation de la taille ou du poids, du fait de la prolifération de nouveaux tissus. Dans la présente méthode, il s'agit de l'augmentation du poids sec.

décontamination, traitement d'un lieu contaminé pour empêcher, réduire au minimum ou atténuer des effets nocifs pour la santé humaine et l'environnement. L'opération peut comprendre à la fois des actions physiques directes (par ex. l'élimination, la destruction et le confinement des toxiques) et des moyens administratifs (par ex. le zonage ou des décrets).

dissépiment, cloison interne, intersegmentaire, vis-à-vis les constrictions, ou sillons, intersegmentaires du tégument d'un ver de terre. Le dissépiment joue aussi le rôle de membrane de soutien des organes internes (Reynolds, 1977).

élevage, **1.** Ensemble d'organismes gardés au laboratoire, dans des conditions définies et contrôlées, pendant une ou plusieurs générations, pour donner des organismes d'expérience en bonne santé. **— 2.** Maintien, au laboratoire, d'organismes capturés dans la nature ou obtenus dans le commerce jusqu'à leur acclimatation aux conditions expérimentales et à l'atteinte de l'âge et de la taille convenant à l'essai de toxicité, tout en assurant leur bonne santé.

élever, s'occuper du développement, jusqu'à un certain degré d'accomplissement, dans des conditions définies et contrôlées, d'organismes d'expérience en bonne santé, pendant une ou plusieurs générations.

épigé, se dit des espèces de vers vivant dans la litière, principalement actifs dans les détritus et se nourrissant principalement de matière organique fraîche.

épilobe, syn. de *épilobique.*

épilobique, se dit du prostomium dont le prolongement dorsal étroit, limité par des sillons latéraux, s'arrête sur le trajet du premier segment. (V. *prostomium* et *premier segment*.)

évaluation des risques, v. *évaluation des risques écologiques.*

évaluation des risques écologiques, identification et quantification des *risques* pour les organismes non humains, puis détermination de l'acceptabilité de ces risques.

hormèse, stimulation observée chez les organismes en expérience, par rapport aux organismes témoins, aux faibles concentrations utilisées dans un essai de toxicité.

jeune, ver non adulte, dépourvu d'un *clitellum* visible. Font partie des jeunes les *nouveau-nés* (moins de 48 h après la sortie du cocon) et tous les stades non adultes des vers sortis du cocon jusqu'au stade *subadulte*. (V. *adulte, clitellum, nouveau-né, subadulte*.)

lombricidé, ver de terre appartenant à la famille Lumbricidae, superfamille Lumbricoidea, ordre Haplotaxida, sous-classe Oligochaeta (oligochètes), classe Clitellata et embranchement Annelida (annélides).

lux, unité d'éclairement (symbole : *lx*) par mètre carré. 1 lux = 0,092 9 bougie-pied (pied-chandelle), et 1 bougie-pied = 10,76 lux. Pour transformer les lux en flux quantique [$\mu mol/(m^2 \cdot s)$], il faut connaître la qualité spectrale de la source lumineuse. Les conditions d'éclairage ou l'irradiance sont bien décrites par le flux quantique (débit de

fluence photonique) dans la gamme de longueurs d'ondes photosynthétiquement efficaces d'environ 400 à 700 nm. La relation entre flux quantique et lux (bougie-pied) varie énormément en fonction de la source lumineuse, du photomètre utilisé, de la disposition géométrique et des réflexions possibles (v. ASTM, 1999a). Les facteurs approximatifs de conversion entre le flux quantique et le lux sont cependant les suivants :

- sous éclairage fluorescent blanc et cru : 1 lux ≃ 0,014 $\mu mol/(m^2 \cdot s)$;
- sous éclairage fluorescent à spectre continu (par ex. Vita-Lite® de Duro-Test®) : 1 lux ≃ 0,016 $\mu mol/(m^2 \cdot s)$;
- sous éclairage à incandescence : 1 lux ≃ 0,019 $\mu mol/(m^2 \cdot s)$ [Deitzer, 1994 ; Sager et McFarlane, 1997].

maîtrise de la qualité, actions précises, englobées dans le programme d'assurance de la qualité : normalisation, étalonnage, obtention de sous-échantillons, échantillons témoins et estimations statistiques des limites relatives aux données.

mamelon, région où l'épiderme du lombric est modifié par une papille glandulaire sans délimitation nette, au travers de laquelle s'ouvre le follicule d'une soie génitale (Reynolds, 1977).

méthode de référence, protocole particulier d'un essai de toxicité, c'est-à-dire méthode d'essai biologique au moyen d'un ensemble explicite de modes opératoires et de conditions expérimentales sur lesquels les parties concernées se sont officiellement entendues, qui est décrite dans un document écrit qu'on appelle également *protocole.* Contrairement aux autres méthodes polyvalentes (génériques) d'essai biologique publiées par Environnement Canada, la *méthode de référence* est souvent réservée aux essais exigés par un règlement particulier.

nouveau-né, ver venant de sortir du cocon et ayant commencé à se nourrir activement et à croître. (V. *jeune.*)

paléarctique, se dit de la région zoogéographique englobant toute l'Europe et l'ex-URSS jusqu'au Pacifique, l'Afrique au nord du Sahara et l'Asie au nord de l'Himalaya.

papille, éminence dermique sur le corps d'un ver de terre (Reynolds, 1977).

péristomium, premier segment du corps d'un ver de terre, dépourvu de soies, dans lequel s'ouvre la bouche. (V. *soie.*)

pH, logarithme négatif de l'activité des ions hydrogène mesurée par leur concentration en moles par litre. Le pH exprime le degré ou l'intensité des réactions acide et alcaline sur une échelle de 0 à 14, où le pH 7 représente la neutralité. Les pH inférieurs à 7 correspondent, en ordre décroissant, à des réactions acides de plus en plus fortes, tandis que les pH supérieurs à 7 indiquent, en ordre croissant, des réactions basiques ou alcalines de plus en plus fortes.

photopériode, durée quotidienne de la période d'éclairement.

pollution, addition d'une substance, d'une matière ou d'une forme d'énergie telle que la chaleur à un milieu, en une quantité y causant une modification décelable, qui est nocive pour l'utilisation de ce milieu par un organisme ou l'espèce humaine. Il existe des définitions officielles (nationales et internationales) de la *pollution,* auxquelles il faudrait faire honneur dans les contextes appropriés.

premier segment, syn. de *péristomium.*

prétraitement, traitement d'un échantillon ou d'une fraction d'échantillon de sol avant d'y exposer les organismes d'expérience.

progéniture, les vers engendrés directement par un ver adulte.

prostomium, lobe antérieur en saillie devant le péristomium, au-dessus de la bouche. (V. *péristomium.*)

protocole, document exposant avec précision le mode opératoire d'un essai, auquel adhèrent officiellement les parties concernées. ‖ Ces marches à suivre.

reproduction sexuée, reproduction qui se fait par la conjonction des sexes, c'est-à-dire par fertilisation de l'ovule par un spermatozoïde.

risque, probabilité de survenance d'un effet fâcheux.

soie, production, ressemblant à un bâtonnet ou à un poil, de cellules situées au fond d'une invagination épidermique tubulaire appelé follicule sétigère. Les soies sont de divers types (par ex. génitales, péniales ou non spécialisées ; v. Reynolds, 1977, pour plus de précisions).

spermathèque, vésicule située dans les dissépiments du ver de terre, qui reçoit le sperme du partenaire. Ce sperme s'y conserve jusqu'à la ponte dans le cocon (Reynolds, 1977). [V. *dissépiment.*]

subadulte, se dit d'un *jeune* ver, « adolescent » qui n'a pas atteint la maturité sexuelle et est dépourvu de *clitellum* bien visible. Pour l'essai de létalité aiguë, qui peut commencer soit avec des vers adultes ou subadultes, le poids frais au départ de l'expérience doit se situer dans la gamme de 250 à 600 mg, dans le cas d'*E. andrei* ou *E. fetida*, ou de 3 à 10 g, dans le cas de *L. terrestris*. (V. *adulte, clitellum, jeune*.)

surveillance, vérification régulière (par ex. journalière, hebdomadaire, mensuelle, trimestrielle) de la qualité ou de la collecte et de la divulgation des données. Dans le présent rapport, c'est la vérification et la mesure périodiques (régulières), soit de certaines variables biologiques ou de certaines variables de la qualité des sols ou, encore, c'est le prélèvement et l'essai de toxicité d'échantillons de sols.

tanylobique, se dit du prostomium dont le prolongement dorsal étroit atteint vers l'arrière le sillon intersegmentaire 1/2. (V. *prostomium, péristomium*.)

tanylobe, syn. de *tanylobique.*

tubercule de la puberté, bourrelet glandulaire qui, chez le ver de terre, se manifeste près des marges ventrolatérales du clitellum. Il n'est pas toujours présent et il peut être continu ou discontinu ainsi que de tailles et de formes variées (Reynolds, 1977).

tumescence génitale, syn. de *mamelon.*

vésicule séminale, organe sacciforme recueillant les produits mâles (spermatogonies) jusqu'au moment de l'accouplement.

Terminologie des substances ou des matières

capacité de rétention en eau, quantité maximale d'eau que le sol peut retenir, après saturation complète. On la mesure par gravimétrie et on l'exprime généralement en pourcentage du poids d'eau retenue dans un échantillon de sol ayant été saturé d'eau.

carbone organique total (*COT*), teneur en carbone organique du sol, à l'exclusion du carbone des résidus végétaux et animaux non décomposés. On dose le COT après combustion sèche (ISO, 1995). [V. *matière organique.*]

concentration, rapport de la masse de la substance ou de la matière à l'étude à la masse du sol, en milligrammes par kilogramme de sol sec (mg/kg). On peut l'exprimer en pourcentage (par ex., de sol d'un emplacement contaminé) par kilogramme de sol sec.

contaminant, substance ou matière présente dans un système naturel ou présente à une concentration accrue, souvent en raison, directement ou non, de l'activité humaine. Se dit souvent de substances ou de matières présentes à des concentrations susceptibles de causer des effets biologiques néfastes.

contaminé, se dit d'un sol renfermant des substances ou des matières à des concentrations posant une menace connue ou potentielle à la santé de l'environnement ou à la santé humaine.

définitif, en parlant d'un essai de toxicité portant sur un sol, décisif (par opposition à préliminaire, comme un essai de recherche de la gamme de concentrations à utiliser). [V. *recherche de la gamme de concentrations à utiliser.*]

eau désionisée, eau ayant été purifiée par passage en colonnes de résines ou par osmose inverse, pour l'en débarrasser des ions tels que Ca^{++} et Mg^{++}.

eau d'essai, eau utilisée dans la préparation de solutions mères, le rinçage des organismes d'expérience ou de la verrerie et des autres appareils utilisés pour l'élevage ou l'entretien et l'acclimatation des vers de terre et utilisée à d'autres fins exigées par la méthode d'essai biologique (par ex. l'hydratation des échantillons de sol à l'étude). L'*eau d'essai* doit être désionisée ou distillée, à défaut de meilleur traitement (par ex. eau de qualité « réactif » obtenue par osmose inverse, passage sur cartouches à charbon ou cartouches échangeuses d'ions). [V. *eau d'hydratation.*]

eau d'hydratation, eau servant à hydrater le sol à l'étude afin de fournir aux organismes en expérience l'humidité qui leur convient. L'eau servant à l'hydratation est normalement de l'eau d'essai. C'est fréquemment de l'eau désionisée ou distillée. Selon le plan et le but de l'étude, on pourrait utiliser de l'eau de surface ou de l'eau souterraine de l'emplacement à l'étude, au lieu d'eau désionisée ou distillée, pour l'hydratation de chaque sol à l'étude (y compris du sol témoin négatif). [V. *eau d'essai, eau désionisée, eau distillée.*]

eau distillée, eau ayant été distillée dans un appareil en verre borosilicaté ou d'un d'un autre matériau pour l'en débarrasser de ses impuretés.

emplacement, terrain délimité que l'on utilise ou que l'on envisage d'utiliser pour une étude parce qu'il est effectivement ou potentiellement contaminé par des xénobiotiques.

enrichissement, addition d'une quantité connue de substance(s), de produit(s) chimique(s) ou, encore, d'autres substance(s) ou matière(s) à l'étude [par ex. un échantillon de boue résiduaire ou de boue de forage] à un sol naturel ou artificiel. Cette adjonction se fait habituellement dans un *sol témoin négatif,* un *sol de référence* ou un autre *sol non contaminé,* mais parfois dans un sol effectivement ou potentiellement contaminé. Après l'addition (enrichissement), on homogénéise le mélange. Si la matière à l'étude que l'on ajoute est le sol d'un emplacement à l'étude, les documents d'Environnement Canada parlent plutôt de *dilution* ou, simplement, d'*addition*. (V. *sol additionné d'une substance, sol enrichi.*)

essai de toxicité de référence, essai employant un toxique de référence, pour évaluer, pendant le déroulement d'un essai de toxicité d'un sol, la sensibilité des organismes ainsi que la précision et la fiabilité des résultats obtenus par le laboratoire pour ce toxique au moment où l'on évalue la matière ou la substance à l'étude. Tout résultat s'écartant d'un intervalle normal établi rend suspectes la sensibilité des organismes ainsi que l'exécution et la précision de l'essai. L'essai de toxicité de référence avec des vers de terre emploie un *sol additionné* d'une substance étalon.

fertilité, aptitude d'un sol à fournir aux plantes les éléments nutritifs dont elles ont besoin, dans les quantités, sous les formes et dans les proportions nécessaires à leur croissance optimale. On la mesure directement par dosage des ions et des composés importants pour la nutrition végétale. Les facteurs fondamentaux de la *fertilité* sont les éléments nutritifs essentiels (macronutriments, parmi lesquels C, H, O, N, P, K, Ca, Mg, S, et les micronutriments ou oligoéléments, parmi lesquels Fe, Mn, Mo, B, Cu, Zn et Cl). On mesure indirectement la *fertilité* en montrant la productivité du sol (c'est-à-dire son aptitude à produire des végétaux qui fournissent à l'Homme les aliments et les fibres essentiels ; Hausenbuiller, 1985).

humidité, pourcentage d'eau dans un échantillon de sol, calculé comme suit : 100 fois le quotient de la différence entre le poids frais d'un sous-échantillon de ce sol moins son poids sec, divisée par le poids sec du même sol.

lot, quantité totale d'un *sol* particulier *à l'étude* (ou concentration précise de ce sol), préparée pour chaque variante expérimentale (concentration) employée dans un essai. Le *lot* est constitué de tout *sol à l'étude* qui est hydraté et prêt à séparer en répétitions.

matière, ce dont quelque chose est constitué. Ses caractéristiques seraient plus ou moins uniformes. Un sol, un sédiment, une eau de surface sont des matières. Habituellement, la *matière* renferme un nombre plus ou moins grand de substances.

matière organique, ensemble, principalement, des résidus de matière végétale et animale à différents stades de décomposition, y compris l'humus. L'accumulation de la *matière organique* dans le sol est un équilibre entre la restitution ou l'apport de résidus d'origine végétale et animale et entre leur perte ultérieure en raison de la décomposition de ces résidus par les microorganismes du sol. Dans la plupart des types de sols, l'équation suivante (AESA, 2001) permet d'estimer la teneur en matière organique (MO) totale du sol à partir des résultats du dosage du carbone organique total (COT) : % de MO = % de COT × 1,78. (V. *carbone organique total.*)

produit, préparation du commerce renfermant une ou plusieurs substances chimiques. (V. *produit chimique, substance.*)

produit chimique, tout élément, composé, préparation ou mélange de substances qui pourraient se retrouver associés à des sédiments ou à de l'eau ou y être mélangés ou ajoutés.

recherche de la gamme de concentrations à utiliser, type d'essai préliminaire sur un sol, visant à donner une première idée de la matière à l'étude dans des conditions définies et pour aider à choisir l'intervalle de concentrations à utiliser dans l'essai définitif à plusieurs concentrations. (V. *définitif.*)

sol, matière entière, intacte, représentative du milieu terrestre, ayant subi un minimum de manipulations après son prélèvement ou sa préparation. Dans la nature, il résulte de l'altération physique, chimique et biologique des roches et de la décomposition et du recyclage des éléments nutritifs provenant de la matière organique engendrée par la vie végétale et animale. Ses caractéristiques physicochimiques subissent l'influence de l'activité des microbes et des invertébrés (des vers de terre, notamment) qui s'y déroule ainsi que de l'activité humaine.

sol additionné d'une substance, sol naturel ou artificiel (habituellement *sol témoin négatif, sol de référence* ou autre *sol non contaminé*) auquel on a ajouté une ou plusieurs substances ou produits chimiques, que l'on a mélangés à fond pour en assurer l'homogénéisation à une concentration précise pour obtenir un *lot* que l'on pourra utiliser dans un essai de toxicité du sol. (V. sol enrichi.)

sol à l'étude, échantillon de sol prélevé sur le terrain ou de *sol additionné d'une substance,* dont on veut évaluer la toxicité pour les vers de terre. Parfois, l'expression désigne également tout échantillon solide ou mélange d'échantillons solides (par ex. sol témoin négatif, sol témoin positif, sol de référence, boue résiduaire, boue de forage) utilisé dans un essai de toxicité d'un sol.

sol artificiel, sol préparé au laboratoire, dont la composition s'approche de celle d'un sol naturel et dont les constituants naturels (sable, argile et tourbe) sont en proportions précises. Ce sol peut servir de *sol témoin négatif* ainsi que de diluant pour la préparation de concentrations multiples de *sol(s) d'emplacement(s) à l'étude* ou de *sol(s) additionné(s) d'une substance.*

sol de référence, sol *non contaminé,* prélevé sur le terrain, ou sol artificiel, choisi pour être employé dans un essai particulier de toxicité en même temps qu'un *sol témoin négatif* et un ou plusieurs échantillons du *sol à l'étude*. Ce dernier sol pourrait être le sol d'un emplacement à l'étude (prélevé sur le terrain), effectivement ou potentiellement contaminé, ou un sol additionné d'une substance. Le sol de référence présente souvent des propriétés physicochimiques (par ex. texture, compacité, teneur en COT, pH) proches de celles du sol à l'étude, sauf qu'il n'a pas été exposé à la source de contamination que l'on cherche à évaluer. Dans les essais sur le sol de l'emplacement à l'étude, on choisit souvent dans les environs de ce dernier un ou plusieurs échantillons de sol de référence qui, de ce fait, pourrait avoir été exposé à d'autres sources de contamination que celle(s) que l'on étudie. Le sol de référence sert à décrire les effets de la matrice sur l'essai et il peut également servir de diluant pour la préparation de concentrations multiples du sol à l'étude. Dans les essais où l'on emploie un sol additionné d'une substance, on pourrait choisir un ou plusieurs échantillons de sol artificiel possédant des caractéristiques physicochimiques différentes pour examiner l'influence de certaines propriétés du sol (par ex. la texture ou la teneur en matière organique) sur la toxicité d'une substance additionnée à chacun de ces types de sols. (V. *sol témoin négatif, sol d'un emplacement à l'étude, sol à l'étude, sol non contaminé, sol artificiel, sol additionné d'une substance.*)

sol d'un emplacement à l'étude, échantillon de sol destiné à un essai de toxicité employant des vers de terre, prélevé sur le terrain, dans un endroit que l'on pense être contaminé par une ou plusieurs substances. Parfois, l'expression englobe le *sol de référence* ou le *sol témoin négatif* provenant d'un emplacement.

sol enrichi, sol naturel ou artificiel (habituellement un *sol témoin négatif,* un *sol de référence* ou un autre *sol non contaminé*) auquel on a ajouté, au laboratoire, une ou plusieurs substances ou produits chimiques ou d'autres substances ou matières à l'étude (par ex. un échantillon de boue résiduaire ou de boue de forage), le tout homogénéisé de façon à obtenir un lot de concentration précise, qui servira dans un essai de toxicité du sol. (V. *sol additionné d'une substance, enrichissement.*)

sol non contaminé, sol ne contenant ni substance ni matière provoquant des effets toxiques observables chez les organismes en expérience.

sol témoin, v. *sol témoin négatif.*

sol témoin d'un solvant, échantillon de sol (habituellement artificiel) employé dans un essai employant un sol additionné d'une substance, dans lequel il faut employer un solvant organique pour solubiliser la substance à l'étude avant son mélange dans une quantité mesurée de *sol témoin négatif.* La quantité de solvant employé pour préparer ce témoin doit contenir la même concentration d'agent solubilisant que la prise d'essai de sol enrichi renfermant la concentration maximale de la substance ou des substances à l'étude. Cette concentration de solvant ne devrait pas diminuer les performances des vers de terre en expérience. Tout essai employant un solvant organique pour la préparation d'une ou de plusieurs concentrations de sol additionné d'une substance doit comprendre un *sol témoin du solvant.* (V. *sol artificiel, sol témoin négatif, sol additionné d'une substance.*)

sol témoin négatif, sol *non contaminé* ne renfermant aucun contaminant pouvant modifier la survie, la reproduction, la croissance ou le comportement des organismes en expérience. Ce pourrait être un sol naturel provenant d'un lieu non contaminé ou un *sol artificiel*. Ce sol ne doit être additionné d'aucune matière ou substance à l'étude et il doit permettre une survie ou des performances acceptables des organismes en expérience. L'emploi d'un *sol témoin négatif* procure une base de comparaison pour l'interprétation des résultats des essais de toxicité effectués sur un ou des sols.

sol témoin positif, sol *contaminé* renfermant un ou plusieurs contaminants pouvant modifier la survie, la reproduction, la croissance ou le comportement des organismes en expérience dans les méthodes d'essai biologique exposées ci-après. On pourrait utiliser un tel sol comme toxique de référence pour évaluer la sensibilité des organismes au moment où on évalue la matière ou la substance à l'étude et pour déterminer la précision des résultats obtenus par le laboratoire à l'égard de ce toxique de référence.

solution mère, solution concentrée de la substance ou des substances à l'étude, dont on ajoute une quantité mesurée à un échantillon de sol naturel ou artificiel. On homogénéise ensuite le tout afin d'obtenir un *lot* de *sol enrichi* en cette ou ces substances. Pour préparer la solution mère du titre nécessaire, on ajoute à l'eau d'essai (*eau désionisée* ou *eau distillée* ou l'équivalent) des masses ou des volumes mesurés de la ou des substances ou du ou des produits chimiques à l'étude, avec ou sans solvant organique.

station d'échantillonnage, endroit précis sur un *emplacement,* ou dans une unité d'échantillonnage (selon le plan de l'étude), où le ou les échantillons de sols sont prélevés en vue d'essais de toxicité et d'analyses physicochimiques connexes.

substance, type particulier de matière, aux propriétés plus ou moins uniformes. Le terme a un sens plus restreint que *matière* et pourrait désigner un produit chimique ou un élément chimique particulier.

taux d'humidité, syn. d'*humidité.*

témoin, dans une enquête ou une étude, variante expérimentale reproduisant tous les facteurs ou toutes les conditions qui pourraient influer sur les résultats, sauf la condition particulière à l'étude. Dans un essai de toxicité, le *témoin* doit reproduire toutes les conditions d'exposition, mais il ne peut pas renfermer de matières contaminées auxquelles on s'intéresse. Le *témoin* sert à vérifier l'absence de toxicité attribuable aux conditions de base telles que la température, l'état de santé des organismes en expérience ou les effets dus à la manipulation de ces derniers. Sauf indication contraire, *témoin* est synonyme de *témoin négatif.*

témoin négatif, v. *témoin.*

texture, propriété d'un sol définie d'après le pourcentage pondéral de sables, de limons et d'argiles dans sa fraction minérale. La texture renseigne sur les caractéristiques et le comportement généraux des substances présentes dans les sols, plus particulièrement lorsqu'on connaît la structure du sol et sa teneur en matière organique. La texture est déterminée au laboratoire, par une analyse granulométrique en deux étapes comportant d'abord la séparation des sables (fragments grossiers) par tamisage, des limons et des argiles. Ceux-ci sont séparés ensuite les uns des autres par leur sédimentation dans l'eau. Les classifications texturales se fondent sur des classes de sols délimitées par des intervalles précis de composition en sables, en limons et en argiles. Les trois grandes classes de textures sont les suivantes :

(i) les sols à texture grossière (sables, sables loameux, loams sableux) ;
(ii) les sols à texture de moyenne granulométrie (loams, loams limoneux, limons, loams sableux très fins) ;
(iii) les sols à texture fine (argiles, loams limono-argileux, loams sablo-argileux, argiles limoneuses, argiles sableuses).

On peut encore distinguer la texture (par ex. argiles sableuses, loams limoneux, loams) d'après les schémas de classification à l'aide des proportions relatives de sables, de limons et d'argiles dans le sol (Hausenbuiller, 1985 ; ACECSS, 1987).

toxique de référence, substance ou matière étalon servant à mesurer la sensibilité des organismes en expérience afin d'établir le degré de confiance à accorder aux données obtenues sur la toxicité de la substance ou de la matière à l'étude. Dans la plupart des cas, on réalise un essai de toxicité avec ce toxique de référence pour évaluer la sensibilité des organismes au moment où l'on évalue la matière ou la substance à l'étude ainsi que la précision et la fiabilité des résultats obtenus par le laboratoire à l'égard de cet étalon.

Terminologie toxicologique et statistique

aigu, qui se manifeste dans une courte période d'exposition (en secondes, en minutes, en heures ou en quelques jours) relativement à la durée de vie de l'organisme exposé.

batterie d'essais, combinaison de plusieurs essais toxicologiques, normalement sur différentes espèces d'organismes (par ex. série d'essais de toxicité de sols employant des vers de terre, des végétaux ou des collemboles), mesurant différents effets biologiques (par ex. effets létaux et divers effets sublétaux) et éprouvant différentes durées d'exposition (par ex. effets aigus et chroniques).

bio-essai, v. *dosage biologique.*

carte de contrôle, graphique permettant de suivre l'évolution de l'effet exercé par un toxique de référence. On reporte, pour la date de l'essai se trouvant sur l'axe horizontal, la concentration où l'effet est observé, cette concentration se trouvant sur une échelle logarithmique verticale.

chronique, qui survient après une période d'exposition relativement longue (semaines, mois, années), habituellement une partie importante (par ex. au moins 10 %) de la durée de vie de l'organisme.

coefficient de variation (*C. V.*), pourcentage exprimant le quotient de l'écart type (σ) d'un ensemble de données divisé par la moyenne ($\bar{x}$) de cet ensemble. On le calcule à partir de la formule suivante : $C.\ V.\ (\%) = 100\ \sigma/\bar{x}$.

concentration avec effet minimal observé (*CEMO*), la plus faible des concentrations d'essai causant, chez l'organisme qui y est exposé, un effet statistiquement significatif par rapport au groupe témoin.

concentration efficace médiane (*CE 50*), concentration (par ex. en pourcentage ou en mg/kg) de substance(s) ou de matière(s) que l'on estime causer certains effets toxiques définis chez la moitié des organismes en expérience. Dans la plupart des cas, on obtient la CE 50 et ses limites de confiance à 95 % par analyse des pourcentages des organismes touchés (par ex. manifestant une réaction de fuite ou de phobie) à diverses concentrations de la substance ou des substances ou matière(s), après une période fixe d'exposition, dont il faut préciser la durée (par ex. 48 ou 72 h). La CE 50 décrit des effets quantiques (binaires), létaux ou sublétaux et ne s'applique pas aux effets continus (c'est-à-dire quantitatifs) [v. CI *p*]. Selon les objectifs de l'étude, on pourrait calculer une CE *x* différente de la CE 50 (par ex. la CE 20) ou en sus de cette dernière.

concentration inhibitrice ayant p *pour cent d'effet* (*CI p*), concentration représentant une estimation ponctuelle de la concentration de substance ou de matière à l'étude causant un pourcentage précisé d'inhibition (*p*), par rapport au témoin, dans la mesure d'un effet biologique *quantitatif* (continu) tel que le nombre de jeunes engendrés ou la taille atteinte par les organismes, à la fin de l'essai.

concentration létale médiane (CL 50), concentration (par ex. exprimée en pourcentage ou en mg/kg) de substance ou de matière dans le sol que l'on estime être létale pour la moitié des organismes en expérience. La CL 50 et ses limites de confiance à 95 % sont habituellement obtenues par analyse statistique des taux de mortalité correspondant à 5 concentrations d'essai, au moins, après une période fixe d'exposition. Il faut préciser la durée d'exposition (par ex. CL 50 après 7 jours ou 14 jours). Selon les objectifs de l'étude, on pourrait calculer, plutôt que la CL 50 ou en sus, une CL *x* (par ex. la CL 20).

concentration sans effet observé (*CSEO*), concentration maximale de substance ou de matière à laquelle on n'observe aucun effet négatif statistiquement significatif chez l'organisme qui y est exposé, par rapport au groupe témoin.

dosage biologique, essai par lequel on mesure la concentration ou l'activité d'une substance par la réaction des organismes qui y sont exposés. En pharmacologie, le dosage biologique permet d'évaluer l'activité inconnue d'une préparation donnée de médicaments par rapport à l'activité connue d'une préparation étalon. Dans les études environnementales, on préfère l'expression *essai de toxicité,* plus précise.

échantillons réitérés, échantillons de sol prélevés dans la même station d'échantillonnage, pour obtenir une estimation de l'erreur d'échantillonnage ou pour améliorer la précision de l'estimation. Chaque échantillon de sol prélevé dans la station d'échantillonnage est considéré comme une répétition. Les échantillons supplémentaires sont considérés comme réitérés quand on les soumet au même traitement, mais qu'on les conserve dans des récipients séparés (c'est-à-dire qu'ils ne forment pas d'échantillons composés).

écotoxicologie, subdivision de la *toxicologie,* insistant cependant sur les écosystèmes, les communautés naturelles et les espèces sauvages, sans exclure l'espèce humaine des écosystèmes.

effet mesuré, syn. de *paramètre*.

effet quantique, dans un essai de toxicité, effet auquel chaque organisme réagit ou ne réagit pas. Par exemple l'animal pourrait réagir en mourant ou en évitant un sol contaminé. En général, l'effet quantique s'exprime par des dénombrements ou des pourcentages issus de dénombrements. (V. *effet quantitatif.*)

effet quantitatif, dans un essai de toxicité, effet dont la valeur mesurée varie de façon continue sur une échelle numérique, par exemple le nombre de jeunes engendrés ou le poids sec de la progéniture à la fin de l'essai. En général, on détermine l'*effet quantitatif* et on l'exprime par des mesures. (V. *effet quantique.*)

effet sublétal, effet fâcheux subit par un organisme, sous la concentration ou le degré de contamination directement mortelle pendant l'essai.

en conditions statiques, se dit de l'essai de toxicité pendant lequel on ne renouvelle ni remplace le sol (ni aucune substance ou produit chimique s'y trouvant).

essai de toxicité, détermination de l'effet d'une substance ou d'une matière chez un groupe d'organismes choisis (par ex. *Lumbricus terrestris* ou *Eisenia fetida*), dans des conditions définies. L'essai employant des échantillons de sol permet habituellement de mesurer : *a*) la proportion d'organismes touchés par l'effet (*effet quantique*) ; *b*) le degré d'effet manifesté (*effet quantitatif* ou gradué), après exposition des organismes à l'échantillon entier (par ex. sol non dilué de l'emplacement à l'étude) ou à des concentrations précises de cet échantillon.

hétéroscédasticité, hétérogénéité des résidus que présentent les données dans un nuage de points (v. figures J.2B et J.2C de l'annexe J). Il y a hétéroscédasticité lorsque la variabilité des résidus diffère de façon significative de celle des variables indépendantes (c'est-à-dire les concentrations utilisées dans les essais ou les variantes expérimentales). Dans l'analyse statistique et l'évaluation des résidus (par ex. dans le test de Levine), si les données expérimentales présentent une hétéroscédasticité (c'est-à-dire que les résidus ne sont pas homogènes), c'est qu'il existe une différence significative entre la variance des résidus correspondant aux différentes concentrations ou variantes expérimentales utilisées dans l'essai. (V. *homoscédasticité, résidu.*)

homoscédasticité, homogénéité des résidus que présentent les données dans un nuage de points (v. figure J.2A de l'annexe J). Il y a homoscédasticité lorsque la variabilité des résidus ne diffère pas de façon significative de celle des variables indépendantes (c'est-à-dire les concentrations utilisées dans les essais ou les variantes expérimentales). Dans l'analyse statistique et l'évaluation des résidus (par ex. dans le test de Levine), si les données expérimentales présentent une homoscédasticité (c'est-à-dire que les résidus sont homogènes), c'est qu'il n'existe pas de différence significative entre la variance des résidus correspondant aux différentes concentrations ou variantes expérimentales utilisées dans l'essai. (V. *hétéroscédasticité, résidu.*)

létal, causant directement la mort chez l'organisme en expérience, c'est-à-dire l'interruption de tous les signes visibles de mouvement ou de toute autre fonction de la vie.

limites de la zone de confiance, limites, calculées logarithmiquement, du domaine $G \pm 2\sigma$ (moyenne géométrique plus ou moins deux écarts types) de l'effet mesuré expérimentalement d'un toxique de référence.

moyenne géométrique, moyenne de mesures répétées, calculée logarithmiquement. Son avantage, contrairement à la moyenne arithmétique, est de faire en sorte que les valeurs extrêmes n'influent pas sur sa propre valeur. On peut la calculer comme la racine énième du produit de *n* valeurs ou comme l'antilogarithme de la moyenne des logarithmes de *n* valeurs.

paramètre. 1. *Paramètre ultime de mesure,* mesure ou valeur caractérisant les résultats d'un essai (CL 50, CE 50, CI 25). — 2. Réaction de l'organisme en expérience exprimant l'effet (par ex. taux de mortalité ou nombre de jeunes engendrés). Dans ce dernier sens, on parle aussi et surtout d'*effet mesuré.*

précision, accord entre les résultats de plusieurs mesures répétées, c'est-à-dire le degré de certitude entourant un résultat ou la petitesse de l'intervalle dans lequel se situe un paramètre calculé statistiquement tel que la CI p.

répétition, en parlant d'une variante expérimentale, d'une concentration ou d'une enceinte expérimentale, l'unité renfermant le nombre prescrit d'organismes exposés à l'une des concentrations de la matière ou de la substance à l'étude ou unité constituant le groupe témoin ou, encore, le groupe exposé à la matière de référence. La *répétition* d'une variante expérimentale doit être une unité expérimentale indépendante ; en conséquence, tout transfert d'organismes ou de matière à l'étude d'une enceinte à un autre invalide l'analyse statistique fondée sur la répétition.

résidu, dans le contexte du § 6.4.2.1 et de l'annexe J, l'écart entre l'estimation prédite (modélisée) moins la valeur effectivement observée. (V. *hétéroscédasticité, homoscédasticité.*)

sublétal, se dit d'une toxicité nuisible pour l'organisme, mais à une concentration ou à un degré de contamination inférieur à la concentration ou degré de contamination directement mortelle pendant l'essai.

toxicité, propriété inhérente d'une substance ou d'une matière de provoquer un ou des effets négatifs, éventuellement létaux ou sublétaux, chez des organismes.

toxicité aiguë, effet négatif (létal ou sublétal), discernable, provoqué chez l'organisme en expérience après une courte période d'exposition (quelques jours, habituellement, et, pour les besoins de la présente méthode, moins de 14 jours) à un sol.

toxicité chronique, manifestation d'effets négatifs pendant ou après une exposition à long terme à un ou à plusieurs contaminants, ces effets étant habituellement reliés à des modifications des fonctions de reproduction, de la croissance, du métabolisme, de la capacité de survie ou de toute autre variable biologique (par ex. le comportement) observée.

toxicologie, science de la toxicité des matières, des substances ou des conditions toxiques. Elle fait appel à une gamme illimitée de disciplines scientifiques, d'outils de laboratoire ou de terrain ou d'études à divers niveaux d'organisation, que ce soit à celui de la molécule ou à celui de l'écosystème en passant par l'espèce et les populations. La toxicologie appliquée se propose normalement de définir la marge de sécurité de l'emploi d'une substance chimique ou d'autres agents. (V. *écotoxicologie.*)

toxique, adj. Nocif. Une substance ou une matière toxique peut causer des effets fâcheux pour les organismes si elle est présente en quantités suffisantes, au bon endroit. ◆ *subst.* Substance toxique, poison.

variante expérimentale, sol particulier *à l'étude* (par ex. *sol d'un emplacement, sol de référence, sol témoin négatif*) provenant d'une station particulière d'échantillonnage ou concentration de sol additionné d'une substance (ou mélange constitué du sol à l'étude, dilué dans du *sol non contaminé*), préparé au laboratoire. Dans un essai de toxicité, la *variante expérimentale* est habituellement représentée par plusieurs répétitions des échantillons du sol à l'étude. (V. *répétition, échantillons réitérés.*)

Remerciements

Les auteurs du présent document sont D.J. McLeay (McLeay Environmental Ltd., de Victoria) et G.L. Stephenson (Aquaterra Environmental, d'Orton, en Ontario). Des remerciements sincères vont à J.A. Miller (Miller Environmental Sciences Inc., d'Innisfil, en Ontario) et à J.I. Princz (Division des méthodes biologiques [DMB], Centre de technologie environnementale (CTE), d'Environnement Canada [EC], à Ottawa) pour leur contribution à certaines parties du document. Nous sommes reconnaissants de l'apport de J.B. Sprague (Sprague Associates Ltd., de Salt Spring Island, en Colombie-Britannique) à certaines définitions de la rubrique « Terminologie » et de ses conseils en matière de statistique. Merci à B.A. Zajdlik (Zajdlik & Associates, de Rockwood, en Ontario) pour ses conseils sur les analyses de régression. N.C. Feisthauer (Stantec Consulting Ltd., de Guelph) et J. McCann (Université de Waterloo) ont donné des orientations techniques des plus utiles et des conseils particuliers dont il a été tenu compte dans le document.

Agissant en qualité de responsable scientifique, R.P. Scroggins (DMB, CTE, à Ottawa) a assuré au travail sa direction et son apport techniques. Les études ayant abouti aux méthodes d'essai biologique ont été mises au point par G.L. Stephenson, dans le cadre de sa thèse de doctorat. D'autres études ont été dirigées par Mme Stephenson et gérées et exécutées par N.C. Feisthauer et ses collègues de Stantec Consulting Ltd. (auparavant ESG International Inc.). Dans les laboratoires, une aide précieuse a également été fournie par de nombreux étudiants du premier cycle et des cycles supérieurs à Guelph. Nous remercions R. Pandey, de Guelph Chemical Laboratories Ltd. (à Guelph) et V. Marsielle-Kerslake des services d'analyse de l'Université de Guelph de leur aide sur les méthodes d'analyse physicochimique

J. Princz (DMB, CTE) a coordonné les études interlaboratoires visant à valider la méthode d'essai de létalité aiguë décrite dans le présent document. Ces études ont été effectuées avec la participation des laboratoires suivants : le Centre des sciences environnementales du Pacifique (CSEP) d'EC (North Vancouver), le Centre des sciences de l'environnement de la région de l'Atlantique d'EC (Moncton), le Laboratoire de toxicologie des sols d'EC (CTE, Ottawa), l'Institut de recherche en biotechnologie (IRB) du Conseil national de recherches Canada (CNRC, Montréal), le Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec (Sainte-Foy), le ministère de l'Environnement de l'Ontario (Etobicoke), le Saskatchewan Research Council (Saskatoon), BC Research Inc. (Vancouver), EVS Consultants Ltd. (North Vancouver), HydroQual Laboratories Ltd. (Calgary), Stantec Consulting Ltd. (auparavant ESG International Inc.), Pollutech EnviroQuatics Ltd. (Point Edward, en Ontario) et Bodycôte Essais matériaux Canada Inc. (Sainte-Foy). Toute notre reconnaissance et nos remerciements à Buchanan Environment Ltd. (Fredericton) pour sa contribution aux discussions ayant mené à ces études de validation des méthodes. Le nom des employés de laboratoire ayant participé à ces essais figure dans les rapports techniques de ces études (EC, 2004a).

J. Princz (DMB, EC, Ottawa) a coordonné les études interlaboratoires visant à valider la méthode de mesure de la réaction d'évitement décrite dans le présent document. Ces études ont été effectuées par les laboratoires suivants : le Centre des sciences de l'environnement de la région de l'Atlantique (Moncton), le Laboratoire de toxicologie des sols (Ottawa), Pollutec EnviroQuatics Ltd. (Point Edward) et Stantec Consulting Ltd. (Guelph). Le nom des employés de laboratoire ayant participé à ces essais figure dans les rapports techniques de ces études (EC, 2004a).

Nous sommes sincèrement reconnaissants des nombreuses observations fournies par chacun des membres du Groupe consultatif scientifique (GCS) d'Environnement Canada chargés des première et dernière révisions du document, comme suit : C. Bastien (Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec, ministère de l'Environnement, Sainte-Foy), C. Edwards (Département d'entomologie, université d'État de l'Ohio à Columbus), R. Kuperman (Geo-Centers, Inc., Aberdeen Proving Ground, Maryland), R. Lanno (Département d'entomologie de l'université d'État de l'Ohio à Columbus), F. Riepert (Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft [Centre fédéral de recherche biologique pour l'agriculture et la foresterie], Berlin), J. Römbke (ETC Ökotoxikologie G. m. b. H., Flörsheim am Main), G. Sunahara (IRB, CNRC, Montréal), G. van Aggelen (CSEP, EC, North Vancouver), C.A.M. van Gestel (Institut des sciences de l'environnement, université libre d'Amsterdam) et S. Visser (Département des sciences biologiques, Calgary). Les

coordonnées de chaque membre du GCS figurent dans l'annexe D. Nous reconnaissons également le soutien et l'apport des divers membres du Groupe intergouvernemental d'écotoxicologie (v. annexe B).

Les personnes suivantes ont également transmis des observations utiles sur les versions initiale ou finale du présent document : K. Becker-van Slooten et S. Campiche (École polytechnique fédérale de Lausanne) ; W. Diehl (Département des sciences biologiques, université d'État du Mississippi) ; J. Filser (Zentrum für Umweltforschung und Umwelttechnologie [UFT, Centre de recherche et de technologie environnementales], université de Brême) ; P. Hankard (CEH Monks Wood, Abbots Ripton, Huntington, R.-U.) ; J. Hatcher (HydroQual Laboratories Ltd., Calgary) ; M. Hughes (Université du Nord de la Colombie-Britannique [UNCB], Prince George) ; K. Hund-Rinke (Fraunhofer Institut für Molekularbiologie und Angewandte Oekologie [Institut Fraunhofer de biologie moléculaire et d'écologie appliquée], Fraunhofer-IME, Schmallenberg) ; L. Kapustka (Ecological Planning and Toxicology Inc., Corvallis, Oregon) ; G. Linder (station expérimentale du Service géologique des États-Unis à Brooks, Oregon) ; J. McCann (Département de biologie, U. de Waterloo, Ont.) ; J. Miller (Miller Environmental Sciences Inc., Innisfil) ; J. Princz (DMB, EC, Ottawa) ; J.M.L. Rodrigues (Département de biologie, U. d'Aveiro, Portugal) ; M. Rutherford (UNCB, Prince George) ; M. Schaefer (UFT, U. de Brême) ; J. Scott-Fordsmand (Département d'écologie terrestre, Institut national de recherche environnementale, Silkeborg, Danemark) ; J.P. Sousa (Instituto do Ambiente e Vida, Université de Coimbra, Portugal) ; J.B. Sprague (Sprague Associates Ltd., Salt Spring Island) ; B.-J. Unis (HydroQual Laboratories Ltd., Calgary) ; M. Warne (Administration de la protection de l'environnement, Sydney, Australie).

Introduction

1.1 Contexte

La *Section de l'élaboration et de l'application des méthodes* (SEAM) est chargée de l'élaboration, de la normalisation et de la publication (v. annexe A) d'une collection de méthodes d'essai biologique pour la mesure et l'évaluation de l'effet ou des effets toxiques subis par une espèce terrestre ou aquatique exposée à des échantillons de matières ou de substances dans des conditions contrôlées et définies de laboratoire. En 1994, la SEAM a entrepris un programme pluriannuel de recherche, de développement, de validation et de publication d'un certain nombre de méthodes normalisées d'essai biologique pour la mesure de la *toxicité* d'échantillons de *sols* effectivement ou potentiellement contaminés à l'aide d'espèces terrestres appropriées. Dès le début, Environnement Canada a décidé que les nouvelles méthodes devaient s'appliquer aux conditions que l'on trouve de façon typique dans les sols canadiens et que les organismes choisis à cette fin devaient être représentatifs des espèces d'invertébrés terrestres et de plantes vivant dans les écosystèmes sols du Canada. Dans un premier temps de ce programme pluriannuel, on a compulsé toutes les méthodes d'essai biologique utilisées en Amérique du Nord et ailleurs pour évaluer la toxicité des sols contaminés pour les plantes et les invertébrés du sol. Les auteurs du rapport d'examen des méthodes ont recommandé à Environnement Canada d'appuyer la mise au point, la normalisation et la publication d'un certain nombre de méthodes monospécifiques d'essai biologique pour la mesure de la toxicité des sols, notamment de méthodes utilisant les vers de terre (Bonnell Environmental Consulting, 1994). Cette recommandation a été avalisée par le Groupe intergouvernemental sur l'écotoxicité (GIE) [annexe B] ainsi que par l'administration centrale et les Régions d'Environnement Canada (annexe C).

Depuis 1994, sous la direction de la SEAM, on a parachevé une série d'études en laboratoire sur la sélection d'organismes sensibles, convenant à la mesure de la toxicité des sols, pour répondre aux exigences canadiennes en matière de réglementation et de *surveillance* et sur la mise au point de méthodes appropriées d'essai biologique. On a produit un rapport technique décrivant les efforts et les constatations ayant accompagné la mise au point d'*essais de toxicité* utilisant des vers de terre pour l'évaluation des sols contaminés (Aquaterra Environmental, 1998a). D'autres rapports techniques issus de ces études en laboratoire décrivent un essai pour mesurer la mortalité et l'inhibition des fonctions de reproduction d'un petit arthropode terricole (un collembole ; Aquaterra Environmental, 1998b) et des essais plurispécifiques pour mesurer les effets négatifs du sol contaminé sur la survie, le développement et la croissance des plantes terrestres (Aquaterra Environmental, 1998c).

Environnement Canada a coordonné ou exécuté un certain nombre d'essais de toxicité des sols employant diverses espèces de vers de terre exposés à des échantillons de sols contaminés par des pesticides, des métaux, des déchets pétrochimiques ou d'éventuels *toxiques de référence*. Ces études (ESP, 1992 ; Aquaterra Environmental, 1998a ; Stephenson *et al.*, 1997, 1998, 1999a, b, 2000a ; EC, 2000a, b ; Aquaterra Environmental et ESG, 2000 ; ESG, 2001, 2002 ; ESG et Aquaterra Environmental, 2002 ; Stantec et Aquaterra Environmental, 2004) se sont concentrées sur la mise au point et la normalisation de méthodes d'essai biologiques pour la détermination de la toxicité *létale* et *sublétale* d'échantillons de sols contaminés pour les vers de terre. En se fondant sur les résultats de ces études, Environnement Canada a préparé les trois méthodes d'essai biologique ci-après pour mesurer la toxicité des sols :

- un essai de létalité *aiguë* (14 jours) employant des eisénies (c'est-à-dire *Eisenia andrei* ou *E. fetida*) ou *Lumbricus terrestris* ;
- un essai de toxicité sublétale aiguë (c'est-à-dire 48 h avec *Eisenia* spp. ; 72 h avec *L. terrestris*) portant sur les réactions d'évitement et employant les vers *E. andrei*, *E. fetida* ou *L. terrestris* ;
- un essai pour mesurer les effets d'une exposition plus longue (8 semaines) d'*E. andrei* élevé en laboratoire sur sa survie, sa reproduction et sa *croissance*.

Un groupe consultatif technique (v. annexe D) constitué de spécialistes internationaux connaissant bien la conception et la mise en œuvre d'essais de toxicité des sols employant des vers de terre a fourni des références capitales qui ont

été examinées et prises en considération dans le cadre du présent projet. Ces personnes ont également constitué un comité de lecture critique des deux ébauches de cette méthode. Un groupe élargi de personnes s'y connaissant (v. les remerciements) a transmis d'autres observations en réponse à l'ébauche finale précédant la publication. L'expérience de la communauté scientifique internationale dans la réalisation d'essais similaires de toxicité des sols utilisant des vers de terre (v. les annexes E, F et G) a beaucoup servi à la préparation de ces trois méthodes d'essai biologique.

Dans le présent document, on précise les conditions et modes opératoires détaillées de la préparation et de la réalisation de chacune de ces trois méthodes. On décrit les modes opératoires universels de la préparation et de la réalisation d'essais de toxicité de sols au moyen d'une espèce choisie de vers de terre (c'est-à-dire *E. andrei*, *E. fetida* ou *L. terrestris*). On présente également les conditions et les modes opératoires particuliers qui sont obligatoires ou recommandés lorsqu'on utilise n'importe laquelle de ces trois méthodes pour évaluer différents types de *substances* ou de *matières* (par ex. des échantillons de sol prélevés sur le terrain ou de déchet particulaire semblable ou des échantillons d'une ou de plusieurs *substances* ou *produits* chimiques, mélangés à des fins expérimentales à un sol naturel ou artificiel ou placés à son contact).

Dans l'organigramme de la figure 1 sont énumérés les sujets universels abordés dans le document et les sujets propres à l'essai d'échantillons de sol prélevés sur le terrain, de déchet particulaire semblable (par ex. boue résiduaire, boue de forage ou déblais de dragage) ou de sol additionné, à des fins expérimentales, de substance(s) ou de produit(s) chimique(s).

Ces méthodes d'essai biologique sont destinées à servir à l'évaluation de la toxicité létale et sublétale d'échantillons de matières telles que :

(1) un sol prélevé sur le terrain, qui est effectivement ou potentiellement contaminé ;

(2) des sols dont on envisage l'enlèvement et l'élimination ou la *décontamination ;*

(3) des déblais de dragage destinés à l'épandage ou dont on envisage l'épandage après déshydratation ;

(4) des boues industrielles ou urbaines ou des déchets particulaires semblables, qui pourraient être épandues ;

(5) un sol contaminé ou *non contaminé* (naturel ou *artificiel*), additionné d'une ou de plusieurs substances ou produits chimiques (par ex. pour l'évaluation du risque posé par les produits chimiques nouveaux ou ceux d'utilisation courante).

Dans la préparation de ces méthodes, on a tenté d'instaurer un juste équilibre entre les considérations scientifiques, pratiques et pécuniaires et de faire en sorte que les résultats seraient suffisamment précis dans la plupart des situations auxquelles ils seraient appliqués. On pose par hypothèse que l'utilisateur possède un certain degré de connaissances ou qu'il connaît dans une certaine mesure les essais de toxicité des sols. Le présent document ne donne pas les consignes explicites qu'il faudrait suivre dans un *protocole* réglementaire, bien que le présent document soit destiné à servir de guide utile à cette application et à d'autres.

Pour des conseils sur la mise en œuvre de ces méthodes et d'autres méthodes d'essai biologique ainsi que sur l'interprétation et l'application des résultats des essais de toxicité des sols, le lecteur devrait consulter les § 4.1.2, 5.5 et 5.6.4 dans EC (1999).

1.2 Identification, aire de répartition et cycle reproductif des vers Eisenia *spp. et* L. terrestris

Les vers de terre à utiliser dans une ou plusieurs méthodes d'essai biologique décrites dans le présent document (c'est-à-dire *Eisenia andrei*, *Eisenia fetida* ou *Lumbricus terrestris)* appartiennent à la famille *Lumbricidae* (lombricidés) [embranchement *Annelida ;* classe *Clitellata ;* sous-classe *Oligochaeta ;* ordre *Haplotaxida ;* superfamille *Lumbricoidea ;* famille *Lumbricidae*). Les lombricidés ne sont pas indigènes des sols canadiens. Ils ont très probablement été introduits d'Europe par les premiers colons (Bonnell, 1994 ; Fox, 2000). On trouve des renseignements définitifs sur l'identification, la répartition, la biologie et le cycle reproductif des lombricidés des genres *Eisenia* spp. et *L. terrestris* dans un certain nombre de publications, notamment : Edwards et Lofty, 1977 ; Reynolds, 1977 ; Fender, 1985 ; Sims et Gerard, 1985 ; Curry, 1988 ; Bouché, 1992 ; Christensen et Mather, 1994 ; ainsi qu'Edwards et Bohlen, 1996. Les lombricidés sont d'importants membres de la faune du sol et sont des organismes convenant à l'évaluation des sols potentiellement *toxiques.* Avec les autres vers de terre, ils

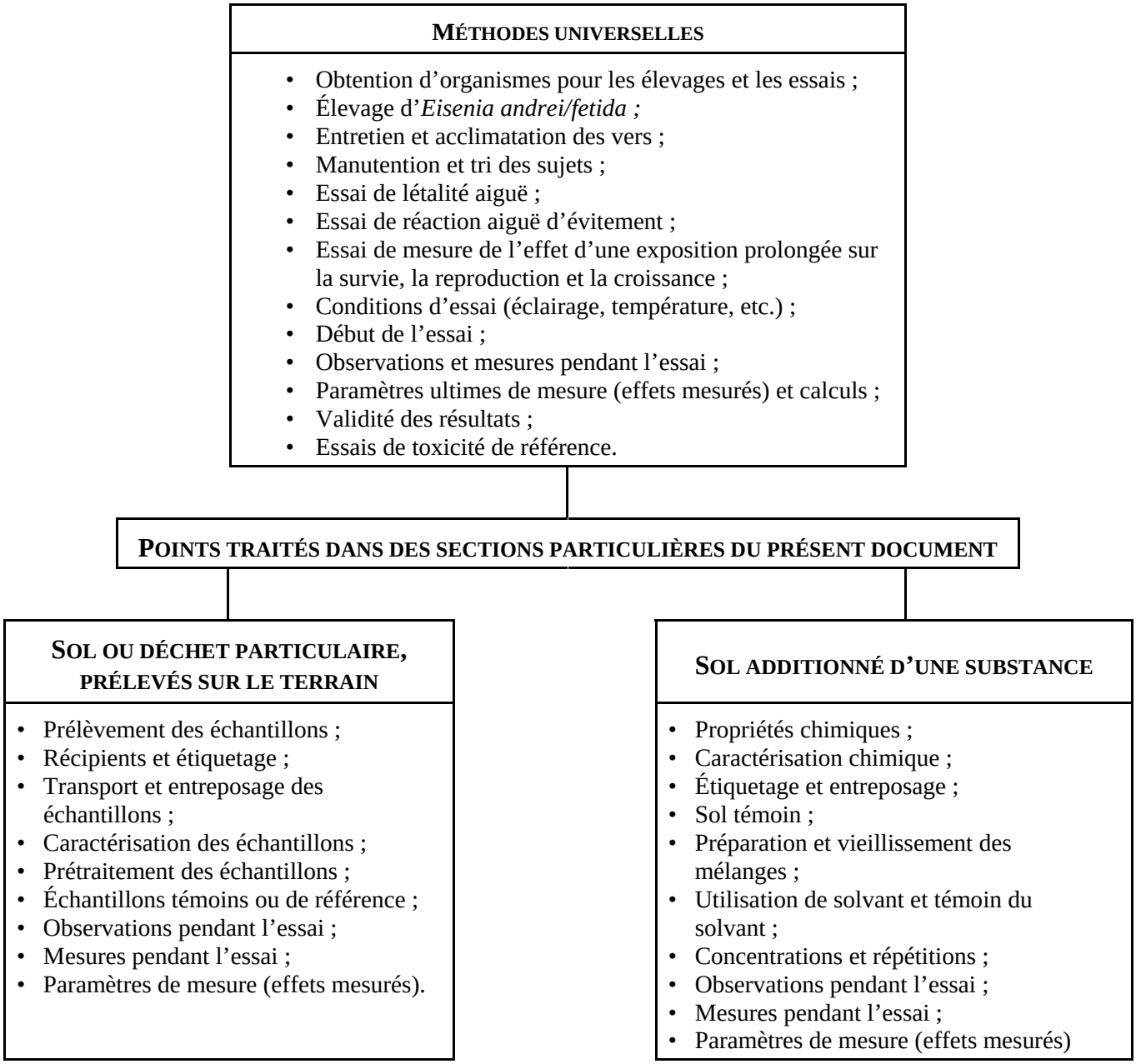


Figure 1. — Points à considérer dans les préparatifs et l'exécution d'essais de toxicité des sols employant des vers de terre (*Eisenia* sp. ou *Lumbricus terrestris*) et divers types de matières ou de substances

constituent jusqu'à 92 % de la *biomasse* des invertébrés du sol et ils contribuent de façon importante au maintien de la structure du sol et du cycle des éléments nutritifs (Edwards et Lofty, 1977 ; Lee, 1985). En outre, ces vers et d'autres vers de terre représentent un élément important du régime alimentaire de nombreuses espèces d'oiseaux, de petits mammifères, de reptiles, d'amphibiens et d'invertébrés (Macdonald, 1983 ; Cooke *et al.*, 1992). Les vers de terre peuvent accumuler divers composés organiques et inorganiques qui pourraient (ou non) leur être nocifs (Edwards et Bohlen, 1992). Une modification importance de l'abondance des lombricidés pourrait avoir des effets écologiques fâcheux pour tout le système terrestre (ASTM, 1999b).

1.2.1 Eisenia andrei/fetida

Les vers *Eisenia andrei* et *E. fetida* sont souvent appelés *vers du fumier* (Aquaterra Environmental, 1998a). Les taxinomistes les distinguent avec difficulté, les caractères morphologiques seuls étant insuffisants à cet égard (Blakemore, R., VermEcology, Canberra, Australie, communication personnelle, 2000 ; Diehl, W.J., Département des sciences biologiques, U. d'État du Mississippi, Mississippi State, MS, communication personnelle, 2000). Cependant, les diagrammes électrophorétiques de certaines enzymes de ces deux espèces permettent une identification définitive[1] (Jaenike, 1982 ; Øien et Stenersen, 1984 ; McElroy et Diehl, 2001 ; McCann, 2004). Il semble maintenant que de nombreux chercheurs ont confondu *E. andrei* pour *E. fetida* (ou pour *E. fetida andrei*) dans une très grande partie des publications ayant paru jusqu'ici, *E. andrei* étant l'espèce jumelle trouvée le plus souvent dans les composts ou les élevages nord-américains de fournisseurs d'eisénies (Diehl, W.J., Département des sciences biologiques, U. d'État du Mississippi, Mississippi State, MS, communication personnelle, 2000 ; McCann, 2004).

Par le passé, certains ont qualifié *E. fetida* de « complexe d'espèces » (Bouché, 1992 ; Christensen et Mather, 1994). Des taxinomistes ont également décrit *E. fetida*/*andrei* comme ayant deux sous-espèces ou races morphologiquement semblables (c'est-à-dire *E. fetida fetida*, qui possède, sur ses segments, des bandes transversales, et *E. fetida andrei*, non rayé, mais d'une couleur rougeâtre panachée). Ce critère (désormais périmé) de classification a été adopté dans certaines méthodes d'essai biologique pour la mesure de la toxicité des sols à l'aide de vers de terre (OECD, 1984 ; ISO, 1993 ; ASTM, 1999b). Cependant, les taxinomistes considèrent désormais *E. andrei* et *E. fetida* comme des espèces distinctes, tout en reconnaissant que leurs caractéristiques morphologiques, notamment la couleur et les rayures ou bandes segmentaires, sont insuffisantes pour les distinguer avec certitude (Blakemore, R., VermEcology, Canberra, Australie, communication personnelle, 2000 ; Diehl, W.J., Département des sciences biologiques, U. d'État du Mississippi, Mississippi State, MS, communication personnelle, 2000). Dans des rapports plus récents sur les essais de toxicité de sols et dans les méthodes connexes, on a reconnu le caractère distinct des espèces *E. fetida* (ou *E. fetida fetida*) et *E. andrei* (ou *E. fetida andrei*) [Sheppard, 1988 ; ISO, 1991, 1998 ; OECD, 2000]. Cela est conforté par les résultats d'expériences récentes de croisement de ces deux espèces, qui ont permis de constater la production de cocons lors du croisement d'*E. fetida* et d'*E. andrei*, bien qu'aucun n'ait été viable (Ferreiro *et al.*, 2002). Les chercheurs qui utilisent *E. andrei* ou *E. fetida* dans des essais doivent préciser quelle espèce ils emploient effectivement d'après l'examen des diagrammes électrophorétiques [1] (ou d'autres essais moléculaires éprouvés, permettant de distinguer les deux espèces) ainsi que des critères reconnus de distinction taxinomiques (jusqu'au genre). Des personnes qualifiées devraient confirmer cette identification (v. § 2.1 et 7.1.2). Jusqu'ici les *Eisenia* typiquement utilisés dans les laboratoires canadiens pour les essais de toxicité des sols se sont révélés appartenir à l'espèce *E. andrei* (Diehl, W.J., Département des sciences biologiques, U. d'État du Mississippi, Mississippi State, MS, communication personnelle, 2000 ; McCann, 2004), bien que l'espèce ait été officiellement identifiée comme étant *E. fetida* (par ex. Aquaterra Environmental, 1998a ; Aquaterra Environmental et ESG, 2000 ; EC, 2000a, b).

Chez les producteurs nord-américains de compost, on trouve souvent des vers des espèces *Eisenia* (c'est-à-dire *E. andrei* ou *E. fetida*), qui sont vendus dans le commerce comme appâts de pêche (sous l'appellation de « red wigglers ») et pour le compostage (sous l'appellation de « vers de compost »). Les *adultes* de ces espèces mesurent en moyenne 35 à 130 mm de longueur, en moyenne 3 à 5 mm de diamètre, et comptent entre 80 et 110 segments. Dans la diagnose des deux espèces, on trouve comme termes communs un *prostomium épilobique*, le premier pore dorsal sur les segments 4/5 ou, parfois 5/6, et un *clitellum* sur les segments 24 à 32 (Reynolds, 1977). Les *tubercules de la puberté* se trouvent sur les segments 28 à 30. Les *soies* sont étroitement géminées, en présentant une variation caractéristique de leur répartition qui diffère de l'extrémité antérieure à la postérieure du ver. Des

---

1. En électrophorèse en gel d'amidon, le diagramme du polymorphisme de l'enzyme phosphoglucomutase permet de distinguer ces deux espèces jumelles. À *E. andrei* correspondent deux allèles (bandes) dont la bande homozygote lente possède une plus grande fréquence que la bande homozygote rapide, tandis qu'à *E. fetida* correspondent deux allèles différents dont la bande homozygote rapide est plus fréquente que la bande homozygote lente. Le diagramme du polymorphisme de l'enzyme mannose-phosphate-isomérase est également distinctif. Chez *E. andrei*, on en observe deux allèles, tandis que chez *E. fetida* il n'y en a qu'un, différent de ceux d'*E. andrei* (McElroy et Diehl, 2001; McCann, 2004).

tumescences génitales pourraient être présentes autour de n'importe lesquelles des soies des segments 9 à 12 du corps cylindrique, dont la couleur peut varier du rouge au pourpre en passant par le rouge foncé puis le rouge brunâtre, avec des bandes alternantes pigmentées de rouge-brun et des zones intersegmentaires non pigmentées jaunes (Reynolds, 1977). Les pores mâles portent habituellement de grosses *papilles* glandulaires sur le segment 15. Les canaux des deux paires de *spermathèques* s'ouvrent sur les segments 9/10 et 10/11. Sur les segments 9 à 12, on trouve quatre paires de *vésicules séminales*.

E. andrei/fetida sont indigènes de la région paléarctique, et on les trouve également en Europe, en Amérique du Nord et en Amérique du Sud, en Asie, en Afrique, en Islande et en Australasie (Reynolds, 1977). L'une de ces espèces grégaires ou les deux sont généralement associées aux activités anthropiques, et on les trouve généralement dans toute l'Amérique du Nord, dans les jardins, les tas de compost et les tas de fumier (Edwards et Lofty, 1977). Au Canada, on les a trouvées en Colombie-Britannique, en Alberta, en Ontario, au Québec, au Nouveau-Brunswick, en Nouvelle-Écosse et dans l'Île-du-Prince-Édouard (Reynolds, 1977 ; Clapperton, M.J., Direction générale de la recherche, Agriculture et Agroalimentaire Canada, Centre de recherches de Lethbridge, Lethbridge, Alberta, communication personnelle, 2000). Ces espèces jumelles préfèrent les sols humides, riches en *matière organique.* Elles se cantonnent généralement dans les couches supérieures du sol, et on les considère comme *épigées,* se nourrissant de façon sélective (en ingérant peu de sol) de la matière organique dispersée dans le sol (Wallwork, 1983). *E. andrei/fetida* tolèrent une large gamme de pH du sol (c'est-à-dire de 4 à 8) [Stephenson, 2002], bien qu'ils préfèrent les sols dont le pH se situe entre 7 et 8 (Edwards et Lofty, 1977).

La longévité de ces vers *(E. andrei/fetida)* serait de 4 à 5 années, bien que, le plus souvent, elle soit de 1 à 2 années (Reynolds, 1977). Leur reproduction est obligatoirement *sexuée,* bien que l'on ait signalé une reproduction uniparentale (Reynolds, 1977, 1995). *E. andrei/fetida* s'accouplent et rejettent leurs excréments sous terre. L'une de ces espèces ou les deux se reproduisent rapidement dans la gamme de températures de 20 à 25 °C et elles peuvent atteindre la maturité sexuelle en moins de 52 jours. Le cycle de reproduction est sensiblement plus long à de plus basses températures (par ex. >166 jours à 13 °C) [ASTM, 1999b]. Les *cocons* sont produits à la fréquence de 1 ou 2 à tous les 3 ou 4 jours ; chaque cocon peut donner au moins 6 jeunes vers, bien que l'on observe plus fréquemment 1 à 4 vers par cocon (Reinecke et Viljoen, 1991 ; Reinecke *et al.*, 1992 ; Edwards et Bohlen, 1996). Ces caractéristiques (c'est-à-dire production rapide de cocons, progéniture nombreuse, court cycle de reproduction, maturité sexuelle rapide) et le fait qu'*E. andrei/fetida* sont faciles à élever en laboratoire (v. annexe E) font de ces vers les espèces les plus utilisées pour les essais de reproduction des vers de terre (Aquaterra Environmental, 1998a).

Peu d'études ont porté sur la sensibilité relative de ces deux espèces apparentées à des échantillons de sol contaminé. Des essais parallèles en laboratoire, réalisés par Ingraldi *et al.* (2004), conformément au § 4.1.8, ont montré qu'*E. andrei* était quelque peu plus sensible qu'*E. fetida* à l'acide borique dans un sol artificiel, les CL 50 après 7 jours étant de 3 236 et de 4 365 mg/kg, respectivement, sans recouvrement des limites de confiance à 95 % de ces deux valeurs. De même, les résultats d'essais de mesure de la CL 50 après 14 j, effectués en même temps par ces chercheurs (conformément au § 4.1), qui ont exposé chacune des deux espèces à un échantillon de sol contaminé par un condensat et mélangé à un loam argileux non contaminé, ont révélé la sensibilité quelque peu plus grande d'*E. andrei*. Des essais d'une durée de 48 h de comparaison de la réaction d'évitement à de multiples concentrations du même sol contaminé par un condensat, puis mélangé à un loam argileux non contaminé, effectués conformément au § 4.2, ont également révélé la réaction plus sensible d'*E. andrei* au sol contaminé (Ingraldi *et al.*, 2004). C'est pourquoi ces deux espèces de vers ne devraient pas être employées de façon interchangeable (c'est-à-dire dans un élevage mixte) ni sans les distinguer l'une de l'autre dans les essais de toxicité des sols.

1.2.2 Lumbricus terrestris

Contrairement à celle des *Eisenia* spp., la taxinomie de ce lombricidé est simple et très peu controversée. Les adultes mesurent en moyenne 90 à 300 mm de longueur, pour un diamètre moyen de 6 à 10 mm, et leur corps compte entre 120 et 160 segments. Dans la diagnose figurent notamment les caractères suivants : un *prostomium tanylobique,* un premier pore dorsal sur le segment 7/8 et le clitellum sur les segments 21 à 27. Les tubercules de la puberté se trouvent sur les segments 23 à 36. Les soies

sont robustes et géminées, mais fortement divergentes, dans les régions caudale et céphalique, et étroitement géminées et plus petites dans les régions médianes. Le corps est cylindrique et, dans sa partie postérieure, il est fortement comprimé dorsoventralement. La face dorsale est fortement pigmentée de rouge brunâtre, tandis que la face ventrale est orange jaunâtre. Le pore génital femelle est situé sur le segment 13. Il est habituellement accompagné de tumescences génitales. Les pores mâles sont situés sur les segments 14 à 16, avec de grosses papilles glandulaires saillantes. On observe trois paires de vésicules séminales sur les segments 9, 11 et 12/13. La spermathèque possède deux paires de canaux courts débouchant aux segments 9/10 et 10/11 (Reynolds, 1977).

Paléarctique, *L. terrestris* a été trouvé en Europe, en Islande, en Amérique du Nord, en Sibérie, en Afrique du Sud et en Australasie (Reynolds, 1977). Au Canada, on le trouve dans la plupart des provinces, notamment la Colombie-Britannique, le Nouveau-Brunswick, Terre-Neuve, la Nouvelle-Écosse, l'Ontario, l'Île-du-Prince-Édouard et le Québec, mais on ne l'a encore identifié ni au Yukon ni dans les Territoires du Nord-Ouest ni dans le Nunavut (Reynolds, 1977 ; Clapperton, M.J., Direction générale de la recherche, Agriculture et Agroalimentaire Canada, Centre de recherches de Lethbridge, Lethbridge, Alberta, communication personnelle, 2000). *L. terrestris* habite divers types de sols et peut en tolérer une gamme assez importante de pH (c'est-à-dire de 4 à 8). Il fréquente de façon typique les pelouses, les herbages, les pâturages et les terrains de golf et il occupe généralement les champs soumis à la rotation blé-maïs-soja (Tomlin, 1995). L'espèce est rarement observée dans les régions forestières d'Amérique du Nord (Reynolds, 1977). Non grégaire, elle présente un comportement qui porte à croire qu'elle est territoriale pour ce qui concerne la quête de nourriture (Tomlin *et al.*, 1993). *Anécique*, l'espèce se nourrit de façon sélective de matières organiques trouvées à la surface du sol, tout en creusant de profondes galeries dans ce dernier. Les terriers verticaux, relativement permanents, de *L. terrestris* se distinguent par leurs parois souvent tapissées de cailloux, de terre mêlée de déjections et de matière organique provenant de la surface et entraînée dans les terriers. Bien que l'espèce laisse des turricules à la surface du sol, elle expulse souvent ses déjections sous terre.

L. terrestris s'accouple à la surface du sol. Sous les climats favorables, il s'accouple toute l'année, bien qu'une période de repos estivale et hivernale puisse lui être imposée par le climat, dans les régions tempérées de l'hémisphère nord (Reynolds, 1977). Ce gros ver, qui reste actif la plus grande partie de l'année sous les climats tempérés (Edwards et Bohlen, 1992), atteint la maturité sexuelle en 8 à 16 mois et se reproduit à un rythme relativement lent. Typiquement, il produit de 3 à 13 cocons par année, lesquels, en moyenne, donneront 3 *jeunes* par cocon (Wallwork, 1983) ; la croissance est optimale aux environs de 10 °C (Edwards et Lofty, 1977). La longévité de *L. terrestris* serait d'environ 6,5 ans (Fox, 2000). Cette espèce se multiplie avec peine en laboratoire (Edwards et Bohlen, 1992), bien que l'on puisse y maintenir longtemps (c'est-à-dire nombre de mois) en bonne santé des vers capturés dans la nature.

1.3 Utilisation traditionnelle des vers de terre dans les essais de toxicité

Dans le sol, les vers de terre sont fréquemment exposés aux toxiques. Outre une myriade d'engrais, d'insecticides, d'herbicides et de fongicides employés en agriculture et dans des applications domestiques, ils sont parfois exposés à des métaux lourds, à des hydrocarbures pétroliers et à d'autres matières chimiques telles que les agents de conservation du bois (par ex. le pentachlorophénol) ou aux composés explosifs à cycle(s) aromatique(s) nitré(s).

Les vers de terre sont utilisés à grande échelle dans les essais monospécifiques de laboratoire visant à mesurer la toxicité de substances pures, de produits chimiques ou d'échantillons de sols prélevés sur le terrain, effectivement ou potentiellement contaminés par des substances chimiques ou contaminés en laboratoire (à des fins expérimentales). On connaît la toxicité de diverses substances ou de divers produits chimiques pour les vers de terre, qui a été déterminée au laboratoire dans des conditions normalisées, mesurée par des effets létaux et/ou sublétaux, par des expositions de courte durée (heures ou quelques jours) ou de longue durée (plusieurs semaines) [Heimbach, 1984 ; Neuhauser *et al.*, 1985, 1986 ; van Gestel, 1991 ; Edwards et Bohlen, 1992 ; Heimbach, 1993 ; Callahan *et al.*, 1994 ; Leon et van Gestel, 1994]. La plupart des études dont il est question dans ces rapports concernent des essais de détermination de la létalité aiguë (*CL 50*), avec exposition de 14 jours ou moins. Edwards et Bohlen (1992) ont évalué diverses réactions à des concentrations létales et sublétales de substances ou de

produits chimiques signalés pour les essais de toxicité en laboratoire comportant des expositions de courte ou de longue durée (*« effets chroniques »*)[2].

De plus en plus au Canada et ailleurs, on recourt à des essais de toxicité employant des vers de terre comme outils d'évaluation écotoxicologique de la toxicité de *sols d'emplacements à l'étude*, effectivement ou potentiellement contaminés (Callahan, 1988 ; Menzie *et al.*, 1992 ; Römbke *et al.*, 1994 ; Kula et Larink, 1997 ; Spurgeon *et al.*, 1994 ; Spurgeon et Hopkin, 1995, 1996a ; Yeardley *et al*., 1996 ; Chang *et al.*, 1997 ; Meier *et al.*, 1997 ; Stephenson *et al.*, 1997 ; Aquaterra Environmental, 1998a ; Saterbak *et al.*, 1999 ; Stephenson *et al.*, 2002 ; Stephenson, 2003a). Les études comparant les résultats d'essais monospécifiques, effectués en laboratoire, et les résultats d'enquêtes de terrain sur les effets subis par les organismes terrestres ont généralement constaté une forte corrélation entre les résultats obtenus en laboratoire et ceux du terrain (Edwards et Bohlen, 1992 ; Kula et Kokta, 1992 ; Menzie *et al.*, 1992 ; van Gestel, 1992, 1997 ; Heimbach, 1993, 1997 ; Christensen et Mather, 1994 ; Kula, 1995). Cependant, les scientifiques ont souvent affirmé qu'il est difficile d'extrapoler aux terrain les résultats d'essais en laboratoire, monospécifiques employant des vers de terre. Un certain nombre de chercheurs ont discuté de la façon d'améliorer la valeur prédictive des essais en laboratoire (c'est-à-dire de la capacité de discerner par ce moyen les conditions ou effets environnementaux défavorables). Constituent notamment des améliorations prometteuses les modes opératoires fiables permettant d'estimer la biodisponibilité des contaminants inorganiques et organiques dans le sol, les stratégies d'essai étagées et les plans d'évaluation des *risques* découlant de la toxicité des sols qui englobent des essais de toxicité employant des vers de terre (Bouché, 1988 ; Callahan, 1988 ; Lofs-Holmin et Bostrom 1988 ; Keddy *et al.*, 1995 ; NERI, 1993 ; Leon et van Gestel, 1994 ; Christensen et Mather, 1994 ; Sauvé *et al.*, 1996, 1998, 2000 ; Barber *et al.*, 1997 ; Meier *et al.*, 1997 ; Saterbak *et al.*, 1999 ; Conder et Lanno, 2000 ; Wells et Lanno, 2001).

Un certain nombre de chercheurs ont étudié les effets des variations des caractéristiques naturelles du *sol d'un emplacement à l'étude* ou d'un *sol additionné de substance chimique* sur la toxicité de ce sol pour les vers de terre. Les variables qu'ils ont examinées sont notamment le pH du sol, sa teneur en carbone organique, sa granulométrie et son humidité (Heimbach et Edwards, 1983 ; van Gestel et van Dis, 1988 ; van Gestel, 1991 ; Christensen et Mather, 1994 ; Spurgeon et Hopkin, 1996b ; Yeardley *et al.*, 1996 ; Bauer et Römbke, 1997 ; Puurtinen et Martikainen, 1997 ; Meharg *et al.*, 1998 ; Aquaterra Environmental et ESG, 2000). L'influence de ces variables du sol sur la toxicité chimique dépend des interactions entre les caractéristiques physicochimiques du sol et le ou les types et espèces de contaminants qui s'y trouvent.

On a utilisé diverses méthodes d'essai pour mesurer la toxicité létale aiguë de substances chimiques pour les vers de terre en laboratoire (v. § 1.3.1). Les essais qui permettent de mesurer en laboratoire les effets d'un *sol contaminé* sur le comportement des vers de terre sont de plus en plus utilisés (v. § 1.3.2), tout comme les essais permettant de mesurer les effets d'expositions prolongées de vers de terre sur leur survie, leur reproduction et leur croissance (v. § 1.3.3). Des chercheurs ont également étudié et examiné d'autres effets sublétaux (par ex. sur la gamétogenèse, la tératogenèse, la neurotoxicité, l'immunotoxicité) de sols contaminés par des substances chimiques sur les vers de terre (Drewes *et al.*, 1984 ; Zoran *et al.*, 1986 ; Edwards et Bohlen, 1992 ; Fitzpatrick *et al.*, 1992 ; Cikutovic *et al.*, 1993 ; Goven *et al.*, 1993, 1994 ; Christensen et Mather, 1994 ; Suzuki *et al.*, 1995 ; Brousseau *et al.*, 1997 ; Giggleman *et al.*, 1998 ; Scott-Fordsmand *et al.*, 2000).

1.3.1 Essais de létalité aiguë

On a eu recours à un certain nombre de méthodes de laboratoire pour mesurer la *toxicité aiguë* de substances ou produits chimiques particuliers pour les vers de terre, notamment les suivantes (Edwards et Bohlen, 1992) :

- **essais d'immersion :** on immerge des groupes de vers de terre, pendant une durée déterminée, dans une série de dilutions ;
- **essais d'application locale :** on applique des substances

2. Dans le présent document, *chronique* est défini comme se manifestant pendant une période relativement longue, qui représente habituellement une fraction importante de la longévité de l'organisme (par ex. 10 % ou plus). Comme la longévité des eisénies peut atteindre 4 à 5 ans (Reynolds, 1977 ; § 1.2.1), l'essai de mesure des effets d'une exposition prolongée d'une durée de 8 semaines, défini dans le § 4.3, ne correspond pas à cette définition. Néanmoins, cet essai vise à estimer, approximativement, ce que la *toxicité chronique* pourrait être.

sur le corps de vers de terre, au pinceau ou au microapplicateur, et on observe le taux de mortalité postérieur au traitement ;

- **essais d'injection :** on injecte des substances en solutions dans le cœlome de vers de terre que l'on garde dans le sol et chez lesquels on évalue les taux de mortalité ultérieurs ;
- **essais de gavage :** on injecte dans l'œsophage de vers de terre des substances à l'étude, en suspension dans la gélose, après quoi on dépose les vers sur du papier humidifié, pour observer leur taux de mortalité ultérieur ;
- **essais d'alimentation à volonté :** on offre à manger aux vers de terre des aliments contaminés par une substance, après quoi on observe leur taux de mortalité ;
- **essais de contact au moyen de papiers filtres :** on traite des papiers filtres ordinaires avec une série de dilutions de la substance à l'étude, après quoi on expose des vers aux filtres conservés dans des fioles (un par fiole) pendant une période déterminée (typiquement 48 ou 72 h ; OECD, 1984) ;
- **essais dans l'« artisol » :** on applique des substances à une matrice de silice que l'on humidifie ensuite et met en suspension dans des billes de verre, après quoi on y expose des groupes de vers de terre pendant 14 jours pour mesurer leurs taux de mortalité ;
- **essais en entonnoirs :** dans des entonnoirs remplis de sol, on dépose des vers de terre, à raison d'un par entonnoir, qui y creusent leurs terriers. On ajoute ensuite, à la surface du sol, des substances chimiques, puis on observe la mortalité des vers ainsi que les *effets sublétaux* sur leur croissance ;
- **essais en sol artificiel :** on prépare un sol artificiel normalisé et on y mélange une série de dilutions de la substance ou des substances à l'étude (*enrichissement*), après quoi on met en contact un groupe de vers de terre avec chaque mélange, dans une enceinte expérimentale, et on observe leur taux de mortalité après 7 et/ou 14 jours ;
- **essais en sol naturel :** on ajoute à un sol naturel *non contaminé* une série de dilutions de la substance ou des substances à l'étude, après quoi on met en contact un groupe de vers avec chaque mélange, dans une enceinte expérimentale, puis on observe les taux de mortalité après 7 et/ou 14 jours.

Les avantages et les inconvénients de ces diverses approches de la mesure de la toxicité aiguë de substances chimiques pour les vers de terre ont été évalués et comparés (Heimbach, 1984, 1985, 1988 ; Neuhauser *et al.*, 1986 ; van Gestel et van Dis, 1988 ; Edwards et Bohlen, 1992 ; ESP, 1992 ; Römbke *et al.*, 1992 ; Callahan *et al.*, 1994 ; Christensen et Mather, 1994 ; Leon et van Gestel, 1994 ; Robidoux *et al.*, 1999). Des chercheurs ont proposé ou appliqué des modifications à ces méthodes de mesure de la toxicité aiguë de substances chimiques ou de *sols à l'étude* (par ex. Karnak et Hamelink, 1982 ; Fitzpatrick *et al.*, 1992 ; Sheppard et Evenden, 1992 ; Giggleman *et al.*, 1998).

Dans l'annexe F, on résume les modes opératoires et les conditions recommandés, par le passé ou actuellement, par divers organismes pour mesurer la toxicité létale aiguë, pour les vers de terre, d'échantillons de sol contaminé par une ou des substances ou produits chimiques. Certaines de ces méthodes (c'est-à-dire OECD, 1984 ; ISO, 1993) visent explicitement à mesurer la toxicité aiguë de substances chimiques précises, ajoutées en *concentrations* sérielles à un sol artificiel. D'autres visent à mesurer la toxicité létale aiguë d'échantillons de *sol d'un emplacement à l'étude* effectivement ou potentiellement contaminé, bien que ces méthodes (et leurs modifications appropriées) puissent également servir à l'égard de substances additionnées au sol (c'est-à-dire USEPA, 1989 ; EC, 2000b). L'ASTM (1999b) offre un guide normalisé, que l'on peut appliquer soit à un *sol additionné d'une substance* soit à un *sol d'un emplacement à l'étude*, pour déterminer expérimentalement la toxicité létale aiguë du sol pour les vers de terre. Chacune de ces méthodes d'essai biologique, dont les modes opératoires et les conditions sont résumées dans l'annexe F, utilise comme organisme *E. andrei/fetida* et dure 14 jours. On s'est inspiré de ces méthodes dans l'élaboration de la méthode d'essai biologique normalisée d'Environnement Canada pour la mesure la létalité aiguë d'échantillons de *sol additionné d'une substance* ou de *sol d'un emplacement à l'étude* (v. § 4.1).

1.3.2 Essais de réaction aiguë d'évitement

On sait que les lombricidés, *L. terrestris* et *Eisenia* spp. notamment, sont très mobiles (Karnak et Hamelink, 1982 ; Mather et Christensen, 1992). Des chercheurs ont conclu à la pertinence écologique, à l'échelle de la population, d'une réaction comportementale d'évitement manifesté par les vers de terre à l'égard de concentrations sublétales de

substances chimiques dans le sol (Christensen et Mather, 1994 ; Tomlin, 1995 ; Yeardley *et al.*, 1996). Des observations portent à croire que ces invertébrés terrestres et d'autres sont capables de réduire au minimum leur exposition à des substances nocives, grâce à ce comportement (Yeardley *et al.*, 1996 ; Haimi et Paavola, 1998). Christensen et Mather (1994) ont examiné l'emploi de vers de terre pour évaluer les dangers que présentent des substances chimiques, dans le cadre d'*évaluations des risques écologiques* pour l'agence danoise de protection de l'environnement. Ils ont conclu que, du point de vue écologique, à l'échelle de la population, les essais de toxicité qui mesuraient les effets sur le comportement migratoire (réaction de phobie) faisaient partie des essais que l'on considérait comme permettant de mesurer des effets « idéals » et ils en ont recommandé l'application. Les avantages des essais de réaction d'évitement sont leur courte durée (par rapport aux essais de létalité d'une durée de 14 jours et aux essais plus longs cherchant à mesurer les effets sur la reproduction et/ou la croissance) et leur sensibilité (c'est-à-dire leur capacité de déceler une réaction comportementale à des concentrations sublétales). Les vers exposés à un sol contaminé manifestent de façon typique une réaction d'évitement à des concentrations sublétales en 24 à 72 h (Wentsel et Guelta, 1988 ; Yeardley *et al.*, 1996 ; Slimak, 1997 ; Hund, 1998 ; Stephenson *et al.*, 1998 ; Hund-Rinke et Wiechering, 2001 ; ESG et Aquaterra Environmental, 2002 ; Schaefer, 2003, Stephenson, 2003a).

Les essais en laboratoire permettant de mesurer la réaction aiguë d'évitement sont particulièrement utiles, du point de vue écologique, lorsqu'ils sont effectués conjointement avec des essais de toxicité normalisés tels que ceux qui permettent de mesurer les effets létaux ou sublétaux sur la croissance et/ou la reproduction. Le manque de pertinence écologique des constatations découlant d'un essai de réaction aiguë d'évitement, faute de résultats comparables de tels essais normalisés de toxicité, pourrait engendrer des résultats déroutants ou douteux, puisque les vers pourraient éviter des concentrations de contaminants qui ne sont pas préjudiciables pour leurs tissus ou pourraient ne pas éviter des concentrations qui le sont.

Les appareils et les modes opératoires utilisés pour mesurer le comportement d'évitement des vers de terre à l'égard d'un sol contaminé ont été variés, et on n'a pas tenté, à l'échelle internationale, d'élaborer une méthode normalisée d'essai portant sur ce comportement. À l'aide d'une série d'enceintes rectangulaires, Wentsel et Guelta (1988) ont constaté que *L. terrestris* évitait un sol contaminé par de la poudre de laiton à des concentrations sublétales inférieures à celle qui provoquaient une perte de poids chez les adultes. Dans des essais en enceintes circulaires, Yeardley *et al.* (1996) ont constaté qu'*E. andrei/fetida* évitait en 1 à 2 jours d'exposition à peine des concentrations sublétales de sols additionnés d'une substance ou de sols d'emplacements à l'étude. Slimak (1997) a signalé que *L. terrestris* évitait les concentrations sublétales de plusieurs pesticides. Haimi et Paavola (1998) ont signalé une réaction d'évitement chez des vers de terre (*Aporrectodea tuberculata*) lorsque ceux-ci se trouvaient dans des pots contenant un sol additionné localement de pentachlorophénol et *non contaminé* ailleurs. À l'aide du plan d'expérience de Yeardley *et al.* (1996), Hund (1998) a signalé une réaction d'évitement chez un ver de terre (espèce non précisée) à l'égard de contaminants organiques se trouvant à des concentrations seuils semblables à celles qui agissaient sur la fonction de reproduction, dans des essais d'une durée de 56 jours. Yeardley *et al.* (1996) et Hund (1998) ont considéré comme minime la confusion due aux caractéristiques physicochimiques différentes des sols (par ex. la compacité, la granulométrie, la teneur en carbone organique).

Au cours des sept dernières années, un certain nombre d'études ont visé à élaborer et à normaliser les essais de mesure de la réaction aiguë d'évitement, pour la détermination de la toxicité des sols (§ 4.2). L'appareillage expérimental utilisé est représenté photographiquement dans Stephenson *et al.* (1998) et schématiquement dans le § 3.1.3 (la figure 2). Dans les études initiales (Stephenson *et al.*, 1998 ; Aquaterra Environmental, 1998a) utilisant *L. terrestris*, on a constaté que les vers à qui on donnait à choisir entre un sol naturel non contaminé et un sol artificiel non contaminé préféraient manifestement le sol naturel. Des essais ultérieurs avec *L. terrestris* ou *E. andrei* à qui on a donné le choix entre un sol *non contaminé* (naturel ou artificiel) qui avait été autoclavé ou ne l'avait pas été ont montré que, chaque fois, chaque espèce préférait le sol non autoclavé. Des essais de réaction aiguë (c'est-à-dire de 24 ou de 72 h) d'évitement employant *L. terrestris* ou *E. andrei* à qui on donnait à choisir entre un *sol témoin négatif* (naturel ou artificiel) et diverses concentrations d'un sol d'un emplacement contaminé par un condensat dilué avec le sol témoin négatif respectif ont révélé une

réaction d'évitement proportionnel à la concentration, aux concentrations sublétales. Des essais connexes d'exposition prolongée d'*E. andrei* au même échantillon de sol d'un emplacement contaminé par un condensat ont montré que la concentration seuil évitée par l'espèce était semblable à la concentration seuil qui réduisait la réussite de la reproduction et ralentissait ultérieurement la croissance de la progéniture. *L. terrestris* était quelque peu plus sensible qu'*E. andrei* au sol contaminé par le condensat ou au chlorure de potassium (toxique de référence), bien que le délai de manifestation de la réaction d'évitement par *L. terrestris* ait été plus long (Stephenson *et al.*, 1998 ; Aquaterra Environmental, 1998a). On a obtenu des résultats semblables avec le sol d'un emplacement contaminé par des amines et des produits du glycol : les vers ont évité les concentrations sublétales qui, dans le sol, entraînaient des effets indésirables sur leur reproduction (Aquaterra Environmental, 1998a ; Stephenson, 2003a).

Aquaterra Environmental et ESG (2000) ont réalisé des essais de réaction aiguë (72 h) d'évitement et des essais de létalité d'une durée de 14 jours avec *L. terrestris* ou *E. andrei* exposés à une gamme de concentrations de cuivre (sous la forme de sulfate) additionnées à chacun des trois sols naturels *non contaminés* qui différaient par leur teneur en sables, en limons et en argiles. Chaque fois, on a constaté une réaction d'évitement proportionnelle à la concentration. Des essais connexes d'une durée de 64 jours pour la mesure des effets à long terme (c'est-à-dire mortalité, inhibition de la reproduction et/ou inhibition de la croissance) d'un sol additionné de cuivre chez *E. andrei* ont montré que, pour le même mélange de cuivre et de sol, les concentrations seuils qui diminuaient la réussite de la reproduction ou la croissance ultérieure de leur progéniture étaient semblables à la concentration seuil qui provoquait une réaction aiguë (72 h) d'évitement. On a observé des résultats semblables à la suite d'essais avec le fongicide bénomyl (poudre mouillable). Après 72 h, *E. andrei* a évité les concentrations sublétales de bénomyl dans les sols artificiels et les sols prélevés sur le terrain qui étaient semblables aux concentrations seuils qui correspondaient à des effets indésirables sur la reproduction (Elshayeb *et al.*, 2001 ; Feisthauer *et al.*, 2001 ; Stephenson, 2003a).

Dans le § 4.2, on définit les modes opératoires et les conditions normalisées de réalisation d'une méthode d'essai biologique mesurant la réaction aiguë d'évitement d'un *sol additionné d'une substance* ou d'un *sol d'un emplacement à l'étude* par des vers de terre (*L. terrestris*, *E. andrei* ou *E. fetida*).

1.3.3 Essais pour mesurer les effets d'une exposition prolongée sur la survie, la reproduction et la croissance

Les effets d'une exposition prolongée d'une espèce à des substances ou matières toxiques sur sa survie, sa reproduction et sa croissance, dans les conditions contrôlées de laboratoires, sont reconnus et acceptés par les écotoxicologues comme des réactions *écologiquement pertinentes.* Du point de vue écologique, ces effets biologiques sont idéals pour les essais de toxicité en laboratoire employant des vers de terre (Christensen et Mather,1994). Christensen et Mather (1994) ont recommandé l'inclusion de ces essais dans un protocole d'évaluation après leur examen de l'emploi des vers de terre pour l'évaluation du risque écologique que présentaient les toxiques dans le sol.

En 1988, on a entrepris, à l'échelle internationale, l'élaboration et la normalisation des essais de mesure des effets de l'exposition à long terme aux contaminants du sol sur la survie, la reproduction et la croissance des vers de terre (van Gestel *et al.*, 1988). On a élaboré un certain nombre de méthodes ou de lignes directrices normalisées qui employaient *E. andrei/fetida* ; couramment appliquées, ces méthodes sont de plus en plus utilisées.

E. andrei/*fetida* est un organisme recherché pour l'étude des effets de l'exposition prolongée à des contaminants sur la survie, la reproduction et la croissance des vers de terre, en raison des connaissances et de l'expérience répandues dans l'élevage de cette espèce (v. annexe E), de son cycle reproductif court (par rapport à celui d'autres vers de terre tels que *L. terrestris*), de son aire de répartition internationale et de son utilisation fréquente dans les essais de létalité aiguë (v. § 1.3.1 et annexe F). La biologie du de son développement, de sa croissance et de sa reproduction en laboratoire a été largement étudiée et elle est bien connue (par ex. Edwards et Lofty, 1977 ; Tsukamoto et Watanabe, 1977 ; Sheppard, 1988 ; van Gestel *et al.*, 1992a). Les effets toxiques de son exposition prolongée à un sol contaminé sur sa survie, sa reproduction et/ou sa croissance ont été consignés dans des études en laboratoire ayant porté sur :

- des échantillons de sol additionné de pesticides ou contaminés par ces derniers (Lofs-Holmin, 1980 ; Venter et Reinecke, 1988 ; Neuhauser et Callahan,

1990 ; van Gestel *et al.*, 1992b ; Riepert et Kula, 1996 ; Bauer et Römbke, 1997 ; Heimbach, 1997 ; Kula et Larink, 1997 ; ESG et Aquaterra Environmental, 2002) ;

- des métaux lourds (Neuhauser *et al.*, 1984 ; van Gestel *et al.*, 1989, 1992b ; Spurgeon *et al.*, 1994 ; Reinecke et Reinecke, 1996 ; Spurgeon et Hopkin, 1996a ; Fischer et Molnar, 1997 ; Kula et Larink, 1997 ; Aquaterra Environmental et ESG, 2000 ; Scott-Fordsmand *et al.*, 2000 ; ESG, 2002) ;
- des hydrocarbures pétroliers (Aquaterra Environmental, 1998a ; Stephenson *et al.*, 1998, 1999a, b, 2000a ; ESG, 2001) ;
- d'autres produits chimiques, y compris des toxiques de référence (Hartenstein, 1982 ; van Gestel *et al.*, 1989, 1992b ; Neuhauser et Callahan, 1990 ; Gibbs *et al.*, 1996 ; Aquaterra Environmental, 1998a ; Robidoux *et al.*, 2000, 2001).

Dans leurs premiers efforts pour mettre au point une méthode d'essai normalisée pour la mesure des effets de substances chimiques sur la reproduction d'*E. andrei/fetida*, van Gestel *et al.* (1988) ont effectué des études d'incubation d'une durée de 5 semaines qui ont permis de mesurer la viabilité des cocons et le nombre de jeunes éclos par cocon, après récupération des cocons produits au cours d'études antérieures sur l'exposition de vers de terre adultes à des substances, puis leur incubation dans l'eau ou dans un sol artificiel. Ensuite, van Gestel *et al.* (1989) ont décrit une méthode néerlandaise d'essai en vertu de laquelle on habituait des adultes d'*E. andrei/fetida* pendant une semaine à un sol artificiel, après quoi on les exposait à une série de concentrations de substances chimiques dans un sol artificiel puis on faisait incuber les cocons produits pendant encore 5 semaines dans un sol artificiel non traité, afin d'évaluer leur éclosabilité. Cette méthode néerlandaise a été soumise à l'examen de l'Organisation internationale de normalisation (ISO) pour servir de méthode normalisée d'essai pour la mesure de la toxicité des sols (ISO, 1991 ; v. annexe G pour connaître les particularités de l'essai).

En 1990, un groupe de travail allemand créé par le *Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft* (BBA) [Centre fédéral de recherche biologique pour l'agriculture et la foresterie] auquel s'étaient joints des spécialistes néerlandais et suisses a mis au point une méthode d'essai légèrement différente, en vertu de laquelle on expose des adultes d'*E. andrei/fetida* à un sol artificiel additionné d'un produit chimique pendant 4 semaines. Ensuite, on retire les vers de ce milieu et on maintient l'exposition de leur progéniture pendant encore 4 semaines. En 1990, l'Allemagne a présenté cette méthode de la BBA, à l'état d'ébauche, au groupe de travail « Faune du sol » (WG 2) de l'ISO. Le BBA (1994) l'a ensuite publiée en tant que ligne directrice pour l'essai de toxicité des pesticides. Après évaluation et prise en considération par d'autres scientifiques, l'ISO (1998) a publié une version modifiée de la méthode du BBA (1994). La méthode normalisée, publiée par l'ISO (1998), consiste à exposer pendant 4 semaines des adultes d'*E. andrei/fetida* à une série de concentrations de sol additionné d'une substance, en les observant (taux de survie des adultes ou gain ou diminution de leur poids frais) puis à exposer pendant 4 semaines leur progéniture au même sol, le paramètre mesuré à la fin de l'essai étant le nombre de jeunes engendrés à chaque *variante expérimentale* éprouvée (v. annexe G).

L'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE = OECD) fait actuellement circuler l'ébauche d'une méthode semblable (OECD, 2000 ; v. annexe G pour en connaître les particularités), pour obtenir les observations et les commentaires des scientifiques informés. Un essai plus rapide (28 jours), limité à la détermination de la survie et de la modification de poids d'adultes d'*E. andrei/fetida* pendant l'exposition a été rédigé (USEPA, 1996) et appliqué (Gibbs *et al.*, 1996) en tant que méthode d'un bon rapport coûts/efficacité pour le dépistage d'échantillons de sol contaminé. Cette méthode abrégée est cependant peu utilisée, parce qu'elle ne permet pas de mesurer les effets sur la reproduction des vers de terre et sur la survie ainsi que la croissance de leur progéniture.

On expose dans le présent document (v. § 4.3) les modes opératoires et les conditions normalisées d'une méthode d'essai biologique mesurant les effets toxiques de l'exposition prolongée d'*E. andrei* à un sol additionné d'une substance ou au sol d'un emplacement à l'étude, sur la survie, la reproduction et la croissance de ce ver. Cette méthode d'essai biologique a beaucoup de points communs avec les méthodes de l'ISO (1998) et de l'OECD (2000).

Organismes d'expérience

2.1 Espèces et stade de leur développement

L'essai de létalité aiguë (§ 4.1) et l'essai de réaction aiguë d'évitement (§ 4.2) peuvent employer les vers *Eisenia andrei*, *Eisenia fetida* ou *Lumbricus terrestris*. Pour l'essai d'une durée de 8 semaines portant sur la survie, la reproduction et la croissance (§ 4.3), il faut n'utiliser que l'espèce *E. andrei* élevée en laboratoire (§ 2.3).

Dans l'essai de létalité aiguë, on peut utiliser des vers *adultes* ou *subadultes* à condition que, au début de l'essai, le poids frais de chaque ver se situe entre 250 et 600 mg, dans le cas d'*E. andrei/fetida*, ou entre 3 et 10 g, dans le cas de *L. terrestris* (v. § 4.1.1). For l'essai de réaction aiguë d'évitement, le poids frais de chaque ver adulte doit, au début de l'essai, se situer entre 250 et 600 mg, dans le cas d'*E. andrei*, 250 et 800 mg, dans le cas d'*E. fetida*, ou 3 et 10 g, dans le cas de *L. terrestris* (v. § 4.2.1). Pour l'essai d'une durée de 8 semaines de mesure des effets sur la survie, la reproduction et la croissance d'*E. andrei*, le poids frais de chaque ver adulte doit, au début de l'essai, se situer entre 250 à 600 mg (v. § 4.3.1).

L'identification, la répartition et le cycle reproductif d'*E. andrei/fetida* et de *L. terrestris* sont résumés au § 1.2. L'identification de l'espèce doit être confirmée et attestée par écrit par des personnes compétentes, expérimentées dans l'identification des espèces visées (v. § 1.2) de vers de terre que l'on se propose d'utiliser dans l'essai de toxicité[3]. Tous les deux ans au moins, on devrait identifier, jusqu'au niveau de l'espèce, les élevages d'*Eisenia* sp. gardés longtemps dans un laboratoire d'essais.

2.2 Sources

Les sources d'*E. andrei/fetida* peuvent être des laboratoires de l'État ou des laboratoires privés, qui font l'élevage de cette espèce, ou, encore, un fournisseur du commerce (v. McCann, 2004, pour une liste de sources possibles). Si on utilise *E. andrei* ou *E. fetida* pour un essai de létalité aiguë (§ 4.1) ou un essai de réaction aiguë d'évitement (§ 4.2), on peut élever les vers au laboratoire (v. § 2.3) ou les obtenir d'*élevages* de l'extérieur ou de fournisseurs du commerce et les acclimater aux conditions régnant dans le laboratoire (§ 2.4) avant d'entreprendre l'essai[4, 5]. Si *E. andrei* est employé dans un essai d'une durée de 8 semaines pour la mesure des effets sur la survie, la reproduction et la croissance (§ 4.3), il doit provenir d'élevages de laboratoire (v. § 1.2.1 et 2.3). Lorsque l'on crée des élevages d'*E. andrei* ou d'*E. fetida*, il est recommandé d'obtenir des cocons (plutôt que des jeunes ou des adultes) pour normaliser l'âge et le poids de chaque ver dans l'élevage.

Les *L. terrestris* peuvent provenir de laboratoires publics ou privés conservant des populations de cette espèce ou

3. Pour distinguer *E. andrei* et *E. fetida* (v. § 1.2.1), on peut utiliser les diagrammes électrophorétiques (électrophorégrammes) de certaines enzymes. Le personnel de laboratoire cherchant à obtenir des conseils sur l'identification et la confirmation des espèces pourrait souhaiter contacter les personnes suivantes : Dr W. Diehl, Département des sciences biologiques, U. de l'État du Mississippi, 130 Harned Hall, Lee Boulevard, Mississippi State, MS 39762 ; tél. : (662) 325-7576; courriel : wdiehl@biology.msstate.edu ; et/ou J.I. Princz; Division des méthodes biologiques, Environnement Canada, Ottawa, K1A 0H3 ; tél. : (613) 990-9544 ; téléc. : (613) 990-0173 ; courriel : Juliska.Princz@ec.gc.ca.

4. Les chercheurs pourraient être préoccupés par les effets d'une consanguinité excessive des élevages de laboratoire ou ils pourraient souhaiter utiliser la progéniture d'organismes ayant vécu dans une localité particulière. En conséquence, on peut également établir les élevages à partir de populations sauvages. Si les vers proviennent d'une population sauvage, on devrait confirmer leur taxinomie et évaluer leur sensibilité ou celle de leur progéniture à un ou à des *toxiques de référence* avant de les utiliser dans des essais de toxicité.

5. On devrait éviter d'obtenir des populations sauvages d'*E. andrei/fetida* ou de *L. terrestris* adultes pour les utiliser dans des essais de toxicité (après leur *acclimatation* aux conditions du laboratoire ; v. § 2.4) à moins d'avoir confirmé leur taxinomie ou à moins que le lieu du prélèvement ne soit considéré comme *non contaminé*. Une exception (atypique) à cela est lorsque le chercheur veut utiliser des vers de terre ayant des antécédents d'exposition à un sol contaminé, auquel cas on devrait connaître ces antécédents et on devrait les expliciter. Idéalement, tout emplacement d'où proviennent des animaux devrait être réputé avoir été exempt de toute application ou de toute source de pesticides ou d'engrais durant les cinq dernières années au moins.

d'un fournisseur du commerce. Cette espèce est extrêmement difficile à reproduire en élevage, et son faible taux de reproduction ainsi que son développement lent empêchent son élevage en masse (§ 1.2.2 ; Edwards et Bohlen, 1992 ; Edwards, C.A., Département d'entomologie, U. d'État de l'Ohio, Columbus, OH, communication personnelle, 2001). En conséquence, les essais de toxicité l'employant ont typiquement besoin de sujets capturés sur le terrain comme source des organismes d'expérience. Tout ver capturé sur le terrain pour être employé dans des essais de toxicité, qu'il soit capturé directement par le personnel du laboratoire ou d'autres (par ex. un fournisseur du commerce), devrait provenir d'un herbage *non contaminé* à moins que l'on ne veuille utiliser des vers ayant déjà été exposés à des contaminants [5].

On peut obtenir des reproducteurs d'*E. andrei* ou d'*E. fetida* auprès de la source canadienne suivante :

Laboratoire de toxicologie des sols
Centre de technologie environnementale
Environnement Canada
335, River Road
Ottawa, K1A 0H3
Tél. : (613) 990-9544

On peut également obtenir des reproducteurs d'*E. andrei* des sources canadiennes suivantes :

Section de toxicologie du milieu aquatique
Centre des sciences environnementales du Pacifique
Environnement Canada
2645, Dollarton Highway
North Vancouver, BC, V7H 1B1
Tél. : (604) 924-2500

Laboratoire de toxicologie
Centre des sciences de l'environnement de la région de l'Atlantique
Environnement Canada
C. P. 23005
Moncton, NB, E1A 6S8
Tél. : (506) 851-3486

Tous les vers de terre utilisés dans un essai de toxicité du sol doivent provenir de la même population.

Les vers destinés à servir de reproducteurs ou aux essais devraient être transportés au laboratoire avec une partie du sol où du substrat auquel ils sont adaptés. On pourrait obtenir des quantités supplémentaires de ce substrat pour les besoins de l'élevage et de la conservation, selon les conditions et les exigences en matière d'élevage (§ 2.3) et d'*acclimatation* (§ 2.4). Les récipients utilisés pour l'expédition et le transport devraient être isolés afin de réduire au minimum les fluctuations de température pendant le transport. Au besoin, on devrait déposer dans le ou les récipients de la glace préemballée ou des blocs réfrigérants pour s'assurer du maintien des basses températures pendant le transport. On devrait transporter rapidement les organismes vivants pour s'assurer de leur livraison rapide (c'est-à-dire dans les 24 h). On devrait éviter une densité excessive d'animaux pendant le transport ou l'expédition, pour les stresser le moins possible.

À l'arrivée au laboratoire, on peut conserver les vers dans le sol (ou dans un autre substrat) utilisé pour le transport en effectuant des ajustements de température. On peut aussi les transférer dans un autre substrat d'élevage (§ 2.3.5) ou dans un substrat permettant leur entretien et leur acclimatation (§ 2.4.5). Si la nature du substrat (y compris sa *texture* et son *humidité*) dans lequel les vers ont d'abord été gardés (par ex. par un fournisseur du commerce) ou transportés diffère sensiblement de celle du substrat dans lequel ils doivent être élevés (§ 2.3.5) ou acclimatés (§ 2.4.5), il pourrait être prudent de les adapter à un pourcentage croissant du substrat d'acclimatation, sur plusieurs semaines, jusqu'à ce qu'on les garde dans 100 % du substrat en question [6].

On devrait ajuster graduellement la température du sol pour l'amener à la température d'exposition à utiliser pendant l'élevage (§ 2.3.4) ou pour l'entretien et l'acclimatation des vers aux conditions expérimentales (§ 2.4.4). Il faudrait suivre les conseils donnés sur la

6. D'après l'expérience acquise au Laboratoire de toxicologie des sols d'Environnement Canada (Centre de technologie environnementale à Ottawa), les taux de survie dans les élevages peuvent être faibles si la nature du substrat utilisé par le fournisseur du commerce pour élever *E. andrei* diffère sensiblement du substrat d'élevage en laboratoire. Les taux de survie sont sensiblement améliorés, dans ce cas, si on augmente graduellement le pourcentage de substrat d'élevage du laboratoire, sur plusieurs semaines, jusqu'à ce que les vers soient maintenus dans le substrat d'élevage à 100 % (Princz, J., Environnement Canada, DMB, Ottawa, communication personnelle, 2004).

manipulation des vers dans les § 2.3.7 et 2.4.7 lors du transfert des vers d'une source de l'extérieur aux vivariums (enceintes d'élevage) [§ 2.3.2] ou des enceintes d'entretien et d'acclimatation (§ 2.4.2). Les autres conditions existant pendant cette période transitoire d'entretien pour l'acclimatation des reproducteurs ou des organismes d'expérience aux conditions du laboratoire devraient être aussi semblables que possible à celles que l'on emploie pour maintenir les élevages (§ 2.3) ou pour entretenir et acclimater les vers obtenus pour les essais de toxicité de sols (§ 2.4).

*2.3 Élevage d'*E. andrei/fetida

2.3.1 Généralités

Nous donnons ici des orientations et des recommandations générales pour l'élevage d'*E. andrei/fetida* pendant les préparatifs des essais de toxicité de sols. Conformément au dicton selon lequel *ce qui pourrait bien fonctionner dans un laboratoire pourrait ne pas fonctionner aussi bien dans un autre* (USEPA, 1994a ; EC, 1997a, b, 2001), les conseils explicites concernant de nombreux aspects de l'élevage, notamment le choix de l'enceinte d'élevage, le nombre d'organismes par enceinte, les conditions de renouvellement du sol, le substrat d'élevage, le type de nourriture et la grosseur des portions, tout cela est laissé à la discrétion et à l'expérience du personnel du laboratoire, bien que des conseils et des recommandations soient fournis dans les rubriques qui suivent. On utilise des indices [7] fondés sur le rendement pour évaluer la qualité des organismes d'élevage pour les essais et l'acceptabilité des résultats des essais. Pour convenir aux essais, les élevages doivent connaître de faibles taux de mortalité, et les organismes élevés doivent sembler en bonne santé et se comporter ainsi que se nourrir normalement. En outre, les organismes témoins doivent connaître de faibles taux acceptables de mortalité et satisfaire à tous les critères de validité d'un essai de toxicité (v. § 4.1.3, 4.2.3 et 4.3.3). L'acceptabilité de l'élevage devrait également être démontrée au moyen d'essais menés parallèlement ou en permanence à l'aide d'un *toxique de référence* (v. § 4.1.8). On devrait se débarrasser d'un élevage ne satisfaisant pas à ces critères.

Il incombe au laboratoire de montrer sa capacité d'obtenir des résultats constants, précis, à l'aide d'un *toxique de référence*, lorsque, au départ, il se prépare à effectuer des essais de toxicité d'un sol avec des *E. andrei* ou *E. fetida* d'élevage. À cette fin, il devrait déterminer sa précision intralaboratoire, exprimée en tant que *coefficient de variation* des données respectives sur la *CL 50*, en effectuant au moins 5 essais avec des lots (groupes) différents d'organismes d'expérience provenant de la même source, avec le même toxique de référence et un mode opératoire et des conditions expérimentales identiques pour chaque essai (v. § 4.1.8).

Dans les essais de toxicité de sols réguliers employant *E. andrei/fetida*, on devrait effectuer des *essais de toxicité de référence* mensuels avec des élevages du laboratoire, dans les conditions et avec les modes opératoires exposés au § 4.1.8. Si l'on ne se conforme pas à cet essai mensuel, on devrait évaluer les performances des vers individuels de l'élevage utilisés pour le démarrage d'un essai de toxicité d'un sol en effectuant en même temps un essai de toxicité de référence. En outre, on devrait vérifier les performances de tout élevage ayant été établi récemment, à l'aide de nouveaux reproducteurs (§ 2.2), à l'aide d'un essai de toxicité de référence, et les résultats devraient se révéler acceptables (v. § 2.3.9 et 4.1.8) avant de s'approvisionner en organismes dans ces élevages.

On devrait observer fréquemment les élevages d'*E. andrei/fetida* (par ex. une ou deux fois par semaine). Idéalement, on devrait consigner les données suivantes :

- la date de démarrage d'un élevage avec des cocons et le nombre estimé de cocons utilisés pour le démarrage de l'élevage ;
- les dates de renouvellement du substrat ;
- le régime alimentaire et celui d'abreuvement (y compris leur type et la quantité ajoutée chaque fois) ;
- des mesures de la qualité du sol (par ex. pH, température, humidité, capacité de rétention en eau) ;
- des observations de l'état de santé de l'élevage (par ex. comportement et aspect des vers dans l'élevage, odeur du substrat, endroit où les vers se trouvent dans l'enceinte, quantité de nourriture délaissée dans l'enceinte).

7. Ces indices se fondent notamment sur la survie et l'état des vers (*E. andrei/fetida*) d'élevage qui sont destinés à servir dans l'essai (§ 2.3.9) ; il s'agit également des critères à respecter par les organismes témoins pour que l'essai soit valide (§ 4.1.3, 4.2.3 et 4.3.3) ainsi que des critères reliés aux performances de groupes d'animaux dans les *essais de toxicité de référence* (§ 4.1.8).

Tableau 1. — Liste de contrôle des conditions et des modes opératoires recommandés pour l'élevage d'*Eisenia andrei* ou d'*Eisenia fetida* destinés à des essais de mesure de la toxicité des sols

Origine du stock de géniteurs de l'élevage	—	Cocons, jeunes ou adultes proviennent d'un élevage de l'État, privé ou commercial, ils ont tous la même origine ; l'identification jusqu'au niveau de l'espèce (c'est-à-dire *E. andrei* ou *E. fetida*) est confirmée.
Acclimatation	—	Graduelle (on ne recommande pas plus de 3 °C/j) pour ce qui concerne les écarts de température à l'arrivée.
Enceintes d'élevage	—	Des récipients de 10 à 50 L de capacité conviennent (par ex. bacs de plastique mesurant environ 30 × 40 × 15 cm ou 60 × 40 × 20 cm, à couvercle de plastique perforé pour permettre l'aération et réduire au minimum l'évaporation) ; côtés et/ou couvercle transparents ou translucides pour permettre l'éclairage de la surface du substrat d'élevage ; profondeur minimale recommandée : 10 cm.
Température	—	20 ± 2 °C, moyenne journalière ; 20 ± 3 °C, température instantanée.
Éclairage	—	À incandescence ou fluorescent ; intensité : 400 à 800 lux à la surface du vivarium ; photopériode fixe (par ex. 16 h ou 12 h).
Type de substrat	—	Facultatif (par ex. mélange de terreau, de sol artificiel et de tourbe ou mélange de papier désencré, déchiqueté, de sol artificiel et de tourbe à sphaignes).
Hydratation du substrat	—	À l'eau distillée ou désionisée ; humidité suffisante pour maintenir la surface de la litière humectée, mais sans accumulation d'eau stagnante au fond du vivarium ; les particules de sol ne devraient pas adhérer aux vers.
pH du substrat	—	Ajusté dans l'intervalle de 6,0 à 7,5 au moyen de carbonate de calcium de qualité « réactif ».
Renouvellement du substrat	—	Au besoin et au moins une fois tous les 2 ou 3 mois ; trier et transférer vers et cocons à la main ; on peut également préparer un bac de nouvelle litière, le couvrir de la vieille litière, laisser reposer sous éclairage ininterrompu pendant deux jours, puis se débarrasser de la vieille litière.
Surveillance de la qualité du substrat	—	Mesurer une fois par semaine, dans chaque vivarium, la température, le pH et l'humidité du substrat.
Alimentation	—	Soit des flocons d'avoine cuits, soit des agglomérés de luzerne saturés d'eau ; distribuer hebdomadairement en déposant la nourriture dans une petite dépression à la surface du substrat, puis recouvrir d'une mince couche de substrat, après s'être débarrassé des restes du repas antérieur.
Maintien de l'élevage	—	Examiner le substrat du vivarium ou moins une fois par semaine ; retourner manuellement et doucement le contenu du vivarium ; se débarrasser des vers morts, blessés ou atypiques (léthargiques) ; consigner l'état de l'élevage ; maintenir le chargement du vivarium à pas plus de 0,03 g/cm^3.
Âge et taille des vers destinés aux essais	—	Subadultes ou adultes (ces derniers pourvus d'un clitellum) pour l'essai de létalité aiguë ; adultes (pourvus d'un clitellum) uniquement pour l'essai de réaction aiguë d'évitement ou l'essai d'une durée de 8 semaines ; le poids frais de chaque ver doit se situer dans l'intervalle exigé par chaque méthode (§ 2.1).
Indices de la santé de l'élevage	—	Considéré comme en bonne santé si : (1) les vers se déplacent activement dans le substrat, ne tentent pas de le fuir et s'y se reproduisent continuellement ; (2) les résultats des essais de toxicité de référence à l'aide de vers de l'élevage se situent dans la zone de confiance déterminée par contrôle permanent. On se débarrasse de l'élevage si, à un moment donné, plus de 20 % des jeunes ou des adultes sont morts, inactifs ou en mauvaise santé.

Dans l'annexe E, on résume les divers modes opératoires et conditions utilisés par l'OCDE (1984, 2000), l'USEPA (1989), l'ISO (1993, 1998), l'ASTM (1999b) et EC (2000a) pour l'élevage d'*Eisenia andrei/fetida*. Ces particularités ont vraisemblablement donné de bons résultats pour l'obtention d'adultes de ces espèces pour les essais de toxicité de sols et, sauf indication contraire dans le présent rapport, elles donnent des orientations utiles, qui peuvent s'appliquer ici. Dans le tableau 1, on présente une liste de contrôle des conditions et modes opératoires recommandés pour l'élevage d'*E. fetida* afin d'obtenir une progéniture utilisable dans les essais de toxicité des sols.

2.3.2 Équipements et appareillage

Il faut élever les vers dans une installation de laboratoire à température contrôlée. L'équipement de régulation de la température (c'est-à-dire un incubateur ou une pièce thermostatée) doit permettre le maintien de la température entre les valeurs de consigne (§ 2.3.4). Le secteur des élevages doit être isolé de tout secteur d'essai, d'entreposage des échantillons ou de préparation, pour éviter la contamination de ces sources. Il doit être conçu et construit de façon à prévenir la contamination des élevages (par ex. suppression des tuyaux, garnitures ou accessoires de cuivre ou galvanisés qui pourraient laisser dégoutter des condensats contaminés par des métaux).

Dans l'élevage, tout l'équipement, tous les récipients et tous les accessoires qui pourraient entrer en contact avec les organismes ou le substrat doivent être propres, rincés convenablement et fabriqués de matériaux non toxiques (par ex. verre, téflon, acier inoxydable de type 316, nylon, Nalgene[MD], porcelaine, polyéthylène, polypropylène, fibre de verre). Les matières toxiques, notamment le cuivre, le zinc, le laiton, le métal galvanisé, le plomb et le caoutchouc naturel, ne doivent pas entrer en contact avec cet appareillage et équipement ni avec le substrat d'élevage ou l'eau.

Diverses enceintes d'élevage telles que les bacs de plastique ou les vivariums de reproduction de 10 à 50 L de capacité conviennent à l'élevage d'*E. andrei/fetida*. Les côtés et/ou le couvercle devraient être translucides ou transparents, pour permettre à la lumière d'atteindre le substrat d'élevage (v. § 2.3.3). Chaque enceinte devrait posséder un couvercle perforé (par ex. d'orifices couverts d'un grillage de fibre de verre) pour réduire au minimum l'assèchement du substrat en surface et le risque de contamination, tout en permettant l'échange d'air et en empêchant les vers de s'échapper. Le tableau 2 de l'annexe E expose les détails du type et de la taille de diverses enceintes recommandées par les organismes internationaux pour l'élevage de cette espèce de ver de terre au laboratoire afin d'obtenir des sujets pour les essais de toxicité des sols. L'emploi d'enceintes d'élevage en bois n'est pas recommandé, en raison de la présence possible de contaminants toxiques (par ex. colles pour contreplaqué, fongicides anticoloration ou extraits du bois tels que les acides résiniques, les juvabiones, etc.). Le choix de la taille et du nombre d'enceintes d'élevage nécessaires pourrait subir l'influence du nombre de vers de terre adultes dont le laboratoire a besoin pour un ou plusieurs essais de toxicité des sols. Chaque récipient devrait pouvoir recevoir au moins 10 cm d'épaisseur de sol ou d'un autre substrat d'élevage.

2.3.3 Éclairage

Les cultures devraient être éclairées par des lampes à incandescence ou fluorescentes. La *photopériode* devrait être régulée (par ex. 16 h ou 12 h) plutôt que d'être ininterrompue (24 h). L'intensité lumineuse adjacente à la surface du substrat dans les enceintes d'élevage devrait varier entre 400 et 800 lux. Cet intervalle équivaut à un flux quantique de 5,6 à 11,2 μmol/($m^2 \cdot s$) pour la lumière fluorescente blanche et crue, de 6,4 à 12,8 μmol/($m^2 \cdot s$) pour la lumière fluorescente à spectre continu ou de 7,6 à 15,2 μmol/($m^2 \cdot s$) pour l'éclairage à incandescence. Les sources lumineuses devraient être suffisamment éloignées des enceintes d'élevage pour empêcher l'évaporation causée par l'accumulation de chaleur.

2.3.4 Température

Dans chaque vivarium d'*E. andrei/fetida*, la moyenne journalière de la température du substrat devrait être de 20 ± 2 °C, et sa valeur instantanée devrait être de 20 ± 3 °C.

2.3.5 Substrat d'élevage

Divers substrats ont servi à l'élevage d'*E. andrei/fetida* en préparation des essais de toxicité de sols (v. tableau 4 de l'annexe E). Le choix du substrat est laissé à la discrétion et à l'expérience du personnel du laboratoire ; cependant, les deux substrats d'élevage suivants sont éprouvés et recommandés.

Un mélange de terreau (mélange de fumier, de tourbe et de loam), de tourbe à sphaignes et de sol artificiel s'est révélé un substrat convenable pour l'élevage d'*E. andrei* et d'*E. fetida*. On prépare comme suit 10 L de ce mélange :

- Mélanger environ 3 L de terreau avec environ 4 L de tourbe (ces deux matières étant à l'état sec).
- Ajouter de l'eau désionisée (~ 1 L) au substrat et soumettre à un mélange mécanique (mélangeur portatif) jusqu'à ce que l'humidité, la couleur et la *texture* du mélange semblent homogènes.
- Ajouter environ 1,5 L de sol artificiel (v. § 3.2.2).
- Ajouter de l'eau désionisée (~ 1 L) au mélange, tout en remuant mécaniquement, jusqu'à ce que l'humidité équivaille à environ 70 % de la *capacité de rétention* du mélange.
- Mesurer le pH du sol et, selon la valeur mesurée, parsemer environ 30 g de carbonate de calcium ($CaCO_3$) à la surface du substrat à l'aide d'un tamis fin, puis les incorporer au sol à l'aide d'un mélangeur mécanique, jusqu'à la disparition de la poudre blanche.

On conserve ce mélange dans un récipient couvert, à la température ambiante du laboratoire, pendant trois jours. On remue ensuite le substrat et on en mesure le pH pour s'assurer qu'il se situe entre 6,0 et 7,5. Si le pH est inférieur à 6,0, on ajoute encore du carbonate de calcium (Stephenson, G.L., Aquaterra Environmental, Orton, ON, communication personnelle, 2001).

Le personnel des laboratoires d'Environnement Canada a constaté qu'un substrat constitué d'un mélange de papier journal ou d'essuie-tout de papier brun (écru), déchiquetés, de sol artificiel (v. § 3.2.2), de tourbe à sphaignes et (selon la disponibilité) de déjections de vers de terre convenait à l'élevage d'*E. andrei* (EC, 2000a). C'est ce substrat qui est recommandé ici. On prépare ce mélange en déchiquetant 400 à 500 g de papier désencré, sec, ou de papier brun (c'est-à-dire de papier journal désencré ou d'essuie-tout de papier brun) à l'aide d'une déchiqueteuse de bureau à coupe droite, puis en saturant le papier déchiqueté avec de l'eau potable de ville déchlorée dans un bac de plastique d'une capacité de 40 L environ. On couvre le bac et on le met de côté pendant une courte période. On mélange environ 3 kg de sol artificiel, d'un taux d'humidité d'environ 10 % (ou ~ 3 kg de déjections de vers d'un autre élevage) avec 500 à 600 g de tourbe à sphaignes sèche dans un second bac (d'une capacité d'environ 40 L). On agite le mélange tout en ajoutant de l'eau déchlorée, jusqu'à ce que sa consistance devienne presque boueuse et que sa teneur en eau se situe à environ 80 à 90 % de la capacité de rétention en eau du mélange (Moul, D., Environnement Canada, Centre des sciences environnementales du Pacifique [CSEP], North Vancouver, C.-B., communication personnelle, 2001). On mesure ensuite le pH de ce mélange de sol, de tourbe et d'eau et on y ajoute du carbonate de calcium en poudre jusqu'à ce que le pH atteigne l'intervalle de 6,0 à 7,5. On mélange ensuite le contenu des deux bacs et on dépose le tout dans une enceinte d'élevage (vivarium) [bac de plastique mesurant 53 × 38 × 30 cm]. On débarrasse le bac de toute l'eau stagnante qu'il contient. Ensuite, on introduit des vers (~ 1 000) d'âges et de tailles différents. On mesure périodiquement (par ex. hebdomadairement) le pH et l'humidité du substrat et on les ajuste au besoin. On en profite pour brasser doucement le substrat et on en mesure le pH pour s'assurer qu'il se maintient entre 6,0 et 7,5. Si le pH est inférieur à 6,0, on ajoute du carbonate de calcium. On débarrasse le bac de toute eau stagnante qui s'y trouve et on ajoute, en mélangeant, de l'eau d'essai si le substrat semble trop sec (Moul, D., Environnement Canada, CSEP, North Vancouver, C.-B., communication personnelle, 2001).

2.3.6 Alimentation des vers

Pour l'élevage d'*E. andrei/fetida* en vue d'essais de toxicité de sols, on a utilisé divers types d'aliments et employé divers régimes (v. annexe E ; tableau 5). On a réussi l'élevage de ces espèces grâce à l'emploi de flocons d'avoine (gruau) cuits (Aquaterra Environmental, 1998a ; Stephenson *et al.*, 1999a, b ; Aquaterra Environmental et ESG, 2000) ou des agglomérés de luzerne déshydratée (USEPA, 1989 ; ASTM, 1999b ; EC, 2000a). Les détails de la préparation de ces deux types d'aliments recommandés, ainsi que les régimes alimentaires acceptables suivent.

L'avoine à utiliser pour nourrir les élevages s'achète en épicerie. À cette fin et pour l'essai d'une durée de 8 semaines (v. § 4.3.4), on recommande le gruau rapide Quaker Oats[MD], prêt en 3 à 5 minutes, car l'emploi de marques génériques ou d'autres marques de gruau a parfois révélé des problèmes de moisissure excessive dans les élevages ou pendant l'essai. Le gruau devrait être hydraté avec de l'eau désionisée (un tiers de mesure de flocons séchés dans deux tiers de mesure d'eau), cuit dans le four micro-ondes à la température "haute", puis refroidi avant distribution aux élevages. On devrait ajouter une ou deux cuillerées à thé (~ 5 mL chacune) combles de flocons cuits à chaque vivarium, en pratiquant une petite dépression dans le substrat, en y déposant l'avoine puis en recouvrant ce dernier d'une mince couche de substrat pour

réduire au minimum la croissance de moisissure ou la prolifération d'acariens (Stephenson, G.L., Aquaterra Environmental, Orton, ON, communication personnelle, 2001). Pendant les vérifications hebdomadaires (ou plus fréquentes) des élevages, on devrait éliminer, au moyen d'une cuiller, tout vieux gruau ainsi que la moisissure ou les acariens qui l'infestent et qui se manifestent à la surface du substrat, et s'en débarrasser en veillant à ne pas retirer de vers en même temps (les vers nouveau-nés ayant tendance à creuser des galeries dans le bol de gruau). La distribution de gruau devrait se faire une fois par semaine.

On peut également nourrir les élevages d'*E. andrei/fetida* d'agglomérés de luzerne (USEPA, 1989 ; ASTM, 1999b ; EC, 2000a) [8]. On peut se procurer les agglomérés séchés auprès d'un fournisseur d'aliments du bétail. Avant de les utiliser, on devrait les saturer d'eau désionisée ou distillée (à raison d'environ 1 g d'agglomérés séchés pour 2 mL d'eau). Bien que l'ASTM (1999b) recommande la maturation, pendant au moins deux semaines, de la luzerne hydratée à 4 °C dans un récipient couvert, l'expérience d'un laboratoire d'essais d'Environnement Canada montre que cette étape est inutile et que la luzerne hydratée peut être servie dans les heures suivant l'hydratation (Moul, D., Environnement Canada, CSEP, North Vancouver, C.-B., communication personnelle, 2001). On devrait nourrir les vers de chaque vivarium une fois par semaine. À chaque distribution d'aliment, on devrait se débarrasser, au moyen d'une cuiller ou de pincettes, de tout reste d'aliment que l'on trouve à la surface du substrat. On dépose ensuite à la surface du substrat de la luzerne hydratée fraîche et on la couvre d'une mince couche de substrat pour réduire au minimum la croissance de parasites (acariens et collemboles) [Moul, D., Environnement Canada, CSEP, North Vancouver, C.-B., communication personnelle, 2001].

On devrait compléter la distribution de gruau ou de luzerne dans les élevages par l'addition régulière d'un peu de matière végétale compostée pour améliorer et maintenir la santé des vers. La distribution hebdomadaire de compost déshydraté (par ex. à raison de 15 à 30 mL par vivarium renfermant environ 6 à 8 L de substrat) devrait compléter l'apport hebdomadaire de gruau cuit ou de luzerne hydratée. Voici la façon de préparer ce compost, qui s'est révélé améliorer la santé des élevages d'eisénies (Stephenson, 2003b).

On dépose de la matière végétale (fruits — mais pas de peaux de banane ni de gros noyaux ou pépins —, pain et légumes) dans un seau d'acier inoxydable servant à collecter les déchets compostables domestiques ou des salles à manger des immeubles à bureaux). Une fois par semaine, on apporte ces matières au laboratoire et on les pulvérise au robot culinaire. On peut devoir ajouter de l'eau (désionisée ou traitée par osmose inverse) aux matières compostables se trouvant dans la cuve du robot si les matières sont trop sèches pour se prêter à la pulvérisation. Cependant, cela arrive rarement. On dépose les matières pulvérisées dans des plateaux d'aluminium et ou les étale en couche mince. On porte les plateaux à l'étuve (90 à 105 °C) pour les faire sécher pendant la nuit. Le lendemain, on verse la matière organique séchée (ayant la consistance d'une céréale séchée pour nourrissons) dans un récipient pour aliments et on la garde au réfrigérateur jusqu'au moment de l'utilisation (moins de sept jours après sa préparation). On saupoudre la matière organique déshydratée hebdomadairement à la surface du substrat de chaque vivarium. Il n'est pas nécessaire de la réhydrater si le substrat de l'élevage est suffisamment humide.

La quantité d'aliments ajoutés (gruau cuit, luzerne hydratée) dépend de la densité des vers et de leur stade de développement. Elle devrait se fonder sur les observations et les statistiques relatives aux aliments consommés et non consommés, faites et recueillies pendant les distributions hebdomadaires antérieures.

2.3.7 Manipulation des organismes et maintien des élevages

On devrait manipuler le moins possible les embryons (dans les cocons), les jeunes et les adultes d'*E. andrei/fetida* pour éviter de les blesser ou de les stresser inutilement. S'il faut les manipuler, il faudrait le faire avec douceur, soigneusement et rapidement, pour réduire au minimum le stress subi par les animaux. Pour transporter les vers de l'élevage aux enceintes expérimentales, on peut y aller avec la main gantée ou avec les mors émoussés d'une pince. Pendant les manipulations, on devrait se débarrasser de tout ver blessé, qui semble stressé ou que l'on a laissé échapper, et il ne faut pas l'utiliser dans l'essai.

---

8. Cet aliment s'est révélé capable de faire prospérer les élevages d'*E. andrei/fetida* (USEPA, 1989 ; ASTM, 1999b ; EC, 2000a), et, d'un point de vue hygiénique, il est préférable à l'emploi alimentaire de déjections animales au laboratoire (conformément à l'OECD, 1984, 2000 ; à l'ISO, 1993, 1998) [v. annexe E ; tableau 5].

Le tableau 6 de l'annexe E résume d'utiles conseils à appliquer pour le maintien des élevages d'*E. andrei/fetida.* On trouve ces renseignements dans des méthodes et guides internationaux sur les essais de toxicité des sols employant ces vers.

Conformément aux publications de l'ASTM (1999b) et d'EC (2000a), il est recommandé d'inspecter le contenu de chaque vivarium immédiatement avant chaque distribution hebdomadaire de nourriture, pour déterminer l'état apparent des vers et celui du substrat de la litière. Si, pendant cette inspection, on observe l'accumulation d'eau excédentaire dans le bas du substrat, on devrait alors retourner soigneusement la litière pour redistribuer cette eau dans tout le substrat[9]. Il faut veiller, quand on retourne le contenu du vivarium, à ne pas blesser les vers. Il faut alors se débarrasser de tout cadavre de ver que l'on observe. Tout ver blessé ou apparemment atypique (par ex. léthargique) que l'on observe devrait subir le même sort. On devrait consigner dans un registre l'état apparent de l'élevage (vers et substrat) à chaque période d'observation (§ 2.3.1).

Il faudrait limiter le chargement ou densité de peuplement de chaque vivarium pour prévenir une densité excessive et ses effets indésirables sur la croissance et la reproduction des vers ainsi que sur la santé de l'élevage. La valeur maximale du chargement, 0,03 g de poids frais de ver/cm^3, recommandée par l'ASTM (1999b) [v. annexe E ; tableau 6, y compris ses notes 4 et 5.] est un critère utile. Pour réduire la population excédentaire de vers d'un vivarium, on peut suivre l'un des deux modes opératoires suivants (ou quelque modification convenable de ce dernier). Le premier a comme avantage supplémentaire qu'il permet de trier les vers en deux catégories de tailles (c'est-à-dire en jeunes et en adultes).

Mode opératoire (option) 1 (d'après ESG International Inc., de Guelph, Ont.) [Stephenson, G.L., Aquaterra Environmental, Orton, ON, communication personnelle, 2001] :

- Préparer un mélange frais du substrat d'élevage (v. § 2.3.5).
- Transvaser une aliquote de 1 L environ de substrat frais dans chacun des deux récipients de conservation temporaire.
- Déposer le contenu d'un vivarium (où le chargement est excessif, dont le milieu est trop humide ou dont l'odeur est nauséabonde sur une feuille de plastique ou dans un récipient de plastique peu profond, dont la surface est suffisante pour permettre le tri du contenu.
- Retirer les vers vivants et apparemment en bonne santé, jeunes et adultes, puis les transférer dans les deux récipients provisoires, séparément, en deux classes de tailles (c'est-à-dire les jeunes dans un récipient, les adultes dans l'autre).
- Préparer deux nouveaux vivariums, en mélangeant une partie du vieux substrat et du nouveau substrat selon un rapport respectif de 1/3. Après mélange, corriger l'humidité et le pH du substrat de chaque vivarium, au besoin (§ 2.3.5, 2e alinéa).
- Transférer les jeunes vers de l'un des récipients temporaires à la surface du substrat de l'un des deux vivariums et les vers adultes à la surface du substrat de l'autre vivarium.
- Répartir doucement les vers un à un sur la surface, pour qu'ils puissent pénétrer dans le substrat de tout le vivarium.
- Étiqueter chaque vivarium et consigner le nom de l'espèce, son stade évolutif, l'origine des vers, leur nombre approximatif et la date du renouvellement du substrat.

Mode opératoire (option) 2 (d'après ASTM, 1999b et EC, 2000a ; v. annexe E, tableau 6) :

- Préparer un vivarium avec du substrat neuf (frais), mais sans ver, et déposer la moitié de son contenu sur une feuille de plastique.
- Transférer le contenu du vivarium où le chargement de vers est excessif sur une autre feuille de plastique.
- Soigneusement retirer les vers (y compris les cocons, les

9. Une autre façon de redistribuer l'eau excédentaire dans le substrat consiste à retourner le vivarium (avec son couvercle en place) hebdomadairement, pendant au moins une heure. Cela demande moins de travail que de retourner le substrat de chaque vivarium hebdomadairement et on peut procéder de la sorte à cette fin. L'inconvénient est que cela ne permet pas d'observer simultanément les vers, ce qui va de soi quand on retourne le contenu à la main. Si aucune de ces deux méthodes n'est appliquée, on préconise un brassage peu énergique de la surface du substrat, hebdomadairement (ou plus souvent), pour réduire au minimum la prolifération d'acariens. L'eau ne s'accumule pas dans les vivariums dont le fond est percé de petits orifices grillagés.

jeunes et les adultes) du substrat et les transférer temporairement en nombres égaux, en tenant compte approximativement des classes d'âge dans chacun des deux récipients convenables de transfert.

- Transférer la moitié du vieux substrat dans le nouveau vivarium et en mélanger le contenu doucement, à la main (gantée) ou à l'aide d'une spatule ou d'une cuiller de plastique.
- Mélanger la moitié du nouveau substrat se trouvant sur la feuille de plastique avec la moitié restante du vieux substrat, puis transférer le mélange dans le vivarium où le chargement était excessif.
- Transférer ensuite dans chacun des deux vivariums fraîchement préparés l'un des deux groupes de vers gardés peu de temps dans chaque récipient de transfert.

Renouveler la litière de chaque vivarium selon les besoins et au moins une fois tous les 2 ou 3 mois, peu importe le chargement de vers [10]. Une méthode efficace à cette fin (ASTM, 1999b ; EC, 2000a) consiste à préparer un nouveau bac de litière, à déposer le contenu de la vieille litière (y compris les vers qui s'y trouvent) par-dessus la nouvelle litière. On conserve les litières superposées (la vieille sur la neuve) dans un bac non couvert, à 20 ± 2 °C, sous éclairage ininterrompu, pendant deux jours, pour inciter les vers à creuser leurs terriers dans la nouvelle litière. À la fin de ces deux jours, on se débarrasse la vieille litière [11].

Surveiller le pH, la température et l'humidité de la litière de chaque vivarium, hebdomadairement, et effectuer les ajustements nécessaires (v. § 2.3.4 et 2.3.5).

2.3.8 Vers destinés aux essais de toxicité

Les méthodes d'élevage, pour être couronnées de succès, doivent produire le nombre nécessaire d'organismes en bonne santé, d'un stade connu de développement, d'âges et de tailles semblables. Le poids frais de chaque *E. andrei/fetida* au début de chacun des essais de toxicité d'un sol décrits dans les § 4.1, 4.2 ou 4.3 doit se situer dans l'intervalle précisé dans le § 2.1. En outre, les organismes obtenus par élevage doivent satisfaire à des critères précis de santé et de performances (§ 2.3.9).

Tout *E. andrei* ou *E. fetida* élevé en laboratoire et utilisé au début d'un essai de létalité aiguë (y compris un essai employant un toxique de référence) ou un essai de réaction aiguë d'évitement devrait avoir été acclimaté dans le laboratoire aux conditions thermiques représentatives de l'essai, pendant au moins 7 jours (v. § 4.1.2 et 4.2.2). Les eisénies obtenues par élevage et à utiliser dans l'essai de létalité aiguë devraient également être acclimatées, pendant cette période, aux conditions d'éclairage qui seront utilisées pendant l'essai (§ 4.1.2). Les eisénies d'élevage à utiliser dans un essai de réaction aiguë d'évitement n'ont pas besoin d'acclimatation préalable aux conditions d'obscurité totale qui règnent au cours de cet essai (v. § 2.4.3 et 4.2.2).

Tout *E. andrei* élevé en laboratoire et utilisé au début d'un essai de toxicité d'une durée de 8 semaines visant à mesurer les effets sur la survie, la reproduction et la croissance (§ 4.3) doit être acclimaté, dans le laboratoire, aux conditions de cet essai de toxicité pendant au moins 7 jours. Si le substrat d'élevage utilisé est essentiellement constitué de sol (ou d'un mélange de sol et de tourbe ; v. § 2.3.5) et que la nourriture donnée aux élevages est la même que celle qui servira pendant l'essai de 8 semaines (c'est-à-dire flocons d'avoine cuits ; v. § 2.3.6 et 4.3.4), ces vers sont déjà acclimatés à ces conditions expérimentales, et tout transfert et toute manipulation supplémentaires des vers à cette fin sont déconseillés. Cependant, si les conditions d'élevage du substrat et/ou de la nourriture diffèrent sensiblement de celles auxquelles les vers se trouvant dans le sol témoin négatif seront exposés pendant l'essai de 8 semaines, il faut garder tous les vers à utiliser dans l'essai de toxicité pendant au moins 7 jours, dans un *sol témoin négatif*. Pendant cette période d'acclimatation, l'éclairage et la température doivent être les mêmes que dans l'essai de 8 semaines, et il faut donner à manger des flocons d'avoine cuits aux vers (v. § 2.3.3, 2.3.4, 2.3.6 et 4.3.2).

2.3.9 Indices de santé et de performances

Chaque vivarium devrait faire l'objet d'une vérification au moins hebdomadaire, pendant laquelle les performances de l'élevage devraient être contrôlées et consignées (v. § 2.3.1, 2.3.6 et 2.3.7). On devrait évaluer régulièrement et corriger au besoin les modes opératoires et les conditions utilisés pour le maintien de chaque

---

10. Les signes de dégradation du substrat sont notamment une différence de couleur entre les quelques centimètres de la couche inférieure et de la couche supérieure et une forte odeur, révélatrice d'une anaérobiose (EC, 2000a).

11. De la sorte, on ne récupère pas les cocons, et certains jeunes et adultes risquent de rester dans la vieille litière (ASTM, 1999b).

élevage, afin de préserver ou de restaurer sa santé. On devrait se débarrasser de tout jeune ver ou de tout ver adulte qui semble mort, inactif, non en train creuser de galerie dans le substrat de la litière ou qui, autrement, semble malade ou atypique. Si l'élevage semble en mauvaise santé ou atypique pendant une vérification hebdomadaire (ou plus fréquente), on devrait le vérifier journellement, pour s'assurer qu'il n'y survient pas une mortalité en cascade (c'est-à-dire que le taux de mortalité augmente exponentiellement en fonction du temps). Pendant ces observations journalières, on devrait se débarrasser de tout ver qui, à la surface du sol, semble mort, inactif ou par ailleurs en mauvaise santé ou atypique. Si plus de 20 % des *E. andrei/fetida* jeunes ou adultes d'un vivarium semblent morts, inactifs ou en mauvaise santé au cours d'une période d'observation, on devrait se débarrasser de tout le groupe se trouvant dans le vivarium. En outre, si le nombre combiné de mortalités journalières et de vers semblant en mauvaise santé que l'on observe à la surface du substrat d'élevage persiste ou augmente pendant plusieurs jours, on devrait également se débarrasser du contenu du vivarium.

Il faudrait effectuer au moins un essai de toxicité de référence d'une durée de 7 jours à l'aide d'une partie de la population de vers de terre adultes provenant d'un élevage particulier pour entreprendre un essai *définitif* du sol (v. § 4.1.8 et 4.3.8). Idéalement, on devrait effectuer l'essai de toxicité de référence en même temps que chaque essai de toxicité d'un sol. Les laboratoires effectuant en routine des essais de toxicité de sols employant *E. andrei/fetida* peuvent opter plutôt pour un ou plusieurs essais réguliers (c'est-à-dire au moins une fois par mois) de toxicité de référence, qui utilisent une partie des vers adultes gardés dans l'élevage ou les élevages particuliers d'où proviennent les organismes destinés aux essais de toxicité des sols. Tous les essais effectués avec le ou les toxiques de référence devraient avoir lieu dans les conditions et avec les modes opératoires exposés dans le § 4.1.8. On expose dans les § 4.1.3, 4.2.3 et 4.3.3 les critères expérimentaux utilisés pour juger de la validité d'un essai particulier de toxicité d'un sol (et, indirectement, de la santé de l'élevage) fondés sur les performances des organismes en expérience dans le *sol témoin négatif*.

Un laboratoire qui effectue des essais réguliers (par ex. une fois par mois ou plus souvent) de toxicité d'une durée de 8 semaines (§ 4.3) pourrait trouver utile de surveiller les données sur le nombre de jeunes engendrés dans le sol témoin négatif, comme mesure de la santé et des performances de l'élevage. Un graphique de ces données en fonction du temps peut révéler des difficultés de reproduction attribuables au régime ou à d'autres conditions auxquelles les élevages sont exposés (Stephenson, G., Stantec Consulting Ltd., Guelph, Ont., communication personnelle, 2004).

2.4 Entretien et acclimatation des vers

2.4.1 Généralités

Tout groupe de vers de terre (*E. andrei/fetida* ou *L. terrestris*) employé dans un ou plusieurs essais de toxicité d'un sol ou de sols que l'on décrit dans le présent document doit d'abord être acclimaté aux conditions régnant dans le laboratoire (température et éclairage) auxquelles il sera exposé dans l'essai ou les essais. Nous décrivons ici les modes opératoires et les conditions de l'entretien et de l'acclimatation (*élevage*) de tout groupe d'*E. andrei/fetida* ou de *L. terrestris* transporté au laboratoire pour être employé dans un essai de létalité aiguë (§ 4.1) ou dans un essai de réaction aiguë d'évitement (§ 4.2) et nous les résumons dans le tableau 2. Des conseils sur les sources d'approvisionnement d'un laboratoire en vers de terre destinés à un essai de létalité aiguë ou dans un essai de réaction aiguë d'évitement sont fournis dans le § 2.2. Consulter le § 2.3 pour connaître les conditions et les modes opératoires de l'élevage des vers de terre (*E. andrei/fetida*) à employer dans l'un de ces essais de toxicité aiguë (plutôt que des vers importés pour être soumis directement à des essais) ou dans un essai d'une durée de 8 semaines (employant uniquement des *E. andrei* d'élevage) pour la détermination des effets toxiques dus à une exposition prolongée à des concentrations sublétales de contaminants (§ 4.3).

Comme dans le cas des essais initiaux employant des *E. andrei/fetida* d'élevage, il incombe à chaque laboratoire novice dans l'emploi de la ou des méthodes d'essai biologique décrites dans le présent document de montrer sa capacité d'obtenir des résultats constants, précis, avec un toxique de référence, quand il se prépare à effectuer des essais toxicité des sols avec des groupes de vers de terre (*E. andrei, E. fetida* ou *L. terrestris*) qu'il s'est procurés auprès d'un fournisseur de l'extérieur. À cette fin, on devrait déterminer la précision intralaboratoire, exprimée par le coefficient de variation des données respectives sur la CL 50, en effectuant au moins cinq essais avec différents lots (groupes) d'organismes provenant de la

Tableau 2. — Liste de contrôle des conditions et des modes opératoires recommandés pour le maintien et l'acclimatation des vers des espèces *Eisenia andrei, Eisenia fetida* ou *Lumbricus terrestris* destinés à des essais de toxicité des sols

Origine des vers	—	Laboratoire de l'État, laboratoire privé ou fournisseur commercial ou, encore, herbage réputé ne pas avoir été traité par des pesticides ou des engrais depuis au moins 5 ans.
Stade de développement et taille à la réception	—	Selon le moment où aura lieu l'essai de toxicité, les vers peuvent être obtenus jeunes ou adultes (dans ce dernier cas, dotés d'un clitellum) ; le poids frais individuel des vers doit se situer dans l'intervalle précisé (§ 2.1)
Enceintes de d'entretien et d'acclimatation	—	Enceintes de reproduction de 10 à 50 L de capacité (par ex. bacs de plastique mesurant environ 30 × 40 × 15 cm) à couvercle perforé pour permettre l'aération et réduire au minimum l'évaporation ; côtés et/ou couvercle transparents ou translucides pour permettre l'éclairage de la surface du substrat ; profondeur minimale recommandée : 10 cm.
Température	—	Il est recommandé de l'ajuster graduellement (par ex. pas plus de 3 °C/j) pour combler les écarts de température à l'arrivée ; ensuite, maintenir les *Eisenia sp.* à une température journalière moyenne de 20 ± 2 °C et à une température instantanée de 20 ± 3 °C ; ajuster la température des *L. terrestris* capturés sur le terrain à la température journalière moyenne de 20 ± 2 °C pendant au moins 7 jours avant les essais ; on peut également adapter les *L. terrestris* à une température plus basse (par ex. ≤ 15 ± 2 °C) et les y maintenir plusieurs semaines ou mois, après quoi on les amène à la température de l'essai pendant au moins les 6 h précédant immédiatement l'essai.
Éclairage	—	À incandescence ou fluorescent ; intensité : 400 à 800 lux à la surface de l'enceinte de maintien ou d'acclimatation ; photopériode fixe (par ex. 16 h ou 12 h) ; acclimater les vers à ces conditions pendant au moins les 7 jours précédant immédiatement l'essai.
Type de substrat	—	Facultatif : sol témoin négatif (naturel ou artificiel) ; mélange de terreau, de sol artificiel et de tourbe ; mélange de papier déchiqueté (c'est-à-dire papier journal désencré ou essuie-tout de papier brun), sol artificiel et de tourbe à sphaignes.
pH du substrat	—	D'au moins 6,0 ; ne pas ajuster si le sol est un témoin négatif naturel (prélevé sur le terrain) ; ajuster entre 6,0 et 7,5 au moyen de carbonate de calcium de qualité « réactif » si le substrat est artificiel.
Hydratation du substrat	—	À l'eau distillée ou désionisée ; humidité suffisante pour maintenir humectée la surface de la litière du substrat, mais sans eau stagnante au fond de l'enceinte de maintien ou d'acclimatation ; les particules de sol ne devraient pas adhérer aux vers.
Renouvellement du substrat	—	Au besoin et au moins une fois tous les 2 ou 3 mois, si les vers sont gardés longtemps avant d'être utilisés dans un essai de toxicité ; trier et transférer les vers à la main ; on peut également préparer un bac de nouvelle litière, le couvrir de la vieille litière, laisser reposer sous éclairage ininterrompu pendant deux jours, puis se débarrasser de la vieille litière.
Durée de l'acclimatation	—	Au moins 7 jours, pendant la période précédant immédiatement l'essai, aux conditions existant dans le laboratoire ; les vers obtenus d'un fournisseur du commerce devraient être acclimatés aux conditions existant dans le laboratoire pendant la période d'au moins 14 jours précédant immédiatement l'essai.
Surveillance de la qualité du substrat	—	Mesurer au moins une fois par semaine, dans chaque enceinte de maintien et d'acclimatation, la température, le pH et l'humidité du substrat.
Alimentation	—	Soit des flocons d'avoine cuits, soit des agglomérés de luzerne saturés d'eau ; ne donner que de l'avoine cuite pendant la période d'au moins 7 jours précédant immédiatement l'essai si on acclimate *E. andrei* en vue d'un essai d'une durée de 8 semaines ; distribuer hebdomadairement en déposant la nourriture dans une petite dépression à la surface du substrat, puis recouvrir d'une mince couche de substrat, après s'être débarrassé des restes du repas antérieur et après avoir raclé tout amas visible proche de moisissure ou d'acariens.
Entretien hebdomadaire	—	Réhydrater au besoin et retourner manuellement le substrat des bacs de d'entretien ou d'acclimatation, doucement, une fois par semaine ; se débarrasser des vers morts, blessés ou atypiques (léthargiques) ; consigner l'état apparent du substrat et des vers ; maintenir le chargement en vers à pas plus de 0,03 g/cm^3.

Âge et taille des vers destinés aux essais	—	Subadultes ou adultes (ces derniers pourvus d'un clitellum) pour l'essai de létalité aiguë ; adultes (pourvus d'un clitellum) uniquement pour l'essai de réaction aiguë d'évitement ou l'essai d'une durée de 8 semaines ; dans chaque cas, le poids frais de chaque ver doit se situer dans l'intervalle précisé dans le § 2.1.
Indices de la santé	—	Dans l'enceinte d'entretien ou d'acclimatation, les vers sont considérés comme en bonne santé si : (1) ils semblent actifs quand on les observe et ils ne tentent pas de s'échapper du substrat ; (2) les résultats des essais de toxicité de référence à l'aide de vers provenant de l'enceinte de maintien ou d'acclimatation se situent dans la zone de confiance déterminée par contrôle permanent. On se débarrasse de tout le groupe si, à un moment donné, plus de 20 % des jeunes ou des adultes sont morts, inactifs ou en mauvaise santé.

même source, en utilisant le même toxique de référence et des modes opératoires ainsi que des conditions identiques dans chaque essai (v. § 4.1.8). Le laboratoire devrait alors également confirmer la précision qu'il obtient dans les essais en question, en effectuant au moins 5 essais de toxicité employant un *sol témoin négatif* et différents groupes d'organismes (USEPA, 1994a ; EC, 1997a, 1997b, 2001). Les conditions et modes opératoires de ces essais initiaux appliqués à un *sol témoin négatif* devraient être identiques et se conformer à ceux qui sont exposés dans les § 4.1 (dans le cas d'essais de létalité aiguë), § 4.2 (dans le cas d'essais de réaction aiguë d'évitement) ou § 4.3 (dans le cas d'essais de mesure des effets d'une exposition prolongée sur la survie, la reproduction et la croissance).

2.4.2 Équipement et appareillage

Il faut entretenir les vers et les acclimater dans une installation de laboratoire à température contrôlée, isolée de tout local où on effectue des essais, entrepose ou prépare des d'échantillons. Consulter le § 2.3.2 pour obtenir des conseils sur les installations d'entretien ou d'acclimatation des vers à utiliser dans les essais de toxicité d'un sol et les récipients convenant à cette fin (c'est-à-dire les vivariums) et leurs couvercles.

2.4.3 Éclairage

Les enceintes servant à l'entretien et à l'acclimatation des vers destinés aux essais de toxicité de sols devraient être éclairées au moyen de lampes à incandescence ou de lampes fluorescentes. On devrait réguler la photopériode (par ex. 16 h ou 12 h) plutôt que d'utiliser un éclairage ininterrompu (c'est-à-dire de 24 h). L'intensité lumineuse adjacente à la surface du substrat de ces enceintes devrait varier de 400 à 800 lux. Cet intervalle équivaut à un flux quantique de 5,6 à 11,2 $\mu mol/(m^2 \cdot s)$ sous éclairage fluorescent à lumière blanche et crue, de 6,4 à 12,8 $\mu mol/(m^2 \cdot s)$ sous éclairage fluorescent à spectre continu, ou de 7,6 à 15,2 $\mu mol/(m^2 \cdot s)$ sous éclairage à incandescence. On devrait acclimater les vers à ces conditions d'éclairage pendant au moins 7 jours avant de les employer dans un essai [12].

2.4.4 Température

La température moyenne journalière du substrat dans chaque enceinte d'entretien et d'acclimatation devrait être de 20 ± 2 °C durant l'acclimatation. En outre la température instantanée du substrat devrait être de 20 ± 3 °C durant la même période. À cette fin, on devrait utiliser un incubateur ou un local à température contrôlée, isolé des laboratoires.

À la réception des vers au laboratoire d'essais, on devrait mesurer et consigner la température du substrat dans le récipient ayant servi au transport. On devrait amener graduellement les vers à la température d'acclimatation. Dans le cas des groupes d'eisénies d'élevage expédiées vers un laboratoire d'essai par un autre laboratoire ou un

12. On recommande cette durée d'acclimatation pour que les vers soient habitués aux conditions expérimentales avant le début de l'essai de toxicité. En outre, cette période assure un nombre minimal de jours (≥ 7) pour que les vers se remettent du stress du transfert au laboratoire d'essais, avant le début de l'essai de toxicité. L'essai de réaction d'évitement (v. § 4.2) fait exception : les vers qui y sont destinés peuvent être acclimatés à une photopériode fixe (par ex. 16 h ou 12 h) bien que les conditions expérimentales réclament l'obscurité totale pendant la période d'exposition.

élevage extérieur, on devrait ajuster graduellement la température du substrat et des vers qui s'y trouvent (par ex. ≤ 3 °C/j) à la température à laquelle les élevages du laboratoire doivent être conservés (v. § 2.3.4) ; ces vers devraient être acclimatés à la température moyenne de l'essai de toxicité (c'est-à-dire 20 ± 2 °C) pendant au moins les 7 jours précédant immédiatement leur emploi dans cet essai. Dans le cas des *L. terrestris* capturés sur le terrain (§ 2.2) et destinés à des essais de létalité aiguë ou à des essais de réaction aiguë d'évitement, on devrait les amener graduellement à la température moyenne de l'essai (c'est-à-dire 20 ± 2 °C) et les garder dans cet intervalle de température pendant au moins 7 jours avant de les employer dans l'essai. On peut aussi amener ces mêmes vers graduellement à une température inférieure (par ex. 15 ± 2 °C ou moins), les y garder longtemps (par ex. plusieurs semaines ou mois), puis les amener à la température moyenne de l'essai (c'est-à-dire 20 ± 2 °C) avant de les y employer [13].

2.4.5 Substrat

La litière servant à l'entretien et à l'acclimatation des vers de terre en vue d'un ou de plusieurs essais de toxicité de sols peut être la même que celle que l'on envisage d'utiliser comme *sol témoin négatif* dans ces essais. Ce peut être un sol naturel, prélevé sur le terrain d'un emplacement non contaminé (§ 3.2.1) ou un sol artificiel (§ 3.2.2). La litière que l'on recommande pour l'élevage d'*E. andrei/fetida* (§ 2.3.5) peut également servir à l'entretien et à l'acclimatation de ces vers ou de *L. terrestris*.

L'humidité du substrat devrait suffire pour garder la litière humide, tout en ne causant pas l'accumulation d'eau au fond de l'enceinte d'entretien ou d'acclimatation. On pourrait devoir ajuster l'humidité [14] (v. § 2.3.5).

Le pH du substrat d'entretien et d'acclimatation des organismes d'expérience devrait se situer près de la neutralité, pour ne pas stresser les organismes. On peut l'ajuster (v. § 2.3.5), au besoin, pour l'amener dans un intervalle convenable (c'est-à-dire de 6,0 à 7,5).

2.4.6 Alimentation

Les vers placés dans une ou plusieurs enceintes d'entretien et d'acclimatation devraient être nourris pendant cette période, soit avec des flocons d'avoine cuits, soit avec de la luzerne hydratée (v. § 2.3.6). On devrait nourrir une fois par semaine ceux que l'on garde plus longtemps. On devrait suivre les conseils du § 2.3.6 concernant la préparation et la distribution de la nourriture. On devrait suivre les conseils du § 2.3.8 pour l'alimentation d'*E. andrei* pendant la période d'acclimatation précédant un essai d'une durée de 8 semaines (§ 4.3).

2.4.7 Manipulation et maintien des organismes

Les conseils du § 2.3.7 s'appliquent à la manipulation et au maintien des vers gardés au laboratoire avant d'être employés dans des essais de toxicité. Si la période d'entretien et d'acclimatation excède 7 jours, on devrait manuellement retourner le contenu de chaque enceinte immédiatement avant chaque repas hebdomadaire. On devrait alors observer et consigner l'état apparent du substrat de la litière et des vers. On devrait se débarrasser de tout animal mort, blessé ou d'apparence atypique (c'est-à-dire léthargique).

On devrait limiter le chargement des vers dans chaque enceinte d'entretien ou d'acclimatation pour prévenir une surpopulation et les effets négatifs qui en découlent pour l'état, les performances et la santé des vers. La valeur maximale du chargement de 0,03 g/cm^3 que recommande

13. La température optimale d'entretien de *L. terrestris* au laboratoire et de réalisation des essais de toxicité aiguë avec cette espèce serait d'au plus 15 °C (Sheppard, 1994). Cependant, l'expérience montre que, avec *L. terrestris*, on peut facilement satisfaire au critère de validité de l'essai de létalité d'une durée de 14 jours (v. § 4.1.3) ou de l'essai sublétal de réaction aiguë d'évitement (v. § 4.2.3) lorsque ces vers sont acclimatés et exposés expérimentalement à une température de 20 ± 2 °C, même s'ils ont été gardés à une température inférieure, puis amenés graduellement à la température de l'essai pendant au moins 6 h (Stephenson, G.L., Aquaterra Environmental, Orton, ON, communication personnelle, 2001). En conséquence, et pour réduire au minimum les exigences relatives à l'acclimatation tout en facilitant l'emploi d'une température unique d'essai pour chacune des espèces de vers de terre et chacun des essais définis dans le présent document, on peut garder longtemps les *L. terrestris* dans une gamme de températures inférieures à celles qui serviront dans un essai de toxicité, à condition que les amener graduellement à la température de l'essai (20 ± 2 °C) en au moins 6 h, avant leur transfert dans les enceintes expérimentales. On peut aussi acclimater plus longtemps les *L. terrestris* à la température de l'essai après leur réception au laboratoire avant de les transférer dans les enceintes expérimentales. Dans chaque cas, on devrait garder les vers dans le laboratoire d'essais pendant au moins 7 jours avant les essais, pour s'assurer qu'ils se sont remis du stress de leur capture et de leur transport.

14. Si on observe des particules de sol adhérant aux vers, c'est que le sol est trop sec et qu'on devrait en augmenter l'humidité.

l'ASTM (1999b) pour les élevages d'*E. andrei/fetida* (v. § 2.3.7) devrait servir de guide à cet égard. Si la période de conservation des vers au laboratoire est prolongée (par ex. plusieurs mois) et si la densité des vers augmente pendant cette période, on devrait prévenir la surpopulation en divisant la population d'une enceinte de d'entretien et d'acclimatation et en y ajoutant de la nouvelle litière (v. § 2.3.7).

Si on maintient les vers dans une enceinte d'entretien ou d'acclimatation au laboratoire pendant 2 ou 3 mois ou plus, on devrait renouveler la litière à tous les 2 ou 3 mois, peu importe le chargement de vers. On devrait, à cette fin, suivre les conseils donnés dans le § 2.3.7.

Au début de la période ou des périodes d'entretien et d'acclimatation, on devrait mesurer et consigner la température, le pH et l'humidité du substrat de chaque enceinte d'entretien et d'acclimatation. On devrait mesurer hebdomadairement chacune de ces variables de la qualité des sols, si la période d'acclimatation excède 7 jours, et on devrait ajuster ces paramètres au besoin.

2.4.8 Vers destinés aux essais de toxicité

Tous les vers utilisés dans un essai de toxicité d'un sol doivent sembler en bonne santé et être de tailles semblables. En outre, on doit les avoir entretenus et acclimatés conformément aux modes opératoires et aux conditions exposés dans le présent document (§ 2.4.1 à 2.4.7). Dans le cas d'*E. andrei/fetida*, chaque ver destiné à un essai de toxicité doit avoir un poids frais se situant dans l'intervalle précisé au § 2.1. Au début d'un essai de toxicité, chaque *L. terrestris* doit avoir un poids frais se situant entre 3 et 10 g. Les animaux utilisés dans un essai de toxicité doivent satisfaire à des indices précis de santé et de performance (§ 2.4.9).

Les conditions et modes opératoires de l'acclimatation propres à chaque essai, qui sont décrits dans le § 2.3.8, s'appliquent aux *Eisenia* spp. d'élevage en vue d'un essai de létalité aiguë, d'un essai de réaction aiguë d'évitement ou d'un essai d'une durée de 8 semaines pour la mesure des effets sur la survie, la reproduction et la croissance. Les conditions d'éclairage et de température applicables à l'acclimatation des *L. terrestris* capturés sur le terrain et destinés à un essai de létalité aiguë ou à un essai de réaction aiguë d'évitement sont décrites dans les § 2.4.3 et 2.4.4.

Tout *E. andrei* obtenu d'un élevage de l'extérieur pour un essai de toxicité d'une durée de 8 semaines visant à mesurer les effets d'une exposition prolongée sur la survie, la reproduction et la croissance (§ 4.3), doit être acclimaté aux conditions de l'essai de toxicité dans le laboratoire pendant au moins 7 jours. Il faut également suivre les conseils applicables des § 2.3.8 et 2.4. Si les vers de terre destinés à un essai de toxicité aiguë ou à un essai de toxicité d'une durée de 8 semaines proviennent d'un fournisseur du commerce, il est fortement conseillé de les acclimater au laboratoire pendant au moins 14 jours avant de les employer dans l'essai.

2.4.9 Indices de santé et de performances

Au moins une fois par semaine, on devrait vérifier chaque enceinte d'entretien et d'acclimatation et, alors, surveiller et consigner l'état des vers et du substrat qui s'y trouvent (v. § 2.4.7). On devrait évaluer régulièrement et ajuster au besoin à leur valeur optimale les modes opératoires et les conditions de maintien des vers dans chaque enceinte d'entretien et d'acclimatation. On devrait se débarrasser de tout jeune ou adulte qui semble mort, inactif, qui ne fouit pas dans le substrat de la litière ou qui, par ailleurs, semble en mauvaise santé ou atypique. Si plus de 20 % des vers jeunes ou adultes d'une enceinte de conservation ou d'acclimatation semblent morts, inactifs ou en mauvaise santé durant une période quelconque d'observation, il faut se débarrasser du contenu complet de l'enceinte.

Il faut mesurer, à l'aide d'un essai de toxicité de référence d'une durée de 7 jours (v. § 4.1.8) la sensibilité de chaque groupe de vers acclimatés que l'on utilise dans un essai définitif de toxicité d'un sol. Idéalement, cet essai devrait être exécuté en même temps que chaque essai définitif de toxicité d'un sol. Cependant, les laboratoires effectuant régulièrement des essais de toxicité des sols employant des vers *E. andrei/fetida* ou *L. terrestris* en bonne santé, acclimatés aux conditions de laboratoire (conformément aux § 2.4.1 à 2.4.8) et gardés longtemps (des mois) au laboratoire peuvent opter plutôt pour des essais de toxicité de référence réguliers (c'est-à-dire au moins mensuels), à l'aide d'une partie de la population ou des populations de vers conservées en vue des essais définitifs de toxicité des sols. Tous les essais employant un ou des toxiques de référence devraient être effectués dans les conditions et selon les modes opératoires exposés au § 4.1.8.

Les critères expérimentaux de validité d'un essai particulier de toxicité d'un sol (et, indirectement, de la

santé de la population des vers acclimatés) fondés sur les performances des organismes en expérience dans le *sol témoin négatif* sont exposés dans les § 4.1.3, 4.2.3 et 4.3.3.

Système expérimental

3.1 Installations et appareillage

On peut effectuer les essais dans une chambre climatique ou dans une installation équivalente, possédant des moyens acceptables régulation de la température et de l'éclairage (v. § 4.1.2, 4.2.2 et 4.3.2). Le laboratoire d'essais devrait être bien ventilé pour empêcher l'exposition du personnel à des émanations nocives et être isolé des causes physiques de perturbation ou de tout contaminant qui pourrait nuire aux organismes en expérience. Le local de préparation des sols à l'étude devrait également être aéré convenablement.

Le laboratoire d'essais devrait être isolé de l'élevage de vers (§ 2.3) ou du local où ils sont entretenus et acclimatés (§ 2.4), pour éviter une éventuelle contamination. En outre, le laboratoire devrait être éloigné des lieux d'entreposage et de préparation des échantillons, pour prévenir une éventuelle contamination des enceintes expérimentales et de leur contenu par ces sources. Le système de ventilation devrait être conçu, inspecté et exploité de façon à empêcher l'air de l'intérieur du laboratoire de contaminer les installations d'élevage ou d'entretien et d'acclimatation. L'air vicié des installations de manutention et d'entreposage des échantillons ou de traitement ou d'essai des produits chimiques ne devrait pas être dirigé vers les locaux d'essais du laboratoire.

Tout matériau pouvant entrer en contact avec les organismes, l'eau ou les enceintes expérimentales de cette installation doit être non toxique (v. § 2.3.2) et devrait se prêter le moins possible à la sorption de substances chimiques. On devrait utiliser chaque fois que c'est possible le verre borosilicaté, le nylon, le polyéthylène et le polystyrène haute densité, le polycarbonate, les plastiques fluorés et l'acier inoxydable 316 pour réduire au minimum la sorption et la désorption de substances.

Le laboratoire d'essais doit être doté des instruments de base nécessaires à la surveillance de la qualité (par ex. température et pH) du *sol à l'étude* et de *l'eau d'essai (d'hydratation)* à employer avec ce sol. En outre, il devrait être équipé d'appareils assurant l'analyse rapide et fidèle de l'humidité des sols à l'étude. Entre autres appareils nécessaires, mentionnons : une étuve, qui peut être réglée à 90 °C, pour dessécher les organismes d'expérience, et à 105 °C, pour assécher les sols ; une balance précise à 0,1 mg près ; un pH-mètre. Il faut, lors de la préparation des mélanges et des aliquotes de sol à l'étude, de l'équipement de protection, notamment un respirateur doté d'un appareil de protection contre les poussières, des gants, des vêtements de laboratoire et des verres pour la protection des yeux.

Toutes les enceintes expérimentales, tout l'équipement et toutes les fournitures qui pourraient entrer en contact avec les sols d'emplacements à l'étude, les sols à l'étude, l'eau d'essai (d'hydratation), les *solutions mères* ou les solutions filles (d'essai) doivent être propres et avoir été rincés à l'eau désionisée ou à l'eau distillée (c'est-à-dire à l'*eau d'essai*) avant usage. Après usage, on devrait laver tous les matériaux réutilisables. On recommande de procéder comme suit pour le nettoyage (EC, 1997a, b, 2001) :

1. Faire tremper dans l'eau du robinet (avec ou sans détersif) pendant 15 minutes, puis nettoyer à fond au détersif ou laver dans un lave-vaisselle automatique ;
2. Rincer deux fois à l'eau du robinet ;
3. Rincer soigneusement à l'acide nitrique (HNO_3) ou chlorhydrique (HCl) fraîchement préparé, dilué (10 %, v/v[15]), garanti sans métal, pour supprimer le tartre, les métaux et les bases ;
4. Rincer deux fois à l'eau désionisée (ou à une autre eau d'essai) ;
5. Rincer une fois à l'acétone non diluée, de qualité convenant à l'analyse des pesticides, pour éliminer les composés organiques, et à l'hexane de qualité « réactif » (par ex. de qualité « CLHP », pure à 98,5 %, au moins) pour éliminer les résidus huileux (travailler sous hotte)[16] ;
6. Laisser le solvant organique se volatiliser de la

15. Pour préparer une solution d'acide à 10 %, ajouter soigneusement 10 ml d'acide concentré à 90 ml d'eau désionisée.

16. Il n'est pas recommandé de rincer le plexiglas à l'acétone ni à l'hexane, qui peuvent l'attaquer, le piqueter et l'opacifier.

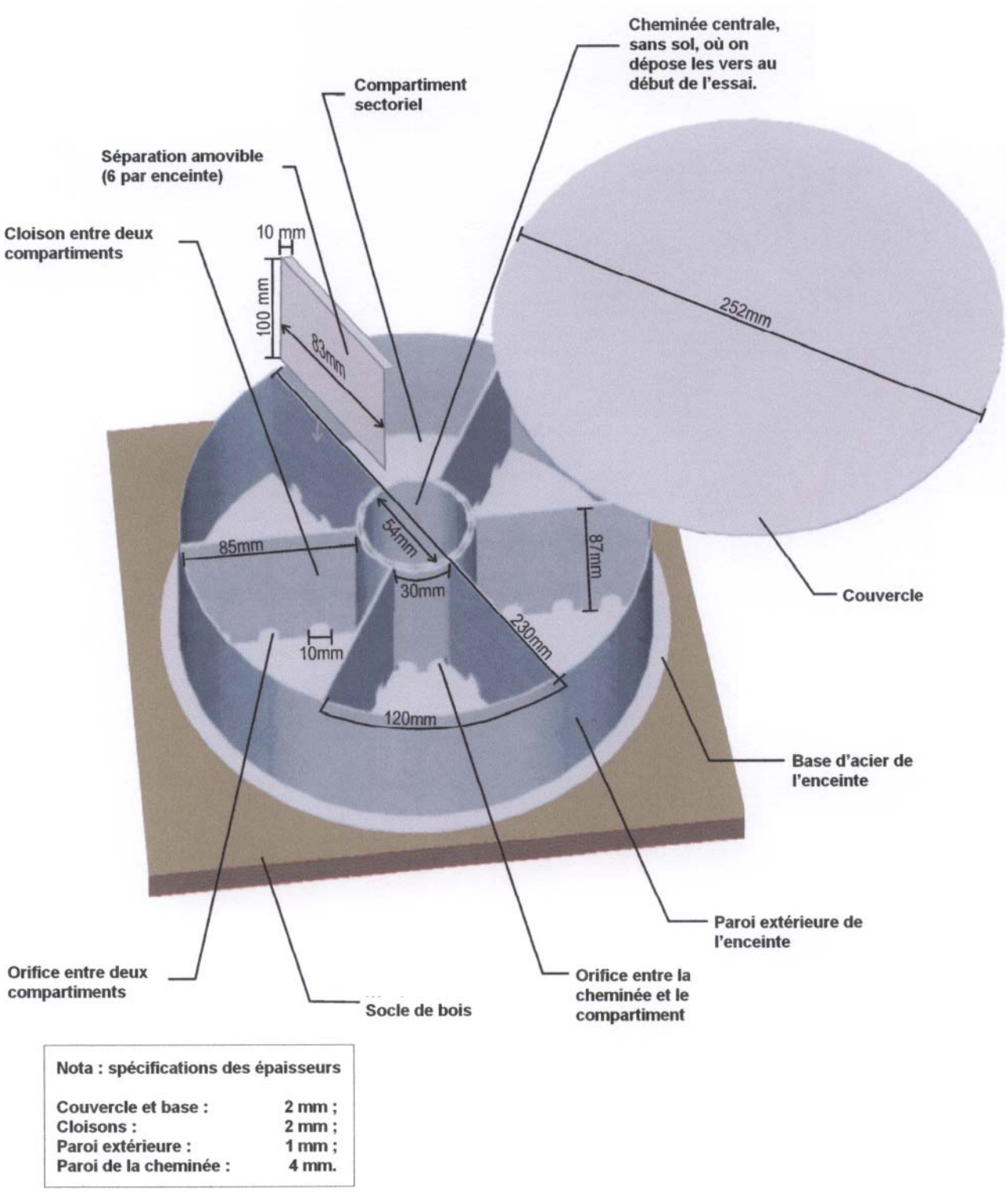


Figure 2. — Caractéristiques recommandées de l'enceinte devant servir à l'essai de réaction aiguë d'évitement employant des vers de terre (*E. andrei, E. fetida* ou *L. terrestris*) dans un sol *non contaminé* ou contaminé

verrerie sous la hotte et relaver la verrerie (en frottant au besoin) au détersif ;

7. Rincer trois fois à l'eau désionisée (ou à toute autre eau d'essai).

On devrait rincer à fond les enceintes expérimentales et l'appareillage susceptibles d'entrer en contact avec le sol ou l'eau d'essai (d'hydratation) avec de l'eau d'essai, immédiatement avant de les utiliser dans l'essai.

3.1.1 Essais initiaux

Avant d'effectuer pour la première fois des essais définitifs de toxicité d'un sol selon l'une des méthodes exposées dans les § 4.1, 4.2 ou 4.3, il est recommandé d'effectuer au moins cinq essais témoins pour déterminer la réaction des animaux témoins, en employant au moins un échantillon de sol artificiel ou naturel non contaminé, destiné (ou que l'on envisage de destiner) à servir de *sol témoin négatif* dans au moins un essai définitif de toxicité de ce sol (v. § 3.2). En outre, le personnel du laboratoire devrait entreprendre au moins cinq essais de toxicité de référence utilisant au moins un échantillon d'un sol témoin négatif naturel ou artificiel que l'on envisage d'utiliser régulièrement à cette fin, en même temps que les essais définitifs de toxicité du sol (v. § 4.1.8, 4.2.7 et 4.3.8). Ces essais initiaux sont recommandés afin de confirmer les performances acceptables des espèces retenues pour l'essai (*E. andrei*, *E. fetida* ou *L. terrestris*) dans un tel sol témoin négatif, dans les conditions et modes opératoires d'élevage, d'entretien ou d'acclimatation précisés dans le présent document (v. § 2.3 et 2.4).

Les conditions et modes opératoires de l'exécution de ces essais initiaux employant un sol témoin négatif devraient être identiques et conformes à ceux qui sont exposés dans les § 4.1 (essais de létalité aiguë), 4.2 (essais de réaction aiguë d'évitement) ou 4.3 (essais pour mesurer les effets d'une exposition prolongée sur la survie, la reproduction et la croissance). Ces conditions et modes opératoires d'essais initiaux employant un ou plusieurs toxiques de référence devraient être identiques et conformes à ceux du § 4.1.8. Chaque essai employant un *sol témoin négatif* ou *un ou des toxiques de référence* devrait employer un lot différent d'organismes de la même espèce de la même source.

Les résultats des essais (≥5) de détermination de la réaction des animaux doivent montrer que le ou les critères de validité (v. § 4.1.3, 4.2.3 et 4.3.3) peuvent être respectés pour l'espèce que l'on prévoit d'utiliser avec un sol naturel ou artificiel destiné à servir de sol témoin négatif dans un essai définitif de toxicité du sol. Les résultats des essais initiaux de toxicité de référence (≥5) devraient être comparés par calcul et évaluation du coefficient de variation des séries respectives d'essais et des valeurs des effets mesurés (paramètres ultimes).

3.1.2 Essai de létalité aiguë

Les enceintes expérimentales sont des bocaux de verre (par ex. à conserve Mason) d'une capacité de 500 mL. Chaque bocal doit être nettoyé à fond avant et après usage et être bien rincé à l'eau désionisée ou à une autre eau d'essai immédiatement avant usage. On devrait recouvrir chaque enceinte expérimentale d'une nouvelle pellicule de matériau transparent ou translucide (par ex. saran ou Parafilm[MD]), perforée d'au moins 5 trous minuscules (par ex. ~ 1 à 2 mm de diam.) [afin de réduire au minimum l'évaporation et de permettre l'échange d'air], fixée autour de l'embouchure de chaque bocal au moyen d'une bande élastique.

3.1.3 Essai de réaction aiguë d'évitement

L'appareillage recommandé pour cet essai avec des vers de terre est montré dans la fig. 2 [17]. Chaque enceinte expérimentale consiste en un récipient circulaire, d'un diamètre extérieur d'environ 230 mm, muni d'une cheminée centrale, d'un diamètre intérieur d'environ 54 mm, entourée de 6 compartiments sectoriels reliés entre eux, d'une capacité d'environ 350 mL de sol. Des orifices de 1 cm de diamètre percés dans le bas de la paroi de la cheminée (deux par compartiment) et des cloisons latérales de chaque compartiment (trois par côté) permettent le libre mouvement des vers entre la cheminée (dépourvue de substrat) et les compartiments renfermant les sols à l'étude et entre les compartiments. On a besoin d'un jeu de six séparations amovibles, de tôle d'acier rigide (v. fig. 2 pour la représentation et les dimensions) pour les glisser le long

---

17. L'appareillage expérimental est en l'occurrence une « enceinte de Kaushik », du nom de l'inventeur (N. Kaushik, Département de biologie environnementale, Guelph, Ont., communication personnelle, 1995). Le prototype a été utilisé au début des années 1960 pour étudier la préférence des oligochètes aquatiques à l'égard de sédiments de différentes granulométries. La conception en a été modifiée pour s'adapter aux espèces de vers terrestres de plus grande taille.

Le schéma de la fig. 2 donne les dimensions d'une enceinte en acier inoxydable ; les dimensions de l'appareillage en plexiglas sont semblables.

de chaque cloison, de façon à séparer les compartiments à la fin de l'essai (§ 4.2.6).

L'appareillage est construit de tôle d'acier de qualité (1 à 4 mm d'épaisseur) ou de feuilles de plexiglas (5 à 6 mm d'épaisseur) et comporte un couvercle amovible (également de l'un des deux matériaux) qui n'est pas étanche et permet l'aération des compartiments. Il est recommandé d'employer l'appareillage d'acier inoxydable avec les sols contaminés ou additionnés de composés organiques (particulièrement de produits pétroliers), puisque ce matériau absorbe moins les substances organiques que le plexiglas et qu'on peut le rincer à l'acétone et/ou l'hexane sans dommages. Il est recommandé d'employer l'appareillage de plexiglas avec les sols contaminés par les métaux lourds.

Il faut au moins 5 enceintes expérimentales pour chaque essai de toxicité d'un sol à une ou à plusieurs concentrations, et on en recommande davantage (par ex. 6 à 10) pour chaque essai à plusieurs concentrations (v. § 4.2.1). Chaque enceinte doit être nettoyée à fond avant et après usage et être bien rincée à l'eau désionisée ou à une autre eau d'essai immédiatement avant usage.

3.1.4 Essai pour mesurer les effets d'une exposition prolongée sur la survie, la reproduction et la croissance

Les enceintes expérimentales sont des bocaux de verre (par ex. à conserve Mason), d'une capacité de 500 mL. Au § 3.1.2, on donne des conseils sur le nettoyage de chaque bocal avant et après usage et sur leur obturation.

3.2 Sol témoin négatif

Chaque essai de toxicité d'un sol doit comprendre un *sol témoin négatif* comme *variante expérimentale*. C'est un sol essentiellement exempt de tout contaminant susceptible de nuire aux vers de terre pendant l'essai. Son emploi permet de mesurer l'acceptabilité de l'essai, de révéler l'état de santé et les performances des organismes en expérience, de s'assurer du caractère convenable des conditions expérimentales et des modes opératoires et il sert de base à l'interprétation des données obtenues sur les sols à l'étude.

Un essai de toxicité peut utiliser un sol naturel *non contaminé* et/ou un sol artificiel comme sol témoin négatif. Le choix du sol témoin négatif approprié dépend de considérations telles que le plan de l'étude, les caractéristiques physicochimiques du ou des sols à l'étude et la disponibilité d'un sol naturel *non contaminé*, aux propriétés acceptables [18]. On devrait également posséder des preuves expérimentales préalables selon lesquelles le sol choisi pour servir de sol témoin négatif satisfera constamment et de façon fiable aux critères de validité des essais définis dans le présent document à l'égard de chaque méthode d'essai (§ 4.1.3, 4.2.3 et 4.3.3).

Les méthodes d'essai décrites dans la présente publication ont été élaborées et éprouvées à l'aide de 5 sols témoins négatifs possédant diverses caractéristiques physicochimiques (Aquaterra Environmental, 1998a ; Stephenson *et al.*, 1999a, b, 2000a ; Aquaterra Environmental et ESG, 2000 ; ESG 2000, 2001, 2002 ; ESG et Aquaterra, 2002). Ces sols *non contaminés* comprenaient un sol artificiel et quatre sols naturels (c'est-à-dire des échantillons de sols agricoles loameux sableux et loameux limoneux du sud de l'Ontario, d'un sol de prairie loameux argileux de l'Alberta et d'un sol forestier loameux du nord de l'Ontario, dans le Bouclier canadien). La composition de ces sols différait quant aux caractéristiques physicochimiques susceptibles d'influer sur le devenir et les effets des contaminants. Tous les sols prélevés sur le terrain provenaient de lieux non contaminés, qui n'avaient pas été exposés à une application directe de pesticide au cours des années antérieures récentes et qui, par conséquent, étaient considérés comme non contaminés. L'origine et les caractéristiques physicochimiques de ces sols naturels sont en outre décrits dans l'annexe H. Les critères de validité des essais employant des *Eisenia* spp. ou *L. terrestris* et décrits dans les § 4.1.3, 4.2.3 et 4.3.3 se fondent sur les données relatives aux performances de ces vers dans un sol témoin négatif, obtenues dans chacun de

18. Le CCME consacre un site exhaustif aux Recommandations canadiennes pour la qualité de l'environnement, y compris les sols : www.ccme.ca. On y trouve des renseignements utiles à l'examen des résultats des analyses (par ex. concentrations de métaux ou d'HAP) d'échantillons prélevés dans un lieu que l'on envisage d'utiliser comme source d'un sol naturel, pouvant servir de témoin négatif dans les essais de toxicité. À l'adresse www.ccme.ca/assets/pdf/e1_06.pdf, on peut accéder directement au tableau sommaire des recommandations en question. Ces sites et les liens associés aideront à l'examen des caractéristiques physicochimiques de sols naturels vraisemblablement non contaminés que l'on envisage d'utiliser comme témoins négatifs. On peut également contacter le CCME, sans frais, au 1-800-805-3025 ou info@ccme.ca.

ces cinq sols (Aquaterra Environmental, 1998a ; Stephenson *et al.*, 1999a, b, 2000a ; Aquaterra Environmental et ESG, 2000 ; ESG 2000, 2001, 2002 ; ESG et Aquaterra, 2002).

3.2.1 Sol naturel

Le sol témoin négatif peut être un sol naturel, prélevé en un endroit *non contaminé*, réputé pour ne pas avoir été exposé à des applications de pesticides ou d'engrais pendant les cinq années antérieures. L'origine de ce *sol témoin négatif* pourrait être la même que celle du lieu de capture des vers de terre pour établir un élevage ou obtenir des organismes d'expérience (§ 2.2). Avant d'utiliser un échantillon de sol *non contaminé* prélevé sur le terrain en tant que *sol témoin négatif* dans un essai définitif de toxicité, le laboratoire doit posséder des preuves expérimentales montrant que le sol naturel de cette source peut satisfaire aux critères de validité des résultats d'un essai de toxicité (v. § 4.1.3, 4.2.3 et 4.3.3).

En conséquence, il faut effectuer des essais préliminaires avec un échantillon de ce sol employant des vers de terre de l'espèce destinée à servir dans l'essai afin de confirmer que les organismes de cette espèce sont capables de satisfaire au(x) critère(s) de validité de l'essai qui s'applique(nt) à la méthode ou aux éventuelles méthodes expérimentales. Ensuite, en supposant que les résultats de ces dosages biologiques préliminaires sont satisfaisants, il est recommandé d'analyser des échantillons de sols naturels choisis pour éventuellement servir de *sols témoins négatifs* dans des essais de toxicité (de même que des échantillons du *sol* candidat *de référence*) relativement aux caractéristiques physicochimiques suivantes :

— pH ;
— répartition granulométrique ;
— *conductivité ;*
— *texture ;*
— *fertilité ;*
— teneur en *carbone organique total* (%) ;
— teneur en *matière organique* (%) ;
— capacité d'échange cationique ;
— principaux cations ;
— azote total ;
— phosphore total ;
— densité apparente ;
— capacité de rétention de l'eau ;
— métaux ;
— hydrocarbures pétroliers (y compris les aromatiques polycycliques) ;
— insecticides organophosphorés ;
— insecticides organochlorés ;
— une série d'herbicides.

Les concentrations de pesticides et de métaux ne devraient pas excéder celles qui sont exposées dans les *Recommandations canadiennes pour la qualité des sols*, si elles s'appliquent (v. note 18). Si les résultats des essais biologiques et des analyses physicochimiques préliminaires sont satisfaisants, on peut prélever un plus gros échantillon de ce sol naturel, le faire sécher à l'air pour fixer son humidité entre 10 et 20 %, le passer sur un tamis à mailles larges (4 à 6 mm), le transférer dans des seaux de plastique propres et le conserver à l'obscurité à 4 ± 2 °C jusqu'au moment de l'utilisation.

3.2.2 Sol artificiel

Le *sol témoin négatif* peut être un sol artificiel préparé au laboratoire. Son emploi offre une solution normalisée, cohérente et avantageuse pour l'essai de la toxicité de substances ou de produits chimiques additionnés à un *sol témoin négatif* (section 6).

La préparation d'un sol artificiel utilisé à l'échelle internationale dans divers essais de toxicité des sols avec des vers de terre est très semblable. L'annexe F (tableaux 3, 4 et 6) expose sommairement la composition et la préparation d'un sol artificiel recommandé par divers organismes (OECD, 1984 ; USEPA, 1989 ; ISO, 1993, ASTM, 1999b ; EC, 2000b) pour servir de *sol témoin négatif* dans des essais de létalité d'une durée de 14 jours employant des vers de terre.

L'annexe G (tableaux 4, 5 et 6) résume la composition et la préparation du sol artificiel dont l'ISO (1991, 1998) et l'OCDE (OECD, 2000) recommandent l'utilisation comme *sol témoin négatif*, dans les essais de laboratoire visant à mesurer les effets d'un sol contaminé sur la reproduction des vers de terre.

Conformément à la composition du sol artificiel utilisé par l'OCDE (OECD,1984, 2000), l'USEPA (1989), l'ISO (1991, 1993, 1998) et l'ASTM (1999b), on devrait utiliser les ingrédients suivants pour préparer le sol artificiel à utiliser dans les méthodes d'essai biologiques décrites dans le présent document :

- 10 % de tourbe à sphaignes, séchée à l'air et passé sur un tamis à mailles de 2 mm (ASTM, 1999b) ;

- 20 % d'argile kaolinique, d'une granulométrie inférieure à 40 µm (ASTM, 1999b) ;
- 70 % de sable de silice 70 (USEPA, 1989 ; ASTM, 1999b).

On devrait mélanger à fond les ingrédients, à sec, à l'aide d'un agitateur mécanique ou à la main, gantée [19]. On devrait ajouter au mélange sec du carbonate de calcium de qualité « réactif » en quantité suffisante pour que le pH du sol artificiel se situe entre 6,0 et 7,5, une fois hydraté [20]. Ensuite, on devrait hydrater graduellement le mélange, avec de l'*eau d'essai* (c'est-à-dire de l'eau désionisée ou distillée) jusqu'à ce que son humidité soit d'environ 20 % (ce qui est à peu près 28 % de la *capacité de rétention en eau*), tout en poursuivant le mélange jusqu'à ce que le sol soit d'une texture et d'une couleur visiblement uniformes. Au besoin, on devrait ajouter du carbonate de calcium de qualité « réactif » au mélange hydraté, en quantité suffisante pour maintenir un pH variant de 6,0 à 7,5. On devrait conserver les échantillons de sol artificiel au pH ajusté à l'obscurité, à 20 ± 2 °C pendant au moins trois jours avant de les utiliser dans un essai de toxicité, pour laisser suffisamment de temps à l'équilibration du pH [20]. Ensuite, on peut entreposer le sol artificiel à 4 ± 2 °C. Quand on en aura besoin pour un essai de toxicité du sol, on devrait hydrater une quantité suffisante du sol artificiel entreposé avec de l'eau d'essai, pour en relever l'humidité à environ 70 % de la capacité de rétention en eau.

3.3 Sol témoin positif

On recommande d'employer au moins un échantillon de *sol témoin positif* dans chaque série d'essai de toxicité d'un sol avec les vers de terre, pour aider à l'interprétation des résultats des essais. On veut ainsi provoquer chez les organismes en expérience une réaction prévisible, à la lumière d'essais antérieurs de toxicité ayant employé cette matière. Le sol témoin positif pourrait être un échantillon de sol témoin négatif que l'on a additionné d'un toxique de référence, sur la toxicité duquel à l'égard des vers de terre on possède des données que l'on a rassemblées à la faveur de conditions expérimentales et des modes opératoires spécifiés. Pour chacune des trois méthodes d'essai biologique décrites dans le présent document, il faut utiliser au moins un toxique de référence comme *sol témoin positif* pour évaluer la sensibilité des organismes ainsi que la précision et la fiabilité des résultats obtenus par le laboratoire sur cette matière (v. § 4.1.8, 4.2.8 et 4.3.8). Un essai pourrait également comprendre un échantillon de sol témoin négatif (naturel ou artificiel ; v. § 3.2) ayant été additionné, à des fins expérimentales (section 6) d'une ou de plusieurs substance ou produits

---

19. Il est recommandé de mélanger d'abord les ingrédients secs (pour incorporer le carbonate de calcium) à l'aide d'un agitateur mécanique. On devrait parachever le mélange à la main gantée, pour s'assurer que tout le sol se trouvant dans les encoignures du récipient est bien mélangé. Le personnel doit prendre les précautions convenables pour se protéger contre l'inhalation et le contact de ces ingrédients.

20. La quantité de carbonate de calcium ($CaCO_3$) nécessaire pour ajuster le pH dans cet intervalle dépend de la nature (c'est-à-dire de l'acidité) des ingrédients (et, notamment, de la tourbe à sphaignes). De 10 à 30 g de $CaCO_3$ par kilogramme de tourbe pourraient convenir. On peut observer un pH de 4,5 à peine dans le sol mélangé sans ajout de $CaCO_3$. Dans un premier ajustement du pH, on devrait tenter d'élever ce dernier dans l'intervalle de 7,0-7,5, puisque le pH du sol artificiel diminue légèrement (à 6,5-7,0) pendant les trois jours d'équilibration, avant de se stabiliser. On devrait vérifier régulièrement (par ex. une fois toutes les deux semaines) le pH des échantillons entreposés de sol artificiel pour s'assurer qu'il ne s'est pas radicalement altéré ; on devrait apporter les corrections nécessaires en ajoutant des quantités supplémentaires de $CaCO_3$ (Aquaterra Environmental, 1998a ; Stephenson, G.L., Aquaterra Environmental, Orton, ON, communication personnelle, 2001).

On peut aussi conserver un mélange sec de sol artificiel préparé, que l'on hydratera partiellement pour que son taux d'humidité soit d'environ 20 %, qu'on entreposera ensuite à 20 ± 2 °C pendant au moins 3 jours, puis que l'on hydratera encore pour en amener le taux d'humidité à environ 70 % de la capacité de rétention en eau, quand on en aura besoin pour un essai de toxicité. Si on entrepose le sol artificiel préparé à l'état sec, il faut l'hydrater partiellement (à un taux d'humidité d'environ 20 %) puis le laisser se stabiliser ensuite (pendant au moins 3 jours) pour assurer des conditions d'équilibre du pH semblables à celles qui sont recommandées dans la présente méthode, relativement à l'utilisation d'un sol artificiel entreposé à l'état partiellement hydraté. Si l'on prend cette option, l'entreposage provisoire à l'état partiellement hydraté est nécessaire au sol artificiel pour permettre l'ajout d'une plus grande quantité d'eau (et, dans certains cas, l'ajout d'une solution chimique), au besoin, lorsque l'on ajuste le pH et l'humidité finals (c'est-à-dire à 70 % environ de la capacité de rétention en eau) du sol artificiel. L'entreposage d'un sol artificiel partiellement hydraté plutôt que sec est considéré comme préférable, puisque cela permet au personnel du laboratoire d'hydrater plus rapidement ce sol au taux voulu d'humidité (c'est-à-dire à environ 70 % de la capacité de rétention en eau) tout en assurant l'équilibre du pH et cela réduit tout retard qu'entraîne l'entreposage du sol artificiel à l'état sec.

chimiques toxiques présentant un intérêt particulier pour l'évaluation de l'échantillon ou des échantillons de sol à l'étude, à une concentration toxique pour les vers de terre, selon la méthode d'essai biologique à utiliser. Dans certains cas, l'essai pourrait comprendre un sol témoin positif constitué d'un échantillon fortement contaminé de sol ou de boue prélevé sur le terrain s'étant révélé constamment toxique pour les vers de terre selon la méthode d'essai biologique à utiliser.

3.4 Sol de référence

On pourrait inclure un ou plusieurs échantillons de *sol de référence* dans un essai de toxicité d'un sol employant des vers de terre [21]. Le type et la nature de l'échantillon ou des échantillons de sol utilisé comme sol de référence dans une étude particulière dépendent du plan d'expérience et des objectifs de l'étude. Si on étudie la toxicité des échantillons de sol prélevés sur le terrain dans un lieu effectivement ou potentiellement contaminé, le sol de référence englobé dans l'étude pourrait être constitué d'au moins un échantillon de sol prélevé sur le terrain, dans un endroit *non contaminé*, où les propriétés physicochimiques (par ex. la teneur en carbone organique, la teneur en matière organique, la répartition granulométrique, la texture, le pH) représentent autant que possible l'échantillon ou les échantillons de sol à l'étude (contaminé). Idéalement, on prélève le sol de référence près du lieu ou des lieux de prélèvement des échantillons de sol à l'étude, mais à l'écart de la ou des sources de contamination. On pourrait choisir un ou plusieurs échantillons de sol de référence *non contaminé* prélevé sur le terrain, loin du ou des lieux à l'étude, en raison de son innocuité, avérée au cours d'essais antérieurs ayant employé des vers de terre, et de ses caractéristiques physicochimiques, semblables à celles des échantillons du sol à l'étude. L'échantillon ou les échantillons de sol de référence prélevés sur le terrain, utilisés dans une étude, pourraient être soumis à un essai pour leurs effets toxiques uniquement à l'état non dilué ou on pourrait les mélanger avec l'échantillon ou les échantillons de sol à l'étude pour préparer une série de dilutions à englober dans un essai à plusieurs concentrations [22] (v. § 3.5 et 5.5, de même que les remarques liminaires de la section 4). Les échantillons de sol de référence ne devraient pas être prélevés dans des endroits que l'on sait avoir reçu des applications de pesticides ou d'engrais au cours des cinq années antérieures, au moins.

On pourrait choisir d'englober un ou plusieurs échantillons de sol artificiel comme *sol de référence* dans un essai particulier. Par exemple, on pourrait utiliser ces échantillons dans des essais à plusieurs concentrations, avec des sols d'emplacements à l'étude ou des sols additionnés d'une substance pour étudier l'influence de certaines caractéristiques physicochimiques (par ex. un certain nombre de sols de référence artificiels préparés pour fournir une gamme de valeurs pour la texture et/ou le taux de matière organique ; Sheppard et Evenden, 1998 ; Stephenson *et al.*, 2002) sur la toxicité du sol d'un emplacement à l'étude contaminé ou d'un sol additionné d'une substance. On pourrait également utiliser à cette fin des échantillons multiples d'un sol *non contaminé*, prélevé sur le terrain en divers endroits, qui diffèrent nettement, pour ce qui concerne une ou plusieurs caractéristiques physicochimiques. Pour une telle étude, on devrait inclure dans l'essai, sans la diluer (c'est-à-dire du sol de référence à 100 %), une partie de chaque sol de référence employé dans la préparation d'une série de concentrations du sol à l'étude.

Chaque essai employant un ou plusieurs échantillons de sol de référence doit comprendre un échantillon de *sol témoin négatif* (v. § 3.2). Inversement, certains essais (par ex. un essai comportant une série de concentrations d'un sol additionné d'une substance et préparé au moyen d'un sol témoin négatif artificiel ou naturel) n'ont pas besoin d'un échantillon de sol de référence. Pour les essais employant le sol d'un emplacement à l'étude, il est préférable d'inclure un ou plusieurs échantillons de sol de référence d'un lieu voisin, pour les besoins de la

21. Un *sol de référence* prélevé sur le terrain pourrait ne pas convenir à certains essais de toxicité tels que ceux qui emploient des échantillons de boue (section 5) ou de sol additionné d'une substance (section 6). Le tableau 4 de l'annexe F expose sommairement les applications des sols de référence décrites dans certaines autres méthodes d'essai.

22. On pourrait également préparer une série de concentrations à utiliser dans un essai à plusieurs concentrations en employant un sol témoin négatif. Le choix pourrait être influencé par le fait que les sols candidats de référence sont réputés ou non être probablement non toxiques dans l'essai auquel ils doivent être appliqués ou par la volonté de préparer une série de concentrations du sol à l'étude au moyen d'un sol *non contaminé*, dont les caractéristiques (par ex. la texture, la teneur en matière organique) sont presque identiques à celles du sol à l'étude.

comparaison (v. § 5.5) ; la décision de diluer le sol de l'emplacement à l'étude avec le sol de référence (plutôt qu'avec un sol témoin négatif) lors de la préparation de dilutions multiples à des fins expérimentales dépend des objectifs de l'étude.

3.5 Sol à l'étude

Les méthodes d'essai biologique exposées dans le présent document visent à mesurer la toxicité d'un ou de plusieurs échantillons ou mélanges de sol effectivement ou potentiellement contaminé (*sol à l'étude*), en employant des vers de terre. L'échantillon ou les échantillons de sol à l'étude pourraient être soit un sol prélevé sur le terrain, sur un emplacement industriel ou autre auquel on s'intéresse, ou des biosolides industriel ou urbains (par ex. déblais de dragage, boues urbaines d'une station d'épuration des eaux usées, compost ou fumier) dont on envisage l'épandage. On pourrait soumettre à l'essai une seule concentration du sol prélevé sur le terrain (typiquement non dilué) ou en évaluer la toxicité dans un essai à plusieurs concentrations, préparées par mélange de quantités mesurées avec soit un *sol témoin négatif*, soit un *sol de référence* (v. section 5). Le sol pourrait également être constitué d'une ou de plusieurs concentrations d'un sol additionné d'une substance, préparées au laboratoire par mélange d'une ou de plusieurs substances ou produits chimiques avec un *sol témoin négatif*, un *sol de référence* ou le *sol d'un emplacement à l'étude* (v. section 6).

Modes opératoires universels

Les conditions et les modes opératoires généraux décrits dans le présent document à l'égard de chacune des trois méthodes d'essai biologique employant des vers de terre s'appliquent lorsque l'on détermine la toxicité d'échantillons de sols, de déchets particulaires (par ex. de boues) ou de substances chimiques. Ils s'appliquent également aux essais de toxicité de référence connexes. Dans la section 5, on expose des modes opératoires plus particuliers d'essais avec des échantillons prélevés sur le terrain de sols ou d'autres matières particulaires semblables (par ex. de boues, de stériles déshydratés, de résidus de boues de forage, de compost, de biosolides). Dans la section 6, on donne des conseils et on expose les modes opératoires précis permettant d'effectuer les essais avec un *sol témoin négatif* ou d'autres sols additionnés, à des fins expérimentales, d'une ou de plusieurs substances ou produits chimiques.

Dans ces modes opératoires, il faut intégrer tous les aspects du système expérimental décrit dans la section 3. Les conditions et modes opératoires décrits dans la section 2 à l'égard de l'élevage d'*E. andrei/fetida* ou de l'entretien ou de l'acclimatation d'*E. andrei/fetida* ou de *L. terrestris* en vue des essais de toxicité d'un sol s'appliquent également.

Pour tout essai à plusieurs concentrations devant être exécuté conformément aux modes opératoires exposés ci-après (v. § 4.1, 4.2 et 4.3), on devrait choisir les concentrations de façon à couvrir un grand intervalle, c'est-à-dire une faible concentration produisant des effets comme le témoin négatif et une concentration forte qui produit tous les effets ou des effets graves. C'est une erreur répandue que de deviner la concentration correspondant à l'effet à mesurer et à l'encadrer par une série de concentrations très rapprochées, lesquelles se révèlent toutes soit trop faibles, soit trop fortes. Pour conserver le large intervalle de concentrations et, également, pour obtenir les importants effets médians, on pourrait devoir utiliser des variantes expérimentales supplémentaires pour subdiviser plus finement l'intervalle choisi. En tout cas, on devrait utiliser une suite géométrique constante. On trouve, dans EC (2004b), des conseils supplémentaires sur le choix des concentrations d'essai.

4.1 Essai de létalité aiguë

Le tableau 3 présente une liste de contrôle sommaire des conditions et modes opératoires recommandés, d'application universelle, pour chaque essai de létalité aiguë employant des échantillons de sol effectivement ou potentiellement contaminés ainsi que des conditions et modes opératoires recommandés pour l'essai de types précis de matières ou de substances.

Ces matières ou substances pourraient comprendre des échantillons du sol d'un emplacement à l'étude, de biosolides (par ex. déblais de dragage, boues d'une station d'épuration des eaux usées, compost, fumier) ou un *sol témoin négatif* (ou un autre sol, contaminé ou non) enrichi au laboratoire d'une ou de plusieurs substances ou produits chimiques d'essai.

Cette méthode d'essai biologique, qui emploie des vers de terre *subadultes* ou *adultes*, d'un intervalle de poids spécifié (v. § 4.1.1), permet de mesurer la survie en tant qu'effet biologique. Les organismes sont soit des *E. andrei/fetida* élevés en laboratoire (v. § 2.3) ou des vers (*E. andrei/fetida* ou *L. terrestris*) obtenus d'une source extérieure (§ 2.2) et acclimatés aux conditions du laboratoire (§ 2.4) avant de servir dans l'essai. La durée de l'essai est de 14 jours. Pendant l'essai, on ne nourrit pas les vers et on ne renouvelle pas les sols à l'étude. On a appliqué cette méthode et on l'a validée avec le concours de sept laboratoires, dans une série d'essais simultanés à plusieurs concentrations employant du sol artificiel additionné d'acide borique (EC, 2004a)[23].

23. Dans cette série d'essais, chacun des laboratoires a pu obtenir des résultats valides (les taux de survie après 14 jours, dans le sol témoin négatif, étaient d'au moins 90 %). La CL 50 moyenne après 14 jours de l'acide borique (H_3BO_3) additionné au sol artificiel était de 3 524 mg/kg de sol sec (intervalle de 2 228 à 4 677 mg/kg). Le coefficient de variation interlaboratoires des CL 50 était de 25 %, niveau de précision interlaboratoires considéré comme acceptable (EC, 2004a).

Tableau 3. — Liste de contrôle des conditions et des modes opératoires recommandés pour les essais de létalité d'une durée de 14 jours pour la mesure de la toxicité d'un sol pour les vers de terre *Eisenia andrei, Eisenia fetida* ou *Lumbricus terrestris*

Mode opératoire universel

Type d'essai	— Essai de toxicité d'un sol entier, sans renouvellement du milieu (essai en conditions statiques).
Durée de l'essai	— 14 jours.
Organismes utilisés	— *E. andrei, E. fetida* ou *L. terrestris,* jeunes (c'est-à-dire subadultes) ou adultes, dotés d'un clitellum ; poids frais individuels : 250-600 mg (*E. andrei/fetida*) ; 3-10 g (*L. terrestris*) ; 5 *E. andrei/fetida* ou 3 *L. terrestris* par enceinte expérimentale.
Sol témoin négatif	— Selon le plan et les objectifs de l'étude ; sol artificiel ou sol prélevé sur le terrain et *non contaminé* si l'essai porte sur les sols d'emplacements à l'étude ; pour les essais portant sur des substances ou des produits chimiques additionnés à un sol, on recommande d'employer un sol artificiel.
Enceinte expérimentale	— Bocal de verre de 500 ml ; pellicule transparent ou translucide, perforé (par ex. pellicule de saran ou de Parafilm[MD]) assujetti avec une bande élastique.
Quantité de sol dans chaque enceinte	— Poids frais identique, équivalant à un volume d'environ 350 mL ; environ 200 g (poids sec) s'il s'agit d'un sol artificiel.
Humidité des sols à l'étude	— Hydrater le sol au taux optimal de sa capacité de rétention en eau (CRE) si le sol a été prélevé sur le terrain (v. § 5.3) ou à environ 70 % de la CRE, si c'est un sol artificiel.
Nombre de répétitions	— Au moins 5 par variante expérimentale, si l'essai est à concentration unique (par ex. sol d'un emplacement à l'étude, que l'on analyse uniquement non dilué) ; au moins 3 répétitions par variante expérimentale si l'essai, à plusieurs concentrations, emploie *E. andrei/fetida* ; au moins 5 répétitions par variante expérimentale si l'essai, à plusieurs concentrations, emploie *L. terrestris.*
Température	— Moyenne journalière : 20 ± 2 °C ; température instantanée : 20 ± 3 °C.
Éclairage	— Par incandescence ou fluorescent ; intensité : 400-800 lux à la hauteur de la surface du sol dans l'enceinte expérimentale ; photopériode fixe : par ex. 16 ou 12 h.
Alimentation	— Ne pas nourrir les vers.
Mesures effectuées pendant l'essai	— Humidité et pH du sol à chaque variante expérimentale ou concentration : au début et à la fin de l'essai ; température du laboratoire d'essais : journellement ou en continu.
Observations pendant l'essai	— Le nombre de vers vivants dans chaque enceinte aux jours 0, 7 (facultatif) et 14 ; nombre de vers vus à la surface du sol dans chaque enceinte aux jours 0 (c'est-à-dire à 1 h), 7 (facultatif) et 14 ; les symptômes pathologiques évidents (par ex. plaies, altérations de la couleur, segments enflés) ou franches anomalies du comportement (par ex. léthargie, enroulement, absence de fouissement) des vers dans chaque enceinte expérimentale aux jours 0, 7 (facultatif) et 14.
Effet biologique mesuré	— Le nombre de vers vivants dans chaque répétition (c'est-à-dire dans chaque enceinte) aux jours 7 (facultatif) et 14.
Paramètres statistiques	— Taux de survie, dans chaque enceinte et à chaque variante expérimentale ou concentration, aux jours 7 (facultatif) et 14 ; la CL 50 après 7 jours et 14 jours, si l'essai est à plusieurs concentrations.
Validité de l'essai	— Invalide si le taux moyen de survie après 14 jours dans le sol témoin négatif est inférieur à 90 %.

Essai avec un toxique de référence	— À réaliser une fois par mois ou conjointement avec un ou des essais définitifs sur échantillons de sol ; utiliser l'acide borique ; préparer et éprouver au moins 5 concentrations, plus un témoin négatif, en utilisant du sol artificiel comme substrat ; au moins 3 répétitions par concentration et 5 vers par répétition, dans le cas d'*E. andrei/fetida* ; au moins 5 répétitions par concentration et 3 vers par répétition, dans le cas de *L. terrestris ;* se conformer aux conditions et aux modes opératoires d'un essai de létalité aiguë à plusieurs concentrations pour mesurer la toxicité d'un sol, décrits dans le présent document ; déterminer la CL 50 après 7 jours (y compris ses limites de confiance à 95 %) ; exprimer l'effet mesuré en milligrammes d'acide borique par kilogramme sec de vers (mg/kg).
Sol prélevé sur le terrain	
Transport et entreposage	— Conserver dans un récipient de plastique et réduire au minimum l'espace libre ; transporter à l'obscurité (par ex. dans une glacière opaque, un seau de plastique ou un autre récipient opaque) ; ne pas congeler ni surchauffer pendant le transport ; conserver à l'obscurité, à 4 ± 2 °C ; l'essai devrait débuter dans un délai de deux semaines et il doit débuter dans un délai de six semaines, à moins qu'il ne soit établi que les contaminants du sol sont stables.
Sol témoin négatif	— Sol naturel, prélevé sur le terrain, non contaminé ou sol artificiel, pour lequel des essais antérieurs d'une durée de 14 jours, effectués avec l'espèce d'expérience, ont révélé que le taux moyen de survie de cette dernière était d'au moins 90 %.
Sol de référence	— Un ou plusieurs échantillons pour les essais portant sur un sol prélevé sur le terrain ; idéalement, prélevé dans un ou des endroits que l'on présume ne pas être contaminés, mais près du lieu de prélèvement du sol à l'étude ; les caractéristiques notamment le taux de matière organique, la répartition granulométrique, le pH, sont semblables à ceux du ou des sols à l'étude.
Caractérisation des sols à l'étude	— Au moins le taux d'humidité, la CRE, le pH, la conductivité, le taux de carbone organique total (COT), le taux de matière organique et la composition granulométrique (taux de sables, de limons, d'argiles) ; facultativement, les contaminants auxquels on s'intéresse (par ex. métaux, HAP, pesticides).
Préparation des sols à l'étude	— Si nécessaire, retirer les débris et les organismes macroscopiques indigènes à l'aide d'une pincette ; si nécessaire, passer sous pression, au travers d'un tamis au maillage convenable (par ex. 4-6 mm) ; mélanger ; mesurer l'humidité des sols ; hydrater à l'eau désionisée ou distillée (ou, au besoin, déshydrater) pour obtenir le taux optimal de la capacité de rétention en eau (v. § 5.3) ; mélanger ; diluer avec du sol témoin négatif ou du sol de référence, si l'essai est à plusieurs concentrations ; s'assurer de son homogénéité.
Sol enrichi de substance(s) ou de produit(s) chimique(s)	
Sol témoin négatif	— On recommande d'employer un sol artificiel ou du sol prélevé sur le terrain et *non contaminé.*
Caractérisation de la substance ou du produit chimique	— On devrait connaître au préalable la stabilité, la solubilité dans l'eau, la pression de vapeur, la pureté et la biodégradabilité de la substance ou du produit chimique ajouté au sol témoin négatif.
Solvant	— Le solvant préférable est l'eau désionisée ; si on utilise un solvant organique, l'essai doit comprendre un témoin de ce solvant.
Préparation de mélanges	— Le mode opératoire dépend de la nature de la substance ou des substances à analyser ainsi que du plan d'expérience et des objectifs de l'essai ; on peut préparer des mélanges de substances chimiques et de sol par agitation manuelle ou mécanique ; la ou les substances à l'étude peuvent être ajoutées en quantités mesurées en solution (c'est-à-dire dans l'eau ou dans un solvant organique) ou sous forme solide, à l'état pur ou non ; assurer l'homogénéité des mélanges.
Concentration des ajouts dans le mélange de sol	— Normalement, mesurée au début et à la fin de l'essai, en trois titres au moins : élevé, moyen et faible.

4.1.1 Début de l'essai

Chaque enceinte expérimentale (v. § 3.1.2) du laboratoire doit être clairement codée ou étiquetée pour permettre l'identification de l'échantillon et (si celui-ci est dilué) la détermination de sa concentration. La date et l'heure du début de l'essai doivent être notées, soit directement sur les étiquettes ou sur des feuilles séparées de données servant uniquement à l'essai. La disposition des enceintes devrait faciliter les observations et les mesures. Les diverses variantes expérimentales devraient être réparties au hasard, dans le laboratoire (EC, 1997a, b, 2001).

La première journée d'exposition des animaux aux échantillons de matières ou de substances à l'étude est appelée *jour 0*. La veille (au jour – 1), on devrait mélanger à fond[24] (v. § 5.3 et 6.2) chaque échantillon ou sous-échantillon de sol à l'étude ou de matière particulaire semblable, y compris le *sol témoin négatif* et, le cas échéant, le *sol de référence* pour obtenir un mélange homogène, d'une couleur, d'une texture et d'une humidité partout uniformes. Si on prépare, en vue d'un essai, des échantillons prélevés sur le terrain du *sol d'un emplacement à l'étude*, on devrait le débarrasser, avant le mélange, des grosses particules (pierres, chaume, brindilles, débris) ainsi que de toute végétation ou de tout invertébré macroscopique (v. § 5.3).

La quantité de chaque sol à l'étude que l'on mélange en tant que *lot* devrait suffire pour préparer les *répétitions* de cette variante expérimentale (v. tableau 3) et englober, en plus, une quantité supplémentaire destinée aux analyses physicochimiques à effectuer (§ 4.1.5) plus un excédent pour tenir compte de la fraction inutilisée de sol qui adhère aux parois du récipient de mélange après le prélèvement de parties aliquotes pour les essais et les analyses. On devrait connaître ou mesurer l'humidité (%) de chaque sol à l'étude et on devrait l'ajuster, au besoin, en mélangeant au sol de l'*eau d'essai* (ou, si besoin est, en déshydratant l'échantillon) jusqu'à l'obtention du taux souhaité d'humidité (v. § 5.3 et 6.2). On pourrait quantifier l'homogénéité d'un *lot* en prélevant des aliquotes du mélange pour des mesures telles que l'analyse granulométrique, le COT (%), la matière organique (%), l'humidité (%) et une ou plusieurs substances particulières.

Immédiatement après le mélange du *lot*, on devrait porter dans chaque enceinte expérimentale un poids frais identique de sol à l'étude équivalant à environ 350 mL[25]. On devrait lisser la surface du sol ajouté à chaque enceinte (mais sans le tasser), à la cuiller ou par léger tapotement du bocal de verre, au moins 3 fois, sur la paillasse ou à la main.

En vue d'un essai à concentration unique (par ex. *sol d'un emplacement à l'étude* mis à l'essai sans dilution, uniquement), il faut au moins 5 enceintes dans lesquelles on dépose le même poids frais de sol (équivalant à un volume d'environ 350 mL) du même *lot*. Pour un essai à plusieurs concentrations avec *E. andrei/fetida*, il faut préparer au moins 3 enceintes par *lot*. Pour un essai à plusieurs concentrations avec *L. terrestris*, il faut préparer au moins 5 enceintes par *lot*. Un essai préliminaire ou un essai de *recherche de la gamme de concentrations à utiliser* pourrait se révéler utile à la sélection des concentrations à utiliser dans l'essai définitif, auquel cas on pourrait réduire le nombre de répétitions par concentration.

Après avoir ajouté le sol à chaque enceinte, on devrait recouvrir cette dernière d'une pellicule non perforée (§ 3.1.2) pour réduire au minimum la perte d'humidité. On devrait maintenir les enceintes dans les conditions expérimentales pendant la nuit (§ 4.1.2) pour permettre l'équilibration des sols à l'étude (par ex. sol additionné d'une substance chimique ou sol d'un emplacement à l'étude dilué avec du sol témoin). Au jour 0 (c'est-à-dire au démarrage de l'essai) on devrait perforer chaque pellicule[26].

---

24. Par mélange, il faut incorporer de nouveau tout liquide s'étant séparé d'un échantillon ou d'un sous-échantillon de sol pendant le transport ou l'entreposage.

25. Le poids frais de sol nécessaire à l'obtention des 350 ml (environ) dépend de l'humidité, de la densité apparente et d'autres caractéristiques du sol. Il varie d'un échantillon à l'autre. En conséquence, on devrait le déterminer par transfert de la quantité nécessaire d'échantillon pour remplir un becher ou bocal de verre taré de 500 ml dont la paroi est marquée au volume de 350 ml, lissage de la surface de sol, triple tapotement du récipient sur la paillasse. On devrait ensuite déterminer le poids frais de ce volume et le noter, en portant dans chaque enceinte expérimentale un poids frais identique.

26. Pour un essai employant un échantillon de sol contaminé par des composés volatils, il est recommandé de recouvrir les enceintes d'une feuille d'aluminium opaque (plutôt que d'un matériau transparent ou translucide tel que le saran ou le Parafilm[MD] que les matières volatiles contractent ou déforment). Pendant la première semaine de l'essai, on ne devrait pas perforer l'aluminium afin de réduire au minimum les émissions gazeuses et d'augmenter l'exposition des vers à ces composés volatils. Dans ce cas, on devrait le perforer au jour 7 (Stephenson *et al.*, 2001). Si on utilise un matériau opaque (aluminium, par ex.), il est

On transfère les organismes dans chaque enceinte le lendemain (c'est-à-dire au jour 0 de l'essai). On devrait en prélever, dans le terrarium (§ 2.3) ou l'enceinte d'acclimatation (§ 2.4), un nombre excédentaire par rapport aux besoins de l'essai. On devrait y choisir des vers *adultes* (au clitellum entièrement développé) ou *subadultes*, dont le poids se trouve dans un intervalle acceptable (c'est-à-dire poids frais individuel dans la gamme de 250 à 600 mg [*E. andrei/fetida*] ou de 3 à 10 g [*L. terrestris*]), les en retirer à la main gantée ou à l'aide de pinces émoussées, à bout incurvé, puis les déposer brièvement dans un plat ou un plateau propre, peu profond, où on les rince rapidement à l'eau d'essai non contaminée (c'est-à-dire désionisée ou distillée). Ensuite, on dépose ces vers dans un récipient de transfert (par ex. un plateau de verre ou d'aluminium mesurant environ 10 × 10 cm) dans le fond duquel se trouve une serviette de papier imbibée d'eau d'essai. On devrait observer une dernière fois les vers se trouvant dans ce récipient pour s'assurer que leur apparence est normale. On devrait se débarrasser de tout ver atypique. On devrait choisir soigneusement des vers d'un poids aussi semblable que possible, tout en s'assurant qu'ils se trouvent dans la gamme acceptable, puis les transférer individuellement (en utilisant l'une des branches d'une pincette incurvée) à la surface du sol de chaque enceinte. La répartition des vers dans chaque enceinte devrait être aléatoire par rapport à la variante expérimentale. Dans le cas d'*E. andrei/fetida*, on devrait déposer 5 vers dans chaque enceinte choisie au hasard. Dans le cas de *L. terrestris*, on devrait déposer 3 vers dans chaque enceinte choisie au hasard [27].

Les vers choisis devraient être de taille semblable (c'est-à-dire de poids frais semblables), et on ne devrait choisir que ceux qui semblent en bonne santé, ont une couleur semblable et sont actifs lorsqu'on les retire de la litière. Il faut peser individuellement au moins 10 vers, choisis au hasard, en tant que vers excédentaires, dans le groupe choisi pour l'essai, pour déterminer la variabilité du poids de chaque ver constituant cet échantillon. Il faut consigner les poids individuels, en calculer et en consigner la moyenne (± σ) [section 7].

4.1.2 Conditions expérimentales

- Il s'agit d'un essai de toxicité du sol d'une durée de 14 jours, pendant lequel le sol de chaque enceinte n'est pas renouvelé.
- L'enceinte est un bocal de verre de 500 mL. Son contenu (c'est-à-dire 350 mL de sol) devrait normalement être recouvert d'une pellicule transparente ou translucide, perforée (par ex. saran ou Parafilm[MD]) [§ 3.1.2] fixée au rebord du bocal par un élastique. Si on sait que la matière à l'étude renferme des composés volatils (par ex. des HAP), il est recommandé d'utiliser à la place une feuille d'aluminium opaque, en assurant un éclairage latéral suffisant pour assurer un minimum acceptable d'intensité lumineuse à la surface du sol) [v. § 4.1.1 et le dernier alinéa (puce) du § 4.1.2].
- Dans un essai à concentration unique, il faut préparer au moins 5 enceintes pour chaque sol à l'étude (c'est-à-dire chaque variante expérimentale). Pour un essai à plusieurs concentrations, il faut préparer au moins 3 enceintes par concentration pour les essais employant *E. andrei/fetida* et au moins 5 enceintes par concentration pour les essais employant *L. terrestris ;* il faut utiliser au moins 5 concentrations, plus le ou les témoins appropriés.
- L'essai doit se dérouler à la température journalière moyenne de 20 ± 2 °C. En outre, la température instantanée doit toujours se situer à 20 ± 3 °C.
- L'éclairage des enceintes doit obéir à une photopériode fixe (par ex. 16 h ou 12 h) en étant assuré par des lampes à incandescence ou fluorescentes. La période choisie devrait être la même que celle à laquelle les vers ont été préalablement acclimatés (v. § 2.3.3 et 2.4.3). L'intensité lumineuse à la surface du sol de chaque enceinte devrait être de 400 à 800 lux et doit être d'au moins 400 lux. Cet intervalle équivaut à un flux quantique de 5,6 à 11,2 $\mu mol/(m^2 \cdot s)$, sous éclairage fluorescent blanc et cru, de 6,4 à 12,8 $\mu mol/(m^2 \cdot s)$, sous éclairage fluorescent à spectre continu, ou de 7,6 à 15,2 $\mu mol/(m^2 \cdot s)$ sous éclairage à incandescence.

---

recommandé d'employer un éclairage latéral et vertical pour assurer une intensité lumineuse minimale à la surface du sol de chaque enceinte (v. § 4.1.2). Toutes les enceintes, y compris celles qui renferment un sol témoin négatif, doivent être traitées de façon identique.

27. On dépose moins de *L. terrestris* dans chaque enceinte parce que ce sont de gros vers et qu'il faut tenir compte du chargement des enceintes (c'est-à-dire de la biomasse des vers par unité de volume de sol). Dans un essai à plusieurs concentrations, le nombres d'enceintes par concentration (y compris le *sol témoin négatif*) passe de 3 (dans le cas d'*E. andrei/fetida*) à 5 (dans le cas de *L. terrestris*) pour arriver au même nombre d'organismes par concentration (c'est-à-dire 15 vers par concentration utilisée).

4.1.3 Critère de validité de l'essai

Pour que l'essai soit valide, le taux moyen de survie des vers maintenus 14 jours dans le *sol témoin négatif* doit être d'au moins 90 % à la fin de l'essai.

4.1.4 Alimentation

Pendant les 14 jours que dure l'essai, il ne faut donner aucune nourriture supplémentaire aux vers.

4.1.5 Observations et mesures pendant l'essai

Le principal effet biologique à mesurer par l'essai est le nombre de vers vivants dans chaque enceinte au jour 14. La même mesure, au jour 7, est également utile et elle est souvent effectuée, bien qu'elle soit facultative. Selon les objectifs de l'étude (par ex. si on veut déterminer le temps létal médian pour parvenir à un taux de mortalité de 50 % des vers), on pourrait prévoir des observations supplémentaires (par ex. à 1, 3, 6 et/ou 24 h) du nombre de vers vivants dans chaque enceinte expérimentale.

Il faut consigner l'état et l'aspect des vers vivants transférés dans chaque enceinte au jour 0 ainsi que leur nombre pendant le transfert. Une heure après le transfert, on devrait consigner le nombre de vers se trouvant à la surface du sol de chaque bocal ou collés contre la paroi intérieure de verre ou le fond.

L'observation des vers au jour 7 est facultative, mais elle est recommandée (par ex. pour déterminer le taux de mortalité à 7 jours, dans un essai à concentration unique, ou la CL 50 après 7 jours, dans un essai à plusieurs concentrations). Si le plan d'expérience prévoit de telles mesures et de tels calculs, il faudrait consigner le nombre de vers vivants et morts observés au jour 7 à la surface du sol de chaque enceinte ou collés contre la paroi intérieure ou le fond. Ensuite, il faudrait transférer le contenu de chaque enceinte dans un plateau de tri ou sur une feuille de plastique, puis y dénombrer les vers vivants et morts et consigner les résultats. On devrait toucher doucement les vers apparemment morts à leur extrémité antérieure, avec une tige de verre ou une spatule ; par définition, le ver est réputé mort s'il ne réagit pas. Il faut se débarrasser de tous les cadavres. Il faut faire de même pour tout fragment de ver. Les vers manquant à l'appel doivent être comptés comme morts, puisque tout cadavre de ver peut se décomposer rapidement sans laisser de traces. On devrait consigner l'aspect (par ex. tégument normal ou signes d'altération de la couleur ou lésions) et le comportement (par ex. activité normale, enroulement sur soi-même, léthargie) de chaque ver survivant. Immédiatement après cette évaluation, il faut remettre dans le bocal le sol à étudier, puis y transférer tous les vers survivants, doucement, à la main ou en utilisant la branche d'une pincette à extrémité incurvée) à la surface du sol. À la fin de l'essai, on effectue d'autres observations sur la survie, l'apparence et le comportement des vers (§ 4.1.6).

Au jour 7, un essai qualitatif d'expression de l'humidité (v. § 5.3) appliqué à chaque aliquote de sol à l'étude temporairement retiré de son enceinte expérimentale permet de déterminer l'acceptabilité de son humidité. Un autre bon indicateur de l'acceptabilité de l'humidité est l'absence de particules de sol adhérant aux animaux en expérience. Si la surface du corps des vers survivants, temporairement retirés du sol d'une enceinte au jour 7, est relativement exempte de particules de sol, c'est que l'humidité de ce sol est en général convenable. Si, toutefois, on observe des particules de sol adhérant aux vers, on devrait alors ajouter de l'eau au sol. L'essai d'expression de l'humidité sert à confirmer le caractère convenable ou insuffisant de l'humidité du sol. Si on juge l'humidité insuffisante, on devrait ajouter suffisamment d'eau désionisée pour restituer au sol sa consistance homogène et friable du début de l'essai (§ 5.3) par pulvérisation ou brumisation à la surface des particules du sol étalé sur le plateau de triage ou la feuille de plastique.

Dans le laboratoire (§ 3.1), il faut mesurer la température quotidiennement (par ex. à l'aide d'un thermomètre à maximum et à minimum) ou en continu (par ex. à l'aide d'un thermographe).

Il faut consigner le pH et l'humidité d'au moins un exemplaire de sol de chaque variante expérimentale (y compris du *sol témoin négatif* et, le cas échéant, du *sol de référence*), au début et à la fin de l'essai. Les mesures initiales (au jour 0) devraient se faire sur des sous-échantillons de chaque *lot* de sol à l'étude que l'on utilise pour préparer les répétitions d'une variante expérimentale particulière (v. § 4.1.1) [28]. On devrait

28. Au jour – 1, on devrait déposer dans une enceinte expérimentale du laboratoire une ou plusieurs répétitions de chaque sol à l'étude. On devrait réserver ces répétitions, dépourvues de vers, aux analyses physicochimiques des conditions auxquelles sont exposés les vers au jour 0. Si on le souhaite, on devrait également préparer un ensemble de répétitions (sans vers) au jour – 1, pour les analyses physicochimiques du jour 14.

effectuer les mesures finales (c'est-à-dire au jour 14) sur des sous-échantillons des répétitions de chaque variante expérimentale à laquelle les vers sont exposés, après les observations finales de la survie, de l'état et du comportement des vers.

On devrait mesurer le pH du sol dans une suspension additionnée de $CaCl_2$ (méthode modifiée de Hendershot *et al.*, 1993)[29]. Pour ces analyses, on introduit 4 g de sol hydraté[30] dans un becher de verre de 30 mL (~ 3 cm de diamètre sur ~ 7 cm de hauteur) avec 20 mL de $CaCl_2$ 0,01 *M* [31]. On devrait agiter la suspension par intermittence pendant 30 min (par ex. une fois à toutes les 6 min). On devrait ensuite la laisser reposer 1 h environ. Ensuite, on plonge une sonde de pH dans le surnageant et on note le pH dès que la lecture du pH-mètre est constante.

On mesure l'humidité de chaque sol à l'étude en en portant un sous-échantillon de 3 à 5 g dans une coupelle tarée d'aluminium. On consigne le poids frais du sous-échantillon. On porte ensuite chaque sous-échantillon à l'étuve, à 105 °C, jusqu'à l'obtention d'un poids constant. Cela prend habituellement au moins 24 h. On devrait ensuite mesurer et consigner le poids sec de chaque sous-échantillon. On doit calculer l'humidité du sol en pourcentage du poids sec du sol, conformément à l'équation suivante :

$$\text{Humidité (\%)} = \frac{\text{poids frais (g)} - \text{poids sec (g)}}{\text{poids sec (g)}} \times 100$$

Il importe de calculer l'humidité par rapport au poids sec et non au poids frais, puisque les résultats de ces calculs servent, avec les calculs de la capacité de rétention en eau (également rapportés au poids sec), à exprimer l'humidité optimale des sols à l'étude (v. § 5.3).

Selon la nature de l'essai et le plan de l'étude, on pourrait doser, au début et à la fin de l'essai, la ou les substances ou produits chimiques auxquels on s'intéresse dans les sols. Dans un essai sur un échantillon du *sol d'un emplacement* prélevé sur le terrain la ou les substances ou produits dépendront du ou des contaminants auxquels on s'intéresse (v. § 5.4). Dans un essai à plusieurs concentrations sur un sol additionné d'une substance, ces mesures pourraient porter sur les concentrations fortes, médianes et faibles utilisées dans l'expérience, au moins (v. § 6.3). On devrait prélever des aliquotes pour ces analyses, de la façon décrite ci-dessus à l'égard du pH, de la conductivité et de l'humidité ; les analyses devraient se fonder sur des techniques éprouvées et reconnues (par ex. SAH, 1992 ; Carter, 1993).

4.1.6 Fin de l'essai

L'essai prend fin après 14 jours d'exposition. On devrait alors déterminer et consigner le nombre de vers vivants et morts à la surface du sol de chaque enceinte expérimentale

29. La méthode de Hendershot *et al.* (1993) comprend une étape comportant le séchage de l'échantillon à l'air pendant 48 h, avant d'en analyser le pH. D'après l'expérience des chercheurs d'Environnement Canada, cette étape est inutilement longue (Doe, K, Environnement Canada, Centre des sciences de l'environnement de la région de l'Atlantique, Moncton, communication personnelle ; Princz, J., Environnement Canada, DMB, Ottawa, communication personnelle, 2004) et elle ne modifie pas sensiblement le pH par rapport à celle du sol hydraté (c'est-à-dire selon l'essai de toxicité) [Courchesne *et al.*, 1995 ; Princz, J., Environnement Canada, DMB, Ottawa, communication personnelle, 2004].

Becker-van Slooten *et al.* (2004) ont évalué trois méthodes de mesure du pH dans une suspension de sol. La nécessité de cette évaluation a été constatée pendant l'atelier sur la toxicité des sols organisée par Environnement Canada à Vancouver (février 2003), alors que des participants avaient recommandé l'intégration d'une méthode commune et « universellement normalisée » de mesure du pH dans chacune des méthodes d'essai de la toxicité des sols d'Environnement Canada (EC, 2004c). On a comparé les trois méthodes suivantes de mesure du pH du sol : (1) addition de KCl 1 *M* dans l'eau ; (2) addition de $CaCl_2$ 0,01 *M* dans l'eau ; (3) eau seulement. La comparaison a montré que chaque méthode possédait des avantages et des inconvénients. Cependant, compte tenu de considérations pratiques et des recommandations des participants de l'atelier (c'est-à-dire l'application d'une méthode répandue pour caractériser le pH des sols), on a préconisé l'intégration de la méthode au $CaCl_2$ 0,01 *M* aux méthodes d'Environnement Canada (Becker-van Slooten et al., 2004).

30. On pourrait devoir utiliser proportionnellement moins de sol (par ex. 2 g avec 20 mL de $CaCl_2$) s'il est riche en matière organique (c'est-à-dire dont la suspension ne donne pas un surnageant).

31. Pour préparer une solution de ce titre, faire dissoudre 2,940 g de chlorure de calcium dihydraté ($CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$) avec de l'eau distillée, dans une fiole jaugée de 2 000 mL. À 25 °C, la conductivité de la solution devrait se situer entre 224 et 240 mS/m, tandis que le pH devrait se situer entre 5,5 et 6,5 (Hendershot *et al.*, 1993). Si le pH tombe à l'extérieur de cet intervalle, on devrait l'ajuster au moyen d'une solution d'HCl ou de $Ca(OH)_2$. Si la conductivité ne se situe pas dans l'intervalle acceptable, il faut préparer une nouvelle solution fraîche.

ou collés contre la paroi interne ou le fond du bocal. Ensuite, il faut transférer le contenu de chaque enceinte sur un plateau de tri ou sur une feuille de plastique et dénombrer les vers vivants et morts, puis consigner le résultat. On devrait toucher doucement les vers qui semblent morts avec une tige de verre ou une spatule ; par définition, la mort est l'absence de toute réaction. On se débarrasse des cadavres de vers. Les vers manquant à l'appel doivent être comptés pour morts. On devrait consigner l'apparence (par ex. normale ou signes d'altération de la couleur ou de lésions) et le comportement (activité normale ou léthargie) de chaque ver. Immédiatement après cette évaluation, on devrait prélever des sous-échantillons de chaque sol à l'étude (y compris du *sol témoin négatif* et, si cela est prévu dans l'essai, du *sol de référence* pour en mesurer le pH et l'humidité (§ 4.1.5). On devrait alors aussi faire des analyses d'autres constituants chimiques (c'est-à-dire doser les contaminants) à l'aide de sous-échantillons représentatifs de chaque sol à l'étude (§ 4.1.5).

4.1.7 Effets mesurés (paramètres) et calculs

Il faut calculer et signaler pour chaque essai le taux de survie (taux de mortalité) dans chaque enceinte expérimentale au jour 14 de l'essai. Il faut aussi calculer et signaler le taux moyen de survie (± σ) de tous les vers exposés à chaque variante expérimentale, au jour 14, à l'aide des données sur la survie déterminées pour toutes les répétitions[32]. On devrait également calculer toutes les observations facultatives des taux de survie faites au jour 7 (v. § 4.1.5) et les signaler en pourcentage de survie dans chaque enceinte, de même que le taux moyen de survie (± σ) à chaque variante expérimentale.

Dans un essai à concentration unique (§ 4.1.1), on compare la valeur moyenne (± σ) du taux de survie, déterminé pour chaque variante expérimentale, à la valeur moyenne correspondant à l'échantillon ou aux échantillons de *sol de référence* ou, au besoin et si cela convient, à la valeur moyenne correspondant au sol témoin négatif (v. § 5.5). Pour un essai à plusieurs concentrations (v. § 4.1.1, 5.3 et 6.2), il faut calculer et signaler (si les données le permettent) la CL 50 après 14 j. Si, durant un essai à plusieurs concentrations, on a fait des observations, au jour 7, du taux de survie correspondant à chaque concentration, il est recommandé de calculer et de signaler (si les données le permettent) la CL 50 après 7 jours. Le guide qu'a publié Environnement Canada (EC, 2004b) sur les méthodes statistiques d'estimation des paramètres ultimes de mesure des essais de toxicité donne des conseils définitifs et des marches à suivre (v. § 6.4.1, ci-après) à ce sujet.

4.1.8 Essais avec un toxique de référence

Dans le tableau 12 de l'annexe F, on résume les conseils relatifs à l'exécution d'essais de toxicité de référence donnés dans d'autres méthodes d'essai de létalité d'une durée de 14 jours permettant de mesurer la toxicité d'un sol à l'aide de vers de terre. Dans le présent document, on décrit les conditions et modes opératoires à respecter dans l'exécution d'essais de toxicité de référence conjointement avec un essai de létalité d'une durée de 14 jours permettant de mesurer la toxicité d'un sol à l'aide de vers de terre, de même que les essais de toxicité de référence accompagnant un essai de réaction aiguë d'évitement utilisant des vers de terre (v. § 4.2.8) ou un essai de mesure de l'effet d'une exposition prolongée sur la survie, la reproduction et la croissance de vers de terre (v. § 4.3.8). Les modes opératoires du présent document s'appliquent également aux essais d'évaluation de l'acceptabilité et de la qualité des élevages d'*E. andrei/fetida* ou de groupes d'*E. andrei/fetida* ou de *L. terrestris* gardés en vue d'essais de toxicité de sols ; en outre, on devrait les appliquer à l'évaluation de la précision intralaboratoire, lorsqu'un laboratoire, inexpérimenté dans les méthodes d'essai biologique définies dans le présent document, se prépare à les appliquer (v. § 2.3.1, 2.3.9 et 2.4.9).

Il est nécessaire d'utiliser régulièrement un *toxique de référence* pour évaluer dans des conditions normalisées la sensibilité relative d'une partie de la population de vers de terre adultes ou subadultes d'un élevage particulier (§ 2.3.9) ou d'une enceinte particulière d'acclimatation (§ 2.4.9) d'où on choisira les organismes pour les utiliser dans un ou plusieurs essais définitifs de toxicité de sols. Les essais employant un toxique de référence servent également à faire la démonstration de la précision et de la fiabilité des données obtenues par le personnel du laboratoire pour ce toxique de référence, dans des conditions expérimentales normalisées. Il faut effectuer un essai de toxicité de référence conformément aux conditions et aux modes opératoires décrits dans le

32. Ce résultat se fonde sur une taille de l'échantillon (*n*) d'au moins 15 vers par concentration si l'essai est à plusieurs concentrations (par ex. 3 répétitions de 5 vers par enceinte expérimentale et par concentration [*E. andrei/fetida*] ou 5 répétitions de 3 vers par enceinte et par concentration [*L. terrestris*]). Dans un essai à concentration unique à 5 répétitions, *n* = 25 *E. andrei/fetida* ou 15 *L. terrestris* (v. § 4.1.1).

§ 4.1, sous l'un des deux régimes suivants :

(1) au moins une fois par mois, avec des vers de terre adultes ou subadultes prélevés dans la population de vers de terre en élevage pour servir dans l'essai ou les essais définitifs (§ 2.3).

(2) en même temps que l'essai ou les essais définitifs de toxicité d'un sol employant des vers subadultes ou adultes prélevés dans la même population que celle qui sert à l'essai ou aux essais définitifs (v. § 2.3.9 et 2.4.9).

Un laboratoire qui élève des vers de terre (*Eisenia* sp.) et qui effectue fréquemment des essais de toxicité de sols avec ces organismes pourrait choisir une surveillance régulière (par ex. mensuelle) de la sensibilité de ses élevages à un ou plusieurs toxiques de référence, tout en incluant un essai de toxicité de référence employant une partie des vers servant à entreprendre un essai définitif de toxicité d'un sol. Ce laboratoire pourrait aussi choisir de surveiller moins fréquemment la sensibilité de ses élevages à un toxique de référence (par ex. à tous les deux mois) et de faire coïncider l'essai de toxicité de référence avec chaque essai définitif de toxicité d'un sol. Un laboratoire utilisant des vers de terre (*L. terrestris* ou *Eisenia* sp.) transportés sur place et acclimatés aux conditions expérimentales (v. § 2.4) en vue d'un ensemble particulier d'essais définitifs de toxicité de sols pourrait opter pour l'exécution d'un ou de plusieurs essais de toxicité de référence employant une partie des vers utilisés pour le démarrage des essais définitifs. Si le laboratoire garde longtemps (plusieurs mois) sur place des *L. terrestris*, il pourrait également opter pour une surveillance régulière (par ex. mensuelle) de la sensibilité de cette population.

Chaque essai de toxicité de référence effectué conjointement avec cet essai de létalité aiguë pour mesurer la toxicité d'un sol doit être effectué sous la forme d'un essai à plusieurs concentrations d'une durée de 7 jours et *en conditions statiques.* Les conditions et modes opératoires décrits dans le présent document (§ 4.1) pour un essai de létalité aiguë (d'une durée de 14 jours) à plusieurs concentrations sur des échantillons de sol à l'étude s'appliquent également à chaque essai de toxicité de référence, sauf que la durée de l'essai est limitée à 7 jours. Les modes opératoires exposés dans la section 6 pour la préparation et l'essai de substances additionnées à un sol témoin négatif s'appliquent également ici et on devrait les consulter pour obtenir de plus amples renseignements. Le guide d'Environnement Canada sur l'emploi d'un sédiment témoin négatif additionné d'un toxique de référence (EC, 1995) donne des renseignements utiles, qui s'appliquent également à l'exécution d'essais de toxicité de référence employant un sol témoin négatif additionné d'un toxique de référence.

L'essai de toxicité de référence devrait employer des bocaux de verre de 500 mL comme enceintes expérimentales (§ 3.1.2) ainsi qu'une aliquote de 350 mL de sol à l'étude représentant chaque variante expérimentale (concentration) dans chaque enceinte. Le nombre de répétitions (enceintes) par concentration dépend de l'espèce, tout comme le nombre de vers par enceinte (§ 4.1.1). Le poids frais de chaque ver doit se situer à l'intérieur de la fourchette spécifiée pour chaque espèce dans le § 4.1.1. On ne devrait pas nourrir les vers pendant les sept jours de l'essai.

Les modes opératoires du début et de la fin d'un essai de toxicité devraient correspondre à ceux qui sont décrits dans les § 4.1.1 et 4.1.6, à l'exception de la durée de l'essai, plus courte (7 jours). Les conditions expérimentales décrites dans le § 4.1.2 s'appliquent. On devrait appliquer les observations et les mesures exposées dans le § 4.1.5.

Pour que l'essai soit valide, le taux moyen de survie, après sept jours, des vers de terre maintenus dans des aliquotes de sol témoin négatif utilisé dans un essai particulier de toxicité de référence doit être d'au moins 90 %. Les effets à calculer et à signaler sont notamment le taux moyen de survie correspondant à chaque variante expérimentale au jour 7 et la CL 50 après 7 jours (y compris ses limites de confiance à 95 %). Les résultats d'un essai de toxicité de référence devraient s'exprimer en milligrammes de substance de référence par kilogramme de sol sec (mg/kg).

Les critères convenant à la sélection du toxique de référence à utiliser conjointement avec un essai de létalité aiguë pour la mesure de la toxicité d'un sol sont notamment les suivants (EC, 1995) :

- facilité d'obtention de la substance à l'état pur ;
- stabilité ou longue conservabilité à l'étalage ;
- possibilité d'être distribué également dans tout le substrat *non contaminé ;*
- bonne courbe concentration-réponse pour l'organisme d'expérience ;

- stabilité en solution aqueuse et dans le sol ;
- danger minime pour l'utilisateur ;
- dosage précis facile.

Stantec et Aquaterra Environmental (2004), ayant considéré les propriétés connues de l'acide borique de qualité « réactif » relativement à ces aspects, ont conclu que ce composé convenait à une utilisation régulière comme toxique de référence, conjointement avec les essais de toxicité de sols employant des vers de terre.

L'essai de toxicité de référence d'une durée de 7 jours exige au moins six variantes expérimentales (c'est-à-dire un *sol témoin négatif* et cinq concentrations du toxique de référence). L'acide borique de qualité « réactif » est recommandé comme toxique de référence lorsqu'on effectue des essais de toxicité de sols avec des vers de terre, bien que d'autres substances puissent être utilisées si elles se révèlent convenables [33]. On devrait préparer chaque concentration expérimentale conformément aux conseils des § 4.1.1 et 6.2, au moyen d'un sol artificiel (§ 3.2.2) comme substrat.

Les essais réguliers de toxicité de référence (par ex. mensuels ou effectués conjointement avec chaque essai définitif de toxicité d'un sol) employant l'acide borique (ou une autre substance convenable de référence telle que le chlorure de potassium) ajouté à un *sol témoin négatif* devraient appliquer de façon constante les mêmes conditions expérimentales et modes opératoires décrits dans le présent document. On devrait choisir une série de concentrations expérimentales [34], d'après les résultats d'essais préliminaires, pour connaître les mortalités partielles à deux ou plusieurs concentrations et permettre le calcul d'une CL 50 après 7 j (v. § 6.4).

Dès que l'on possède suffisamment de données (EC, 1995), il faut porter successivement sur une *carte de contrôle* toutes les CL 50 comparables d'un toxique particulier de référence, obtenues grâce à ces essais de toxicité. On devrait examiner chaque nouvelle CL 50 pour déterminer si elle se situe à plus ou moins deux écarts types (± 2 σ) des valeurs obtenues dans des essais antérieurs comparables avec le même toxique de référence et le même mode opératoire (EC, 1997a, b, 2001). Il faut préparer une carte de contrôle séparée et l'actualiser pour chaque mode opératoire différent (par ex. différentes espèces d'organismes d'expérience ou différents toxiques de référence).

33. Aquaterra Environmental (1998a) a d'abord évalué les performances de diverses substances proposées comme toxiques de référence à utiliser conjointement avec les essais de létalité aiguë pour la mesure de la toxicité de sols pour *E. andrei* ou *L. terrestris*.

Des études ultérieures d'Aquaterra Environmental (2001) sur l'acide borique ajouté à un sol témoin négatif ont montré que cette substance était un toxique de référence très prometteur pour les essais de toxicité de sols employant les vers de terre. D'autres études effectuées par Stantec et Aquaterra Environmental (2004) ont confirmé l'utilité de l'acide borique comme toxique de référence pour la réalisation d'essais mensuels de détermination de la CL 50 après 7 jours et pour la réalisation d'une carte de contrôle pour cette substance employée avec *E. andrei*. Les essais de Stantec et Aquaterra Environmental (2004) ont également montré la sensibilité d'*E. andrei* à l'acide borique dans des essais d'une durée de 8 semaines sur les effets de ce composé sur la survie, la reproduction et la croissance de ces vers et ils ont abouti à des constatations semblables pour un certain nombre d'essais de même durée avec cette même substance, réalisés conformément au § 4.3.

34. Stephenson (2003b) ainsi que Stantec et Aquaterra Environmental (2004) ont montré que, selon la méthode de l'essai de toxicité de référence décrite dans le présent document, la CL 50 après 7 j de l'acide borique variait de 3 295 à 4 915 mg/kg sec de sol artificiel ou de sol argileux-loameux prélevé sur le terrain et *non contaminé*, à l'égard d'*E. andrei*, d'*E. fetida* ou de *L. terrestris*. Les valeurs différaient peu selon l'espèce de ver ou le type de sol dans lequel ce toxique de référence avait été mélangé. Dans ces essais, la concentration minimale (2 000 mg/kg) n'a pas causé d'effet démontrable, celles de 4 000 et de 6 000 mg/kg ont causé des mortalités partielles, celle de 8 000 mg/kg a tué une partie ou la totalité des vers, et la concentration maximale (10 000 mg/kg) a tué tous les vers en moins de 7 jours. V. l'annexe I pour des conseils sur le choix d'une série convenable de concentrations (dans l'hypothèse d'une réaction au logarithme de la concentration) de cette substance ou d'autres à utiliser dans les essais de toxicité de référence.

Dans le cadre d'une série d'études interlaboratoires visant à valider l'essai de létalité aiguë d'Environnement Canada décrit dans le § 4.1, 11 laboratoires ont mesuré simultanément la CL 50 après 7 j avec *E. andrei*, au moyen de concentrations multiples d'acide borique ajouté à un sol artificiel. Chaque laboratoire a obtenu des résultats valides (c'est-à-dire que les taux de survie après 7 jours dans le sol témoin négatif étaient invariablement d'au moins 90 %). Ces laboratoires ont ainsi obtenu, pour la CL 50 après 7 j de l'acide borique dans le sol artificiel, la valeur moyenne de 3 826 mg d'H_3BO_3/kg (sec) [dans la fourchette de 3 236 à 4 198 mg/kg]. Le faible coefficient de variation de ces CL 50 (9 %) est le signe d'une bonne précision interlaboratoires (EC, 2004a).

La carte de contrôle devrait porter sur son axe vertical le logarithme de la concentration en fonction de la date ou du numéro de l'essai sur l'axe horizontal. On devrait comparer chaque nouvelle CL 50 du toxique de référence aux limites établies du graphique : la CL 50 est acceptable si elle se situe dans la *zone de confiance.*

Le logarithme de la concentration (y compris de la CL 50) devrait servir au calcul de la moyenne et de l'écart type ainsi qu'à l'établissement de tous les graphiques. De la sorte, on continue simplement de se conformer à l'hypothèse selon laquelle chaque CL 50 a été estimée à partir de logarithmes de concentrations. On peut établir la carte de contrôle en portant les logarithmes de la moyenne ± 2 σ sur du papier à échelle arithmétique ou en les convertissant en valeurs arithmétiques, puis en les portant sur l'échelle logarithmique de papier à échelle semi-logarithmique. S'il était démontré que les CL 50 n'obéissent pas à une loi log-normale, une moyenne et un écart type arithmétiques pourraient se révéler plus appropriés.

On devrait recalculer la moyenne des valeurs connues de log(CL 50), ainsi que les limites supérieure et inférieure de la zone de confiance (± 2 σ) à chaque CL 50 successive que l'on obtient pour le toxique de référence jusqu'à ce que la statistique se stabilise (EC, 1995, 1997a, b, 2001). Si une CL 50 particulière tombe à l'extérieur de la zone de confiance, la sensibilité des organismes en expérience ainsi que l'exécution et la précision de l'essai deviennent suspects. Comme cela pourrait se produire 5 % du temps, du seul fait du hasard, une CL 50 aberrante n'est pas nécessairement le signe d'une sensibilité anormale de l'élevage ou de la population de vers provenant d'une source de l'extérieur ou gardés au laboratoire ni d'une précision insatisfaisante des données sur la toxicité. Elle annoncerait plutôt un éventuel problème. On devrait effectuer une vérification approfondie de toutes les conditions et de tous les modes opératoires utilisés pour l'élevage, l'entretien ou l'acclimatation et l'essai. Selon les constatations, on pourrait devoir répéter l'essai de toxicité de référence, établir un nouvel élevage, sélectionner des vers d'un autre élevage ou obtenir une nouvelle population d'organismes d'expérience d'une source de l'extérieur avant d'entreprendre d'autres essais de toxicité de sols.

Les résultats qui se sont maintenus dans la zone de confiance pourraient ne pas nécessairement être un signe de constance du laboratoire. S'ils sont extrêmement variables, la zone de confiance est large ; un nouveau résultat pourrait se situer dans cette zone tout en étant indésirable. Environnement Canada (EC, 1995, 2004b) a proposé comme limites raisonnables un coefficient de variation de pas plus de 30 % et, de préférence, de 20 % ou moins, pour la moyenne des valeurs disponibles de log(CL 50) [v. l'alinéa précédent]. Pour cette méthode d'essai biologique, le coefficient de variation des moyennes obtenues dans les essais de toxicité de référence effectuées à l'aide d'acide borique ne devrait pas dépasser 30 % [35].

On devrait doser, par les méthodes chimiques appropriées (par ex. par spectrophotométrie d'émission atomique [SEA] à plasma inductif d'argon, pour le dosage du bore), le toxique de référence dans toutes les solutions mères. Les concentrations à analyser du toxique de référence dans le sol sont préparées par ajout d'une quantité mesurée de la solution mère au sol témoin négatif [36], puis un mélange à fond [37]. Après préparation

35. Le rapport technique de Stantec et Aquaterra Environmental (2004) comprend une carte de contrôle de 9 essais de toxicité référence d'une durée de 7 jours réalisés en 21 mois avec *E. andrei* exposé à l'acide borique additionné à un sol artificiel. Toutes les données, sauf une, se trouvent dans la zone de confiance. Le coefficient de variation de ces moyennes était de 14,7 %.

Afin de valider l'essai de toxicité aiguë d'Environnement Canada décrit dans le § 4.1, onze laboratoires ont mesuré la CL 50 après 7 j d'une gamme de concentrations d'acide borique dans un sol artificiel pour *E. andrei*. Le coefficient interlaboratoires de variation des CL 50 moyennes ainsi obtenues (11 essais) était faible, de 9 % (EC, 2004a).

36. Le § 6.2, sur la préparation des mélanges à l'étude, comprend un exemple des quantités d'eau désionisée ou distillée et d'acide borique à ajouter au sol artificiel pour préparer une variante expérimentale particulière en vue d'un essai de toxicité de référence employant une concentration précise d'acide borique dans un sol artificiel. Les calculs accompagnant l'exemple montrent la quantité d'eau nécessaire pour ajuster l'humidité du sol artificiel à un taux fixe (c'est-à-dire 70 %) de la capacité de rétention en eau du sol, tout en tenant compte du volume de la solution mère d'acide borique dans le cadre de l'ajustement global en fonction de l'humidité du sol.

37. Une méthode acceptée consiste à ajouter un volume préalablement calculé de solution mère (au moyen de pipettes jaugées ou graduées) dans un erlenmeyer de verre, de l'étendre au trait de jauge avec de l'eau désionisée, puis d'en ajouter un volume mesuré au sol. On rince ensuite l'erlenmeyer trois fois à l'eau désionisée et on ajoute les rinçures au sol. Le mélange de sol et de solution mère est ensuite mélangé à fond (pendant environ trois minutes) mécaniquement (par ex. au moyen d'un mélangeur à main

des mélanges du toxique de référence dans le sol, on devrait prélever des aliquotes du sol témoin négatif, au moins, ainsi que des concentrations minimale, médiane et maximale[38]. Chaque aliquote devrait être soit analysée directement, soit entreposée pour analyse ultérieure (c'est-à-dire à la fin de l'essai) si la CL 50 après 7 j fondée sur les concentrations nominales se trouvait à l'extérieur de la zone de confiance. Si on conserve des aliquotes de l'échantillon, ce doit être à l'obscurité, à 4 ± 2 °C. Les aliquotes entreposées qui doivent faire l'objet de dosages doivent être analysées promptement, dès la fin de la réalisation de l'essai de toxicité de référence. On devrait calculer la CL 50 après 7 jours à partir des concentrations mesurées, si elles sont sensiblement différentes (c'est-à-dire d'au moins 20 %) des concentrations nominales et si l'exactitude des analyses chimiques est satisfaisante.

Si on emploie l'acide borique comme toxique de référence, la méthode suivante d'analyse s'applique (OMEE, 1996). On fait sécher à 105 °C, jusqu'à l'obtention d'un poids constant, un sous-échantillon de 1 à 5 g de sol additionné d'acide borique. On soumet ensuite une aliquote de 1 g à une extraction à une solution de $CaCl_2$ 0,01 *M* en portant à ébullition une suspension de sol dans 50 ml de cette solution extractive, puis en ramenant le volume final à 50 mL avec un ajout de la solution extractive. On passe ensuite l'extrait de 50 mL sur un filtre Whatman[MD] n° 4 et on en étend le volume final à 100 mL. De la même manière, on prépare un blanc. On dose le bore élémentaire du filtrat par spectrophotométrie d'émission atomique à plasma inductif d'argon. On calcule ensuite la concentration d'acide borique (H_3BO_3) dans le sol **(en milligrammes par kilogramme, sec)** à l'aide de l'équation suivante :

$$[H_3BO_3] = \frac{[B]_{mesuré}\ (\mu g/mL) \times Vol._{final}\ (mL) \times M.M._{H3BO3} / M.M._{B}}{1\,000\ (\mu g) \times m_{échant.}\ (mg, sec)} \times 10^6$$

La limite de détection de l'acide borique dans le sol serait de 1 mg/kg de sol sec, dans la plupart des cas (Stephenson, 2003b).

4.2 Essai de réaction aiguë d'évitement

Le tableau 4 présente une liste de contrôle sommaire des conditions et modes opératoires recommandés pour s'appliquer universellement à chaque essai de réaction aiguë d'évitement employant des échantillons de sol effectivement ou potentiellement contaminé, de même que des conditions et modes opératoires recommandées pour l'essai de types précis de matières ou de substances (par ex. échantillons de biosolides ou de *sol témoin négatif*, additionnés, au laboratoire, d'un ou de plusieurs produits ou substances chimiques).

Les modes opératoires universels de l'essai de réaction aiguë d'évitement sont décrits dans le présent document. Cette méthode d'essai biologique emploie des vers de terre et elle mesure, en tant qu'effet biologique, leur réaction d'évitement des sols à l'étude[39]. Les organismes d'expérience sont soit des *E. andrei/fetida* élevés en laboratoire (§ 2.3), soit des vers (*E. andrei, E. fetida* ou *L. terrestris*) obtenus de l'extérieur (§ 2.2) puis acclimatés aux conditions existant dans le laboratoire (§ 2.4) avant leur emploi dans l'essai. La durée de l'essai est de 48 heures avec *E. andrei* ou *E. fetida* et de

à fouets d'acier inoxydable à mouvement rotatif) jusqu'à l'obtention d'un sol dont la couleur, la texture et l'humidité semblent homogènes. Pendant le mélange, on devrait également brasser par intermittence le sol se trouvant dans le bol de mélange, au moyen d'une grosse cuiller en acier inoxydable, pour faciliter l'homogénéisation.

38. Si la CL 50 de chaque essai de toxicité de référence doit se fonder sur des concentrations mesurées, il est recommandé de prélever et d'analyser au moins une aliquote du mélange de substance chimique et de sol représentant chaque concentration à l'étude. Si, toutefois, la CL 50 de chaque essai se fonde sur des concentrations nominales, il est recommander de prélever et d'analyser des aliquotes des concentrations minimale, médiane et maximale.

39. Dans l'appareillage expérimental recommandé, que l'on décrit et schématise dans le § 3.1.3 (fig. 2), on donne à des groupes de vers de terre le choix entre : un sol *non contaminé* (*sol témoin négatif* ou *sol de référence*) d'une part, et, d'autre part, le sol à l'étude (par ex. : sol prélevé sur le terrain, dans un emplacement effectivement ou potentiellement contaminé ou *sol témoin négatif* additionné d'une concentration donnée de substance ou de produit chimique). Chaque ver (n = 10) se trouvant dans l'enceinte expérimentale est libre de se déplacer entre le sol *non contaminé* se trouvant dans trois compartiments et le sol à l'étude se trouvant dans trois autres compartiments, en alternance avec les premiers (chaque enceinte compte 6 compartiments). À la fin de l'exposition (dont la durée est précisée : 48 h [*E. andrei* ou *E. fetida*] ; 72 h [*L. terrestris*]), on compte le nombre total de vers dans le sol non contaminé et dans le sol à l'étude et on compare les chiffres statistiquement (v. § 4.2.7).

72 heures avec *L. terrestris* [40, 41]. Pendant l'essai, on n'alimente pas les organismes et on ne renouvelle pas les sols.

4.2.1 Début de l'essai

Pour un essai à concentration unique, il faut au moins 5 enceintes expérimentales, chacune contenant les deux mêmes variantes expérimentales (c'est-à-dire le sol provenant d'un seul emplacement ou une seule concentration de sol à l'étude, plus un *sol témoin négatif* ou un *sol de référence non contaminé*) alternant d'un compartiment à l'autre. Pour un essai à plusieurs concentrations, il faut également 5 enceintes, chaque concentration expérimentale étant cantonnée dans une seule enceinte (avec, en alternance, des aliquotes de sol *non contaminé*). On recommande plus d'enceintes (par ex. de 6 à 10) dans un essai à plusieurs concentrations pour élargir l'intervalle des concentrations expérimentales et accroître la probabilité de chiffrer l'effet statistique auquel s'intéresse l'essai (v. § 4.2.7). Une autre option, pour l'essai à plusieurs concentrations, consiste à réaliser un essai préliminaire de recherche de la gamme de concentrations à utiliser pour trouver les réactions aiguës d'évitement à une large gamme de concentrations, dans cet appareillage expérimental (n = 10 vers par concentration), puis répétition de chaque concentration dans deux enceintes (n = 20 vers par concentration). Dans certains cas (par ex. dans un sol fortement contaminé ou un sol dont la CL 50 est inconnue), on pourrait effectuer un essai préliminaire de létalité aiguë (v. § 4.1) pour aider à choisir les concentrations expérimentales à utiliser dans un essai de réaction (sublétale) d'évitement.

Chaque enceinte expérimentale (v. § 3.1.3) du laboratoire d'essais doit être clairement codée ou étiquetée pour permettre l'identification du sol à l'étude ou sa concentration dans l'enceinte. Chacun des six compartiments de chaque enceinte (§ 3.1.3) doit également être codé (par ex. identifié par des chiffres ou des lettres) ou par ailleurs marqué pour distinguer le sol à l'étude qu'il renferme. Il faut consigner la date et l'heure du début de l'essai, soit directement sur les étiquettes, soit sur des feuilles séparées, consacrées à l'essai. Dans le laboratoire, l'emplacement des enceintes expérimentales est décidé par le hasard.

La veille de l'essai (c'est-à-dire au jour − 1), on devrait mélanger à fond chaque échantillon ou sous-échantillon de sol à l'étude ou de matière particulaire semblable, y compris de *sol témoin négatif* et, le cas échéant, de *sol de référence* [42] (v. § 5.3 et 6.2) pour donner un mélange homogène de couleur, de texture et d'humidité invariables. Si, pour les essais, on prépare des échantillons de sols d'un ou de plusieurs emplacements, on devrait les débarrasser des grosses particules, avant le mélange, de même que de toute végétation ou de tout invertébré macroscopique (v. § 5.3).

Il devrait y avoir suffisamment de sol à l'étude mélangé en tant que *lot* pour préparer les répétitions de cette variante expérimentale (v. tableau 4) plus une quantité supplémentaire pour les analyses physicochimiques à utiliser (§ 4.2.5). On devrait connaître ou déterminer l'humidité de chaque sol à l'étude et, au besoin, l'ajuster en incorporant de l'*eau d'essai* (ou, au besoin, en déshydratant l'échantillon) jusqu'à l'obtention du taux recherché (v. § 5.3 et 6.2). On pourrait quantifier l'homogénéité d'un *lot* en prélevant des parties aliquotes du mélange pour des mesures telles que l'analyse granulométrique, la teneur en COT (%), la teneur en matière organique (%), l'humidité (%) et la concentration de substances particulières.

Immédiatement après le mélange d'un *lot*, on devrait transvaser, à tous les deux compartiments de chaque enceinte (c'est-à-dire à trois compartiments par enceinte) employé dans l'essai de réaction aiguë d'évitement, un poids frais identique de *sol témoin négatif* (naturel ou artificiel ; v. § 3.2) ou de *sol de référence* (v. § 3.4)

---

40. On a choisi la durée de 48 h pour les eisénies dans un souci d'harmoniser l'essai de réaction d'évitement avec un essai semblable, employant *E. fetida* ou *E. andrei*, à publier par l'ISO (2003). Pour *L. terrestris*, on a choisi la durée de 72 h d'après l'expérience avec cette espèce dans les essais de réaction d'évitement et, dans certains cas, en raison de sa réaction d'évitement quelque peu plus lente que celle des eisénies (Aquaterra Environmental, 1998a ; Stephenson et al., 1998).

41. Quatre laboratoires ont effectué un essai de la réaction d'évitement d'*E. andrei*, d'une durée de 48 h, exposé à plusieurs concentrations d'acide borique additionné à un sol de référence prélevé sur le terrain (chernozem noir de l'Alberta) afin de valider cette méthode d'essai. Chacun des laboratoires a pu obtenir des résultats valides (v. § 4.2.3). La moyenne des CE 50 après 48 h de l'acide borique (H_3BO_3) ajouté dans ce sol de référence était de 874 mg/kg de sol sec (fourchette de 757 à 979 mg/kg). Le coefficient interlaboratoires de variation de ces CE 50 était de 11 %, ce que l'on considère comme un niveau de précision interlaboratoires amplement acceptable (EC, 2004a).

42. Tout liquide s'étant séparé de l'échantillon ou du sous-échantillon du sol à l'étude pendant son transport ou son entreposage doit y être incorporé de nouveau.

Tableau 4. — Liste de contrôle des conditions et des modes opératoires recommandés pour un essai visant à mesurer les effets sublétaux aigus (48 ou 72 h) d'un sol contaminé sur la réaction d'évitement de vers de terre (*Eisenia andrei, Eisenia fetida* ou *Lumbricus terrestris*)

Mode opératoire universel	
Type d'essai	— Essai de toxicité d'un sol entier, sans renouvellement du milieu (essai en conditions statiques).
Durée de l'essai	— 48 heures (*E. andrei* ou *E. fetida*) ; 72 heures (*L. terrestris*).
Organismes utilisés	— *E. andrei, E. fetida* ou *L. terrestris,* adultes, dotés d'un clitellum ; poids frais individuels : 250-600 mg (*E. andrei*) ; 250-800 mg (*E. fetida*) ; 3-10 g (*L. terrestris*) ; 10 vers par enceinte expérimentale.
Sol témoin négatif	— Selon le plan et les objectifs de l'étude ; sol artificiel ou sol prélevé sur le terrain et *non contaminé* si l'essai porte sur les sols d'emplacements à l'étude ; pour les essais portant sur des substances ou des produits chimiques additionnés à un sol, on recommande d'employer un sol artificiel.
Enceinte expérimentale	— Enceinte circulaire à cheminée centrale (d. i. : ~ 5,4 cm) subdivisée en 6 compartiments sectoriels, reliés entre eux, avec couvercle adapté, de plexiglas ou d'acier inoxydable de qualité ; d. e. : ~ 23 cm ; hauteur : ~ 9 cm ; orifices de 1,0 cm de diamètre, dans le bas de la paroi de la cheminée (à raison de 2 par compartiment) et des cloisons des compartiments (à raison de 3 par cloison) pour autoriser la circulation des vers.
Quantité de sol dans la cheminée centrale	— Nulle
Quantité de sol dans chaque compartiment	— Poids frais identique, équivalent à un volume de 350 ml.
Humidité des sols à l'étude	— Hydrater le sol au taux optimal de sa capacité de rétention en eau (CRE) si le sol a été prélevé sur le terrain (v. § 5.3) ou à environ 70 % de la CRE, si c'est un sol artificiel.
Nombre de compartiments par enceinte contenant la même variante expérimentale	— 3 (de sol témoin négatif ou de sol de référence dans chacun des trois compartiments, alternant avec 3 compartiments renfermant un seul sol à l'étude ou une dilution de ce sol).
Nombre de variantes expérimentales par enceinte	— 2 (sol témoin négatif ou sol de référence) plus un échantillon ou une concentration de sol à l'étude (par ex. sol prélevé sur le terrain, dilué ou non ou une seule concentration de sol additionné d'une substance chimique) ; alternant avec une autre variante expérimentale dans chaque compartiment contigu.
Nombre d'enceintes expérimentales par essai	— ≥ 5 (normalement une par concentration, dans un essai à plusieurs concentrations ; au moins 5, dans un essai à une seule concentration).
Température	— Moyenne journalière : 20 ± 2 °C ; température instantanée : 20 ± 3 °C.
Éclairage	— Obscurité ininterrompue (les enceintes sont enveloppées de feuilles d'aluminium si elles sont construites de plexiglas transparent ou translucide).
Alimentation	— Ne pas nourrir les vers.
Mesures effectuées pendant l'essai	— Humidité et pH du sol dans chaque variante expérimentale ou à chaque concentration : au début et à la fin de l'essai ; température du laboratoire d'essais : journellement ou en continu.

Observations pendant l'essai	— Le compartiment (correspondant à telle variante expérimentale) dans lequel chaque ver est entré au début de l'essai ; le nombre de vers vivants dans chaque compartiment, à la fin de l'essai ; le nombre de vers morts dans chaque compartiment, à la fin de l'essai ; le nombre de vers vivants ou morts, aperçus sur le sol de chaque compartiment à la fin de l'essai ; les symptômes pathologiques évidents (par ex. plaies) ou franches anomalies du comportement (par ex. léthargie) chez les survivants, dans chaque compartiment, à la fin de l'essai.
Effet biologique mesuré	— Le nombre de vers vivants dans chaque variante expérimentale dans chaque enceinte (c'est-à-dire le nombre total de vers vivants dans les trois compartiments renfermant le même sol à l'étude, pour chacune des deux variantes expérimentales), à la fin de l'essai.
Paramètres statistiques	— Le pourcentage de vers vivants, par variante expérimentale, dans chaque enceinte, à la fin de l'essai ; la CE 50 ou la concentration efficace correspondant à un autre taux que 50 % pour la réaction d'évitement, si l'essai était à plusieurs concentrations.
Validité de l'essai	— Essai invalide si le taux moyen de survie après 14 jours dans le sol témoin négatif est inférieur à 90 %.
Essai avec un toxique de référence	— À réaliser une fois par mois ou conjointement avec un ou des essais définitifs sur échantillons de sol ; utiliser l'acide borique ; préparer et éprouver au moins 5 concentrations, plus un témoin négatif, en utilisant du sol artificiel comme substrat ; déterminer la CL 50 après 7 jours (y compris ses limites de confiance à 95 %) conformément aux conditions et aux modes opératoires exposés dans le § 4.1.8 ; exprimer le résultat en milligrammes d'acide borique par kilogramme sec de vers (mg/kg).
Sol prélevé sur le terrain	
Transport et entreposage	— Conserver dans un récipient de plastique et réduire au minimum l'espace libre ; transporter à l'obscurité (par ex. dans une glacière opaque, un seau de plastique ou un autre récipient opaque) ; ne pas congeler ni surchauffer pendant le transport ; conserver à l'obscurité, à 4 ± 2 °C ; l'essai devrait débuter dans un délai de deux semaines et il doit débuter dans un délai de six semaines, à moins qu'il ne soit établi que les contaminants du sol sont stables.
Sol témoin négatif	— Sol naturel, prélevé sur le terrain, non contaminé ou sol artificiel, pour lequel des essais antérieurs de réaction aiguë d'évitement effectués avec l'espèce d'expérience ont révélé que le critère de validité de l'essai pouvait être régulièrement respecté.
Sol de référence	— Un ou plusieurs échantillons pour les essais portant sur un sol prélevé sur le terrain ; idéalement, prélevés dans un ou des endroits que l'on présume ne pas être contaminés, mais près du lieu de prélèvement des sols à l'étude ; leurs caractéristiques, notamment le taux de matière organique, la répartition granulométrique, le pH, sont semblables à ceux du ou des sols à l'étude.
Caractérisation des sols à l'étude	— Au moins le taux d'humidité, la CRE, le pH, la conductivité, le taux de COT, le taux de matière organique et la composition granulométrique (taux de sables, de limons, d'argiles) ; facultativement, les contaminants auxquels on s'intéresse (par ex. métaux, HAP, pesticides).
Préparation des sols à l'étude	— Si nécessaire, retirer les débris et les organismes macroscopiques indigènes à l'aide d'une pincette ; si nécessaire, passer sous pression, au travers d'un tamis au maillage convenable (par ex. 4-6 mm) ; mélanger ; mesurer l'humidité des sols ; hydrater à l'eau désionisée ou distillée (ou, au besoin, déshydrater) pour obtenir le taux optimal de la capacité de rétention en eau (v. § 5.3) ; mélanger ; diluer avec du sol témoin négatif ou du sol de référence, si l'essai est à plusieurs concentrations ; s'assurer de son homogénéité.

Sol enrichi de substance(s) ou de produit(s) chimique(s)

Sol témoin négatif	— On recommande d'employer un sol artificiel ou du sol prélevé sur le terrain et *non contaminé.*
Caractérisation de la substance ou du produit chimique	— On devrait connaître au préalable la stabilité, la solubilité dans l'eau, la pression de vapeur, la pureté et la biodégradabilité de la ou des substances ou du ou des produits chimiques ajoutés au sol témoin négatif.
Solvant	— Le solvant préférable est l'eau désionisée ; si on utilise un solvant organique, l'essai doit comprendre un témoin de ce solvant.
Préparation de mélanges	— Le mode opératoire dépend de la nature de la substance ou des substances à analyser ainsi que du plan d'expérience et des objectifs de l'essai ; on peut préparer des mélanges de substances chimiques et de sol par agitation manuelle ou mécanique ; la ou les substances à l'étude peuvent être ajoutées en quantités mesurées en solution (c'est-à-dire dans l'eau ou dans un solvant organique) ou sous forme solide, à l'état pur ou non ; assurer l'homogénéité des mélanges.
Concentration des ajouts dans le mélange de sol	— Normalement, mesurée au début et à la fin de l'essai, en trois titres au moins : élevé, moyen et faible.

équivalant à un volume de 350 mL environ [43]. Ensuite, on devrait transvaser dans les trois autres compartiments de chaque enceinte une quantité pesée (cette quantité dépend de l'échantillon ; elle équivaut à un volume de 350 mL environ) [43] de *sol à l'étude* provenant du même *lot* de matière mélangée à l'étude. Selon la nature de l'essai (par ex. à concentration unique, avec 5 enceintes par variante expérimentale ; ou à plusieurs concentrations, chaque concentration étant employée dans une seule enceinte), on dépose la même matière (c'est-à-dire le sol à l'étude du même *lot*) dans trois compartiments en alternance par enceinte, dans une ou plusieurs enceintes expérimentales. On devrait égaliser la surface du sol déposé dans chaque compartiment (sans la comprimer) avec une cuiller, pour y répartir également le sol.

Après l'addition du sol *non contaminé* (c'est-à-dire du *sol témoin négatif* ou du *sol de référence*) et du *sol à l'étude* (c'est-à-dire effectivement ou potentiellement contaminé, provenant du même *lot*) dans chacun des trois compartiments en alternance de la même enceinte, on devrait couvrir chaque enceinte d'un couvercle (§ 3.1.3) pour réduire au minimum les pertes d'humidité. On devrait garder les enceintes à la température de l'expérience pendant la nuit (§ 4.2.2) pour permettre l'équilibration chimique des sols qui s'y trouvent.

Le lendemain (au jour 0), on introduit un à un 10 organismes (section 2) dans chaque enceinte. On devrait alors prélever d'un élevage (§ 2.3) ou d'une enceinte d'acclimatation (§ 2.4) un nombre excédentaire de vers par rapport au nombre de vers dont on a besoin pour l'essai. Dans cette enceinte, on devrait choisir des vers adultes (dont le clitellum est entièrement développé) dans l'intervalle acceptable de tailles (c'est-à-dire dont le poids frais individuel est de 250 à 600 mg, dans le cas d'*E. andrei*, de 250 à 800 mg, dans le cas d'*E. fetida*, ou 3 à 10 g, dans le cas de *L. terrestris*), les en retirer à la main (gantée) ou à l'aide d'une ou des branches aux arêtes émoussées d'une pincette à extrémités recourbées et les introduire rapidement dans un plat peu profond ou un plateau, propre, où on les rince rapidement à l'eau d'essai non contaminée (c'est-à-dire désionisée ou distillée). Ensuite, on dépose les vers dans un récipient de transfert (par ex. un plateau de verre ou d'aluminium mesurant environ 10 × 10 cm) doublée d'essuie-tout humecté d'eau d'essai. On devrait observer une dernière fois les vers de ce récipient pour s'assurer que leur aspect est normal. On devrait se débarrasser de tout ver atypique. Ensuite, on devrait choisir soigneusement, un à un, des vers d'une taille homogène, tout en s'assurant que celle-ci est acceptable, puis on devrait les transférer, un à la fois, dans la cheminée centrale de chaque enceinte expérimentale

43. Le poids frais de sol nécessaire pour constituer un volume d'environ 350 mL dépend de l'humidité, de la densité apparente et d'autres caractéristiques du sol, qui varient d'un échantillon à l'autre. En conséquence, on devrait le déterminer en transvasant la quantité d'échantillon permettant d'emplir un becher ou un bocal de verre de 500 mL, taré, jusqu'au trait de jauge de 350 mL inscrit sur sa paroi, après avoir doucement lissé (sans la comprimer) la surface du sol à la hauteur de ce trait. Ensuite, on devrait consigner le poids frais de cette quantité et transvaser un poids frais identique dans un compartiment sur deux des six compartiments d'une enceinte expérimentale, en alternance.

(dépourvue de sol). Après que l'on a introduit le premier ver dans la cheminée, on l'observe jusqu'à ce qu'il ait gagné un compartiment renfermant du sol. On introduit ensuite le second ver et on l'observe de même jusqu'à sa disparition dans un compartiment. On répète l'opération jusqu'à l'introduction des 10 vers par enceinte.

On devrait consigner le compartiment (et la nature de son contenu) dans lequel chaque ver est entré [44]. On devrait se débarrasser de tout ver qui n'entre pas dans un compartiment en moins de 30 minutes et le remplacer par un autre ver pris dans le récipient de transfert [45]. Dès que l'on a introduit un groupe de 10 vers dans une enceinte et que tous les vers ont gagné un compartiment (de *sol non contaminé* ou de *sol à l'étude*), on note l'heure (t = 0 h) et on place le couvercle sur l'enceinte. Toute enceinte construite de plexiglas transparent ou translucide (v. § 3.1.3) doit être entourée d'une enveloppe opaque (par ex. une feuille d'aluminium) ou gardée à l'obscurité durant l'essai [46].

Les vers choisis devraient être de taille semblable, et on ne devrait retenir que ceux qui semblent en bonne santé, qui présentent une couleur semblable et qui sont actifs lorsqu'on les retire de la litière. Il faut peser individuellement, pour déterminer la variabilité individuelle du poids des vers constituant l'échantillon, au moins 10 vers surnuméraires, au hasard, dans le groupe choisi pour servir dans l'essai. Il faut consigner les poids individuels, puis calculer et signaler le poids moyen (± σ) [Section 7].

44. Ces renseignements sont utiles pour déterminer si les vers sont entrés au hasard dans les compartiments et sont, au départ, répartis au hasard entre les compartiments (v. § 4.2.7) ou s'ils manifestent une préférence pour le sol *non contaminé* (c'est-à-dire le *sol témoin négatif* ou le *sol de référence*) par rapport au sol à l'étude se trouvant dans les autres compartiments de l'enceinte expérimentale.

45. Typiquement, le ver passe de la cheminée centrale à un compartiment en 3 à 5 minutes (Stephenson *et al.*, 1998).]

46. Durant l'essai, il faut garder les vers dans une obscurité ininterrompue, pour que la lumière ne modifie pas leurs comportement. L'emploi d'enceintes expérimentales d'acier inoxydable ou de plexiglas opaque assure efficacement le maintien de cette obscurité, sinon, il faut que l'essai se déroule à l'obscurité ou que l'on enveloppe les enceintes d'une feuille d'aluminium ou d'un autre matériau opaque.

4.2.2 Conditions expérimentales

- Il s'agit d'un essai sublétal pour déterminer la réaction aiguë (48 ou 72 h) d'évitement des sols à l'étude par les vers de terre adultes, pendant lequel on ne renouvelle pas ces sols et on ne dérange pas les vers pour les laisser choisir entre le sol *non contaminé* (c'est-à-dire un *sol témoin négatif* ou *sol de référence*) et le *sol à l'étude* (par ex. sol prélevé sur le terrain, dilué ou non ou, encore, concentration unique d'un sol additionné d'une substance).

- Chaque enceinte expérimentale est constituée d'une cheminée centrale, dépourvue de sol et de six compartiments sectoriels identiques, reliés entre eux, ce qui permet le déplacement des vers d'un compartiment à l'autre. Trois des compartiments de chaque enceinte renferment du sol *non contaminé*, du même *lot*, et les trois autres contiennent un seul *sol à l'étude* provenant du même lot. Chaque type de compartiment alterne avec l'autre (chaque compartiment renferme un sol différent de celui des compartiments contigus).

- Pour un essai à concentration unique, il faut employer au moins 5 enceintes expérimentales constituant autant de répétitions. Chaque enceinte comprend trois compartiments renfermant du sol *non contaminé* du même *lot* et trois compartiments renfermant un *sol à l'étude* du même lot. On dispose, en alternance, dans les cinq enceintes, des aliquotes identiques de sol *non contaminé* et de *sol à l'étude* des deux mêmes *lots*.

- Pour un essai à plusieurs concentrations, il faut employer au moins 5 enceintes, et on en recommande davantage (de 6 à 10). Chaque enceinte possède trois compartiments renfermant du sol *non contaminé* du même *lot* et une concentration unique de *sol à l'étude* du même lot. On introduit des parties aliquotes identiques de sol *non contaminé* provenant du même lot dans les compartiments de chaque enceinte en alternance. La concentration de sol à l'étude dans les trois compartiments disposés en alternance d'une enceinte donnée est identique (provenant du même lot) ; cependant, les concentrations de sol à l'étude diffèrent d'une enceinte à l'autre.

- L'essai doit se dérouler à une température journalière moyenne de 20 ± 2 °C. En outre, la température instantanée doit toujours se situer à 20 ± 3 °C.

- Les organismes sont maintenus dans une obscurité ininterrompue pendant la durée complète de l'essai.

4.2.3 Critère de validité de l'essai

Pour que l'essai soit valide, le taux de survie de tous les vers dans chaque enceinte expérimentale renfermant du sol témoin négatif ou du sol de référence plus le sol à l'étude doit être d'au moins 90 % à la fin de l'essai.

4.2.4 Alimentation

Durant l'essai, on ne donne pas de nourriture supplémentaire aux vers.

4.2.5 Observations et mesures pendant l'essai

Au début de l'essai, lorsque l'on introduit les organismes dans la cheminée centrale de chaque enceinte, on devrait consigner le compartiment dans lequel entre chaque ver (v. § 4.2.1). Ce genre d'observation n'est pas possible dès que l'essai débute ($t = 0$). On devrait veiller à ne pas déplacer ni autrement perturber les enceintes pendant l'essai (ou tant que l'on n'a pas inséré les cloisons amovibles, à la fin de l'essai, pour isoler les vers dans chaque compartiment ; v. § 4.2.6) [47]. Le principal paramètre à observer à la fin de l'essai est le nombre de vers vivants se trouvant dans chaque compartiment (v. § 4.2.6).

La température de l'air dans le laboratoire d'essais (§ 3.1) doit être mesurée quotidiennement (par ex. à l'aide d'un thermomètre à maximum et à minimum) ou en continu (par ex. à l'aide d'un thermographe).

Il faut mesurer et consigner le pH et l'humidité d'au moins une répétition de chaque sol à l'étude (y compris du *sol témoin négatif* et, le cas échéant, du *sol de référence*) au début et à la fin de l'essai. En outre, il est recommandé de mesurer la conductivité au début et à la fin de l'essai dans les cas où l'on prévoit que le sol à l'étude aura une forte teneur en sels. On devrait effectuer les premières mesures sur des sous-échantillons de chaque *lot* de sol à l'étude servant à la préparation des répétitions d'une variante expérimentale particulière (v. § 4.2.1). On devrait faire les mesures finales (c'est-à-dire à $t = 48$ h, dans le cas des eisénies ; $t = 72$ h, dans le cas de *L. terrestris*) sur des sous-échantillons de répétitions de chaque variante expérimentale à laquelle les vers ont été exposés, après les observations finales de la répartition des vers, de leur survie, de leur aspect et de leur comportement (v. § 4.2.6). On devrait effectuer des mesures du pH et de l'humidité du sol conformément aux conseils donnés au § 4.1.5.

On pourrait doser dans les sols à l'étude la ou les substances ou produits chimiques auxquels on s'intéresse. Dans ce cas, les conseils donnés au § 4.1.5 s'appliquent. Pour de plus amples renseignements, on devrait consulter les § 5.4 et 6.3.

4.2.6 Fin de l'essai

L'essai se termine après 48 heures d'exposition d'*E. andrei* ou d'*E. fetida* et après 72 heures d'exposition de *L. terrestris*. On retire alors le couvercle de chaque enceinte expérimentale, en veillant à ne pas perturber ni déplacer l'appareillage expérimental. Ensuite, on insère rapidement une cloison amovible (v. § 3.1.3, y compris la fig. 2) entre chaque compartiment, pour y confiner les vers. Immédiatement après, il faut dénombrer les vers morts et vivants se trouvant à la surface du sol de chaque compartiment et consigner les résultats. On devrait ensuite doucement vider chaque compartiment avec une cuiller ou une spatule, déposer le contenu dans un plateau de triage ou sur une feuille de plastique, y dénombrer les vers vivants et morts, puis consigner les résultats [48]. On devrait toucher doucement les vers qui semblent morts, à leur extrémité antérieure, avec une tige de verre ou une spatule. Par définition, la mort est l'absence de toute réaction. On se débarrasse des cadavres. On compte pour morts les vers manquant à l'appel. On devrait consigner l'aspect (par ex. normal ou signes d'altération de la couleur ou lésions) et le comportement (par ex. activité normale ou léthargie) de chaque ver survivant.

Immédiatement après cette évaluation, on devrait prélever des sous-échantillons de chaque sol à l'étude (y compris de *sol témoin négatif* et, le cas échéant, s'il est inclus dans l'essai, de *sol de référence* pour en déterminer le pH ou l'humidité (§ 4.2.5). On devrait alors doser également d'autres constituants (c'est-à-dire les contaminants) à l'aide de sous-échantillons représentatifs de chaque sol étudié (§ 4.2.5).

---

47. Les chocs, les vibrations ou d'autres phénomènes semblables (par ex. consécutifs au déplacement des enceintes pendant l'essai ou à la fin, mais avant l'insertion des cloisons latérales amovibles) qui dérangent les vers peuvent les amener à se déplacer d'un compartiment à l'autre, ce qui peut fausser les résultats (Stephenson, G.L., Aquaterra Environmental, Orton, ON, communication personnelle, 2001).

48. Il arrive, mais rarement, qu'un ver soit sectionné lors de l'insertion d'une cloison amovible à la fin de l'essai. Si on trouve un fragment de ver dans un compartiment, on le compte et on le consigne uniquement s'il s'agit du fragment antérieur.

4.2.7 Effets mesurés (paramètres) et calculs

À la fin de chaque essai, il faut consigner le nombre total de vers survivants dans le sol étudié (c'est-à-dire le sol effectivement ou potentiellement contaminé) et le sol *non contaminé* (c'est-à-dire le *sol témoin négatif* ou le *sol de référence*) de chaque enceinte expérimentale.

Dans l'essai à concentration unique, il faut calculer le nombre moyen (± σ) de vers survivants retrouvés dans le sol à l'étude et dans le sol *non contaminé* de chacune des cinq enceintes ou plus. On devrait comparer ces valeurs, statistiquement, à l'aide d'un *test* t *de Student unilatéral* ou d'un autre test statistique approprié pour les comparaisons par paire (v. § 5.5). Les résultats montrant un nombre moyen significativement moindre de vers survivants dans le sol à l'étude par rapport à ceux du sol *non contaminé* révèlent une réaction d'évitement du sol à l'étude (ou une réaction de préférence pour le sol *non contaminé*).

Dans l'essai à plusieurs concentrations, il faut dresser un tableau du nombre total de vers survivants à chaque concentration de sol à l'étude à l'intérieur de chaque enceinte expérimentale. La présence et l'intensité d'une réaction apparente d'évitement de chaque concentration sont déterminées d'après le nombre (moindre) de vers dans le sol à l'étude par rapport à une réaction *neutre* (pas d'évitement, pas de préférence). On définit la réaction neutre comme étant un nombre égal de vers dans le sol à l'étude et dans le sol *non contaminé* (c'est-à-dire le *sol témoin négatif* ou le *sol de référence*) à la fin de la période d'exposition. D'après cette définition, le nombre total de vers que l'on détermine se trouver dans un sol particulier à l'étude, dans une enceinte expérimentale, est converti en une valeur révélatrice du taux d'évitement, comme suit [49] :

$$\text{évite}^{\text{ment}}\ (\%) = \frac{\text{nbre vers}_{\text{sol non cont.}} - \text{nbre vers}_{\text{dans sol x}}}{\text{nbre total de vers}} \times 100$$

où :

nbre vers $_{\text{sol non cont.}}$	est le nombre de vers vivants trouvés dans tous les compartiments de sol *non contaminé*, à la fin de l'essai ;
nbre vers $_{\text{dans sol x}}$	est le nombre de vers vivants trouvés dans tous les compartiments de sol à l'étude, à la fin de l'essai ;
nbre total de vers	est le nombre total de vers vivants trouvés dans tous les compartiments, à la fin de l'essai.

Si les données le permettent, on devrait estimer la *concentration efficace médiane* (*CE 50*) et, si on le souhaite, toute autre concentration efficace (*CE* p, par ex. CE 20 ou CE 25) suscitant une réaction d'évitement (v. § 6.4), d'après le taux de réaction d'évitement déterminé pour chaque concentration expérimentale.

On pourrait souhaiter analyser les données montrant le nombre de vers entrant dans chaque compartiment au début de l'essai (v. § 4.2.1 et 4.2.5), pour vérifier le caractère aléatoire de cette réaction. Le test du χ^2 (EC, 2004b) convient à cette fin. Un écart significatif dû à la variante expérimentale (c'est-à-dire sol *non contaminé* par rapport au *sol à l'étude*) révèle une détection et une réaction initiales (c'est-à-dire évitement ou préférence) chez les vers de terre au sol à l'étude. Une différence significative entre les compartiments porte à croire en l'absence de mouvements aléatoires des vers dans les compartiments au début de l'essai.

4.2.8 Essais employant un toxique de référence

L'emploi régulier d'un toxique de référence est nécessaire pour évaluer, dans des conditions expérimentales normalisées, la sensibilité relative d'une partie de la population de vers de terre adultes dans un élevage particulier (§ 2.3.9) ou dans une enceinte particulière

49. D'après cette équation et en posant que les chiffres se fondent sur la distribution de chaque groupe de 10 vers dans une enceinte expérimentale, la réaction d'évitement de chaque sol à l'étude se calcule comme suit : si, dans le sol à l'étude, on compte : *a*) au moins 5 vers (5 − 5) ÷ 10 × 100 = 0 % d'évitement ; *b*) 4 vers (6 − 4) ÷ 10 × 100 = 20 % ; *c*) 3 vers (7 − 3) ÷ 10 × 100 = 40 % ; *d*) 2 vers (8 − 2) ÷ 10 × 100 = 60 % ; *e*) 1 ver (9 − 1) ÷ 10 × 100 = 80 % ; *f*) 0 ver (10 − 0) ÷ 10 × 100 = 100 % d'évitement. Si le plan d'expérience comprend deux enceintes par concentration (v. § 4.2.1), avec 10 vers dans chaque enceinte (c'est-à-dire *n* = 20), la même équation s'applique au calcul du taux d'évitement correspondant à chaque concentration. Par exemple, si, dans le sol à l'étude des deux enceintes, on trouve au moins : 10 vers (10 − 10) ÷ 20 × 100 = 0 % d'évitement ; 9 vers (11 − 9) ÷ 20 × 100 = 10 % d'évitement ; 8 vers (12 − 8) ÷ 20 × 100 = 20 % d'évitement, etc.

Tableau 5. — Liste de contrôle des conditions et des modes opératoires recommandés pour les essais visant à mesurer les effets d'une exposition prolongée de vers de terre (*Eisenia andrei*) à un sol contaminé sur leur survie, leur reproduction et leur croissance

Mode opératoire universel	
Type d'essai	— Essai de toxicité d'un sol entier, sans renouvellement du milieu (essai en conditions statiques).
Durée de l'essai	— ≥ 56 jours = ≥ 8 semaines
Organismes utilisés	— *E. andrei* d'élevage, adultes, dotés d'un clitellum ; poids frais individuels : 250-600 mg ; choisir des vers dont le poids frais est aussi semblable que possible ; 2 vers par enceinte expérimentale et 20 vers par variante expérimentale ; garder 7 jours dans un sol témoin négatif renfermant une nourriture ajoutée, identique à celle qui servira dans l'essai.
Nombre de répétitions	— 10 par variante expérimentale ; chaque répétition emploie 2 vers dans une enceinte expérimentale.
Sol témoin négatif	— Selon le plan et les objectifs de l'étude ; sol artificiel ou sol prélevé sur le terrain et *non contaminé* si l'essai porte sur les sols d'emplacements à l'étude ; pour les essais portant sur des substances ou des produits chimiques additionnés à un sol, on recommande d'employer un sol artificiel.
Enceinte expérimentale	— Bocal de verre de 500 ml ; pellicule transparente ou translucide, perforée (par ex. pellicule de saran ou de Parafilm[MD]), assujettie avec une bande élastique.
Quantité de sol dans l'enceinte expérimentale	— Poids frais identique, équivalent à un volume d'environ 350 mL ; environ 200 g (poids sec) s'il s'agit d'un sol artificiel.
Humidité des sols à l'étude	— Hydrater le sol au taux optimal de sa capacité de rétention en eau (CRE) si le sol a été prélevé sur le terrain (v. § 5.3) ou à environ 70 % de la CRE, si c'est un sol artificiel.
Température	— Moyenne journalière : 20 ± 2 °C ; température instantanée : 20 ± 3 °C.
Éclairage	— Par incandescence ou fluorescent ; intensité : 400-800 lux à la hauteur de la surface du sol dans l'enceinte expérimentale ; photopériode fixe : par ex. 16 ou 12 h.
Alimentation	— Gruau cuit (on recommande la marque Quaker Oats[MD] à cuisson rapide [3-5 min]) ; 5 ml (1 cuiller à thé) dans chaque enceinte ; déposer dans une petite dépression au centre du sol de chaque enceinte aux jours 0, 14, 28 et 42, uniquement.
Mesures effectuées pendant l'essai	— La température du laboratoire d'essais : journellement ou en continu ; l'humidité et le pH du sol à chaque concentration ou dans chaque variante expérimentale : au début et à la fin de l'essai ;
Observations pendant l'essai	— Le nombre total de vers adultes vivants dans chaque enceinte, aux jours 0 et 28 ; facultativement, le nombre de vers adultes vivants et morts, sur le sol de chaque enceinte au début de l'essai (t = 1 h) et au jour 28 ; la présence de nourriture non consommée dans la couche superficielle de sol de chaque enceinte, à chaque repas ; le nombre de jeunes vers dans chaque enceinte au jour 56 ; les symptômes pathologiques évidents (par ex. plaies) ou franches anomalies du comportement (par ex. léthargie) des vers dans chaque enceinte.
Effets biologiques mesurés	— Le nombre total de vers adultes vivants dans chaque répétition (c'est-à-dire dans chaque enceinte expérimentale) au jour 28 ; le poids sec total et le nombre de jeunes vers vivants dans chaque répétition, au jour 56.

Paramètres statistiques	— Le taux moyen (± σ) de survie des adultes à chaque variante expérimentale, au jour 28 ; le nombre moyen (± σ) de jeunes vivants dans chaque variante expérimentale, au jour 56 ; le poids sec moyen (± σ) de jeunes vivants dans chaque variante expérimentale, au jour 56 ; si l'essai est à plusieurs concentrations : la CL 50 après 28 jours, pour les vers adultes ; la CI p pour le nombre de jeunes vivants obtenus à chaque concentration pendant l'essai d'une durée de 56 jours ; la CI p pour le poids sec moyen de chaque ver survivant à chaque concentration à la fin de l'essai.
Validité de l'essai	— Essai invalide si : le taux moyen de survie des adultes, après 28 jours, dans le sol témoin négatif est inférieur à 90 % ; le taux moyen de reproduction des adultes dans le sol témoin négatif est inférieur à 3 jeunes vivants par adulte ; le poids sec moyen de chaque jeune ver dans le sol témoin négatif à la fin de l'essai est inférieur à 2,0 mg.
Essai avec un toxique de référence	— Nécessité de l'effectuer une fois par mois ou conjointement avec un ou des essais définitifs sur échantillons de sol ; utiliser l'acide borique ; préparer et éprouver au moins 5 concentrations, plus un témoin négatif, en utilisant du sol artificiel comme substrat ; se conformer aux conditions et aux modes opératoires des essais de toxicité de sols d'une durée de 7 jours décrits au § 4.1.8 ; déterminer la CL 50 après 7 jours (y compris ses limites de confiance à 95 %) ; exprimer le résultat en milligrammes d'acide borique par kilogramme sec de vers (mg/kg) ; sont également recommandés : des essais d'une durée de 8 semaines avec l'acide borique, effectués conformément au § 4.3, au moins deux fois par année ou conjointement avec un essai définitif d'une durée de 8 semaines.
Sol prélevé sur le terrain	
Transport et entreposage	— Conserver dans un récipient de plastique étanche et réduire au minimum l'espace libre ; transporter à l'obscurité (par ex. dans une glacière opaque, un seau de plastique ou un autre récipient opaque) ; ne pas congeler ni surchauffer pendant le transport ; conserver à l'obscurité, à 4 ± 2 °C ; l'essai devrait débuter dans un délai de deux semaines et il doit débuter dans un délai de six semaines, à moins qu'il ne soit établi que les contaminants du sol sont stables.
Sol témoin négatif	— Sol naturel, prélevé sur le terrain, non contaminé ou sol artificiel, sur lesquels des essais antérieurs d'une durée de 56 jours effectués avec *E. fetida* ont révélé que tous les critères de validité de l'essai pouvaient être régulièrement respectés.
Sol de référence	— Un ou plusieurs échantillons pour les essais portant sur un sol prélevé sur le terrain ; prélevés dans un ou des endroits que l'on présume ne pas être contaminés, mais dans les parages du lieu de prélèvement des sols à l'étude ; leurs caractéristiques, notamment le taux de matière organique, la répartition granulométrique, le pH, sont semblables à ceux du ou des sols à l'étude.
Caractérisation des sols à l'étude	— Au moins le taux d'humidité, la CRE, le pH, la conductivité, le taux de COT, le taux de matière organique et la composition granulométrique (taux de sables, de limons, d'argiles) ; facultativement, les contaminants auxquels on s'intéresse (par ex. métaux, HAP, pesticides).
Préparation des sols à l'étude	— Si nécessaire, retirer les débris et les organismes macroscopiques indigènes à l'aide d'une pincette ; si nécessaire, passer sous pression, au travers d'un tamis au maillage convenable (par ex. 4-6 mm) ; mélanger ; mesurer l'humidité des sols ; hydrater à l'eau désionisée ou distillée (ou, au besoin, déshydrater) pour obtenir le taux optimal de la CRE (v. § 5.3) ; mélanger ; diluer avec du sol témoin négatif ou du sol de référence, si l'essai est à plusieurs concentrations ; s'assurer de son homogénéité.

Sol enrichi de substance(s) ou de produit(s) chimique(s)

Sol témoin négatif	— On recommande d'employer un sol artificiel ou du sol prélevé sur le terrain et *non contaminé.*
Caractérisation de la substance ou du produit chimique	— On devrait connaître au préalable la stabilité, la solubilité dans l'eau, la pression de vapeur, la pureté et la biodégradabilité de la ou des substances ou du ou des produits chimiques ajoutés au sol témoin négatif.
Solvant	— Le solvant préférable est l'eau désionisée ; si on utilise un solvant organique, l'essai doit comprendre un témoin de ce solvant.
Préparation de mélanges	— Le mode opératoire dépend de la nature de la substance ou des substances à analyser ainsi que du plan d'expérience et des objectifs de l'essai ; on peut préparer des mélanges de substances chimiques et de sol par agitation manuelle ou mécanique ; la ou les substances à l'étude peuvent être ajoutées en quantités mesurées en solution (c'est-à-dire dans l'eau ou dans un solvant organique) ou sous forme solide, à l'état pur ou non ; assurer l'homogénéité des mélanges.
Concentration des ajouts dans le mélange de sol	— Normalement, mesurée au début et à la fin de l'essai, en trois titres au moins : élevé, moyen et faible.

d'acclimatation (§ 2.4.9) d'où on choisira les organismes dont on se servira dans un ou plusieurs essais définitifs de toxicité de sols, y compris de réaction aiguë d'évitement. Les essais avec un toxique de référence servent également à montrer la précision et la fiabilité des données produites par le personnel de laboratoire à l'égard de ce toxique de référence, dans des conditions expérimentales normalisées.

Il faut exécuter un essai de létalité d'une durée de 7 jour employant un toxique de référence conformément aux conditions et modes opératoires décrits dans le § 4.1.8 sur une partie de toute population de vers de terre adultes que l'on élève (§ 2.3) ou que l'on acclimate aux conditions expérimentales (§ 2.4) et qui fournit les vers pour l'essai de réaction aiguë d'évitement. On peut appliquer l'un ou l'autre des deux régimes décrits dans le § 4.1.8 pour l'exécution de cet essai de toxicité de référence simultanément à un essai de réaction aiguë d'évitement.

4.3 Essai pour mesurer les effets d'une exposition prolongée sur la survie, la reproduction et la croissance

Le but de cette méthode d'essai biologique est de mesurer les effets d'une exposition prolongée des vers de terre (*E. andrei* élevé en laboratoire) à un sol contaminé sur leur survie et le succès de leur reproduction ainsi que sur la croissance subséquente de leur progéniture.

Le tableau 5 expose la liste de contrôle sommaire des conditions et modes opératoires recommandés pour une application universelle de cette méthode d'essai biologique, de même que les conditions et modes opératoires recommandés pour l'essai de types précis de matières ou de substances (par ex. des échantillons de biosolides ou de *sol témoin négatif* additionné, au laboratoire, d'une ou de plusieurs substances ou produits chimiques). Cette méthode a été mise au point sous la houlette de l'ISO (1991, 1998) et de l'OCDE (OECD, 2000) pour l'exécution d'essais sur les effets d'un sol additionné d'une substance sur la reproduction d'*E. andrei/fetida* (v. annexe G).

Les modes opératoires universels de cet essai de mesure des effets sur la survie, la reproduction et la *croissance* de vers de terre sont décrits dans le présent document. Il s'agit d'un essai de toxicité d'un sol entier, lequel n'est pas renouvelé pendant les 56 jours (8 semaines) que dure l'essai. Ce dernier débute par le prélèvement de vers de terre adultes dans des élevages d'*E. andrei* [50, 51] de

50. Cette méthode est actuellement limitée à *E. andrei*, puisque le critère de validité de l'essai fondé sur un poids sec minimal acceptable des jeunes vers, à la fin de l'essai, n'a pas été établi pour *E. fetida*, avec le régime alimentaire exigé par la méthode (v. § 4.3.3 et 4.3.4).

51. Ces vers devraient provenir d'élevages de laboratoire, suivant les conseils du § 2.3. Dans les situations où le laboratoire d'essais est incapable de fournir des organismes élevés sur place, les vers peuvent être obtenus, jeunes ou adultes, d'une autre source utilisant des conditions, des modes opératoires et une assurance qualité pour l'élevage qui sont conformes aux conseils du § 2.3. Dans cette situation, cependant, il faut entretenir et acclimater les vers aux

laboratoire. Le plan d'expérience prévoit 10 enceintes expérimentales (répétitions) par variante expérimentale, avec deux vers adultes par enceinte. Après 28 jours (4 semaines) d'exposition des vers adultes de l'espèce, on consigne le nombre de vers survivants dans chaque enceinte et dans chaque variante expérimentale, puis on se débarrasse d'eux [52], tout en poursuivant l'essai pendant encore 28 jours pour mesurer les effets de l'exposition sur la croissance de leur progéniture (c'est-à-dire de jeunes vers). Tout au long des 8 semaines que dure l'essai, on nourrit les vers adultes et leur progéniture.

4.3.1 Début de l'essai

Les enceintes expérimentales sont des bocaux de verre de 500 mL (§ 3.1.4). Chaque enceinte (v. § 3.1.4) se trouvant dans le laboratoire d'essais doit être clairement codée ou étiquetée pour permettre l'identification de l'échantillon ou de sa concentration. Il faut enregistrer la date et l'heure du début de l'essai, soit directement sur les étiquettes ou sur des feuilles de données séparées, consacrées à l'essai. On devrait placer les enceintes de façon à faciliter les observations et les mesures. Les diverses variantes expérimentales devraient être réparties au hasard dans le laboratoire d'essais (EC, 1997a, b, 2001).

La première journée d'exposition des animaux aux échantillons de matière ou de substance à l'étude est appelée *jour 0*. La veille (c'est-à-dire au jour – 1), on devrait mélanger à fond chaque échantillon ou sous-échantillon de sol à l'étude ou de matière particulaire semblable, y compris le *sol témoin négatif* et, le cas échéant, le *sol de référence* [53] (v. § 5.3 et 6.2) pour obtenir un mélange homogène pour ce qui concerne la couleur, la texture et l'humidité. Si les échantillons prélevés sur le terrain du *sol d'un emplacement* sont préparés en vue d'un essai, on devrait le débarrasser des grosses particules avant le mélange, de même que de toute végétation ou de tout invertébré macroscopique (v. § 5.3).

La quantité de chaque sol à l'étude mélangé en tant que *lot* devrait suffire à la préparation des répétitions de cette variante expérimentale (v. tableau 5) plus une quantité supplémentaire destinée aux analyses physicochimiques à effectuer (§ 4.3.5) et un excédent pour compenser la fraction adhérant aux parois du récipient de mélange après le prélèvement des aliquotes pour l'essai et les analyses. On devrait connaître ou déterminer l'humidité de chaque sol à l'étude et effectuer les ajustements nécessaires par mélange d'*eau d'essai* (ou, au besoin) par séchage de l'échantillon à l'air) jusqu'à l'obtention du degré recherché d'humidité (v. § 5.3 et 6.2). On pourrait effectuer des mesures quantitatives de l'homogénéité d'un *lot* en prélevant des aliquotes du mélange pour les mesures telles que l'analyse granulométrique, le COT (%), la teneur en matière organique (%), l'humidité (%) et la concentration de substances particulières.

Immédiatement après le mélange d'un *lot*, on devrait transvaser dans chaque enceinte expérimentale (répétition) un poids frais identique de sol équivalant à un volume d'environ 350 mL [54] (§ 3.1.4). On devrait égaliser la surface du sol ajouté à chaque enceinte (mais sans la comprimer) ou en tapotant trois fois le bocal contre le dessus de la paillasse.

Pour chaque variante expérimentale (par ex. le *sol d'un emplacement à l'étude* utilisé dans l'essai uniquement à la concentration de 100 % ; ou une concentration particulière d'un sol à l'étude ou d'un sol additionné d'une substance et mélangé à du sol *non contaminé*), on devrait préparer 10 enceintes (répétitions) à l'aide d'aliquotes du même *lot*, de poids frais identiques (équivalant à environ 350 mL par aliquote). Chaque essai doit comprendre 10 enceintes renfermant des aliquotes de *sol témoin négatif* (§ 3.2)

---

conditions du laboratoire dans une installation fournie par le laboratoire d'essais, conformément aux conseils du § 2.4, avant de les utiliser dans cette méthode d'essai biologique. L'emploi de vers de terre prélevés sur le terrain ou obtenus d'un fournisseur du commerce dont les protocoles d'assurance ou de maîtrise de la qualité sont inconnus est inacceptable pour les besoins de cette méthode d'essai.

52. Si on s'intéresse aux résidus de contaminants dans le corps ou les tissus des vers, on pourrait plutôt congeler ces derniers (– 20 °C) en vue d'analyses ultérieures.

53. Tout liquide qui se sera séparé de l'échantillon ou sous-échantillon de sol pendant le transport ou l'entreposage doit y être incorporé de nouveau par mélange.

54. Le poids frais de sol nécessaire pour obtenir un volume d'environ 350 mL dépend de l'humidité, de la densité apparente et d'autres caractéristiques du sol ; il varie d'un échantillon à l'autre. En conséquence, on devrait le déterminer, pour chaque échantillon, en transvasant la quantité nécessaire pour remplir un becher ou un bocal de verre taré de 500 ml jusqu'au trait de jauge de 350 ml inscrit sur la paroi, en égalisant doucement (sans la comprimer) sa surface à la hauteur de cette marque. Ensuite, on devrait déterminer le poids frais correspondant à ce volume et le consigner, puis transvaser un poids frais identique de sol dans chaque enceinte expérimentale (répétition).

provenant du même *lot.* Pour un essai à plusieurs concentrations, il faut préparer au moins 7 concentrations plus le ou les témoins, et on recommande davantage (c'est-à-dire au moins 10 plus les témoins) [55]. Dans certains cas, des essais préliminaires ou des essais de recherche de la gamme de concentrations à utiliser pourraient être justifiés. Dans ce cas, on pourrait réduire le nombre de répétitions par concentration (v. § 6.2).

Il est recommandé d'inclure dans l'essai au moins une enceinte supplémentaire renfermant un *sol témoin négatif* et une autre renfermant un *sol de référence* et/ou la plus faible concentration de sol à l'étude (s'il s'agit d'un essai à plusieurs concentrations). Ces répétitions supplémentaires, dont on n'analysera pas les résultats et pour lesquels on n'est pas tenu de signaler ces derniers, sont utiles à l'évaluation préliminaire de la production, acceptable ou non, de jeunes dans ces variantes expérimentales au jour 28 (v. § 4.3.3 et 4.3.5). Si, au jour 28, la production de jeunes n'y est pas acceptable, on peut choisir de prolonger la durée d'exposition des adultes dans les enceintes utilisées pour l'essai définitif, de 28 à 35 jours (v. § 4.3.5), auquel cas la durée de l'essai serait de 63 jours plutôt que de 56.

Après l'ajout d'une aliquote mesurée (poids frais identique ; volume : ~ 350 mL) du sol à l'étude dans chaque enceinte, on devrait recouvrir cette dernière d'une pellicule non perforée (v. § 3.1.4) afin de réduire au minimum la perte d'humidité. Pendant la nuit, on devrait garder les enceintes dans les conditions expérimentales de température et d'éclairage (§ 4.3.2) pour permettre l'équilibration chimique des sols. Au jour 0 (c'est-à-dire au démarrage de l'essai), on devrait perforer chaque pellicule [56].

Le lendemain (au jour 0 de l'essai), on transfère les organismes d'expérience (v. § 2.3.8) dans chaque enceinte expérimentale. Pour l'essai, il faut utiliser des vers adultes (au clitellum complètement développé), d'une taille acceptable (c'est-à-dire dont le poids frais individuel est de 250 à 600 mg). Les adultes utilisés doivent avoir été gardés dans une installation du laboratoire d'essais pendant au moins sept jours, pendant lesquels on les a acclimatés au *sol témoin négatif*, dans des conditions d'alimentation, de température et d'éclairage identiques à celles de l'essai (v. § 2.3.8 et 2.4, notamment 2.4.1 et 2.4.8). On devrait retirer du vivarium (§ 2.3) ou de l'enceinte d'entretien ou d'acclimatation (§ 2.4) un nombre excédentaire de vers par rapport aux besoins pour l'essai. Les vers choisis pour l'essai devraient être de tailles (c'est-à-dire de poids frais initial) aussi semblables que possible, d'après l'intervalle des poids frais individuels des vers de l'élevage dont ils proviennent. On ne devrait choisir que les vers semblant en bonne santé, dont la couleur est semblable et qui sont actifs lorsqu'on les retire de la litière. Ces vers devraient être choisis dans ce vivarium, en être retirés à la main (gantée) ou au moyen d'une ou des deux branches émoussées d'une pincette incurvée et on devrait les transférer rapidement dans un plat peu profond ou un plateau propre où on les rince rapidement à l'eau d'essai non contaminée (c'est-à-dire de l'eau désionisée ou distillée). Ensuite, on dépose les vers dans un récipient de transfert, par exemple un bac de verre ou d'aluminium mesurant environ 10 × 10 cm), tapissé d'un essuie-tout humecté d'eau d'essai. On devrait effectuer une observation finale des vers de ce récipient pour s'assurer de leur aspect normal. On devrait se débarrasser de tout ver atypique. Ensuite, on devrait soigneusement choisir les vers, un à la fois, de tailles aussi semblables que possible, tout en s'assurant qu'ils se trouvent dans l'intervalle acceptable de tailles, puis on les introduit individuellement (à la main ou à l'aide des branches émoussées d'une pincette à extrémité incurvée) dans les enceintes expérimentales. L'ordre dans lequel on introduit les vers dans les enceintes devrait être décidé au hasard, pour ce qui concerne les variantes expérimentales.

On dépose les vers à la surface du sol à l'étude de chaque

55. L'emploi d'au moins 10 concentrations (plus les témoins) est conseillé. Il faut beaucoup de variantes expérimentales pour montrer l'allure de la relation concentration-réponse et choisir le modèle convenable de régression linéaire ou non linéaire (v. § 6.4.2.1). L'emploi d'au moins 10 concentrations est particulièrement prudent si on veut déterminer la CL 50 après 28 j pour les vers adultes ainsi que les concentrations inhibitrices (CI p) de la reproduction et de la croissance (v. § 4.3.7). Dans certains essais visant à mesurer les effets d'une exposition prolongée, on pourrait souhaiter se concentrer sur les effets sublétaux mesurés et ne pas calculer de CL 50 après 28 j, auquel cas de 7 à 9 concentrations (plus les témoins) pourraient se révéler convenables.

56. Si l'essai porte sur un échantillon de sol contaminé par des composés volatils, il est recommandé de ne pas perforer la pellicule pendant la première semaine de l'essai pour réduire au minimum les émissions gazeuses et augmenter l'exposition des vers à ces composés. On devrait cependant perforer la pellicule au jour 7 (Stephenson *et al.*, 2001). Il faut traiter de façon identique toutes les enceintes, y compris celles qui renferment un sol témoin négatif.

enceinte, à raison de deux vers par enceinte. On devrait consigner, pour chaque enceinte, le nombre de vers n'ayant pas pénétré dans sol de chaque bocal une heure après leur introduction [57]. Il faut mesurer et consigner les poids frais individuels d'au moins 20 vers au moment de leur introduction dans les enceintes, pour déterminer la variabilité de la taille initiale des vers utilisés dans l'essai. Ces poids peuvent être ceux de vers excédentaires appartenant au groupe choisi pour l'essai ou le poids de individuel des vers représentant les diverses variantes expérimentales, ce poids ayant été consigné au moment de l'introduction des vers dans les enceintes. Il faut calculer et signaler (section 7) le poids moyen (± σ) de ces vers.

4.3.2 Conditions expérimentales

- Il s'agit d'un essai de toxicité d'un sol entier d'une durée de 56 jours (8 semaines) [58], durant lequel on ne renouvelle pas le sol des enceintes.
- L'enceinte est un bocal de verre de 500 mL. Son contenu (c'est-à-dire 350 mL de sol à l'étude) devrait normalement être recouvert d'une pellicule transparente ou translucide (par ex. saran ou Parafilm[MD]) [§ 3.1.2] fixée au rebord du bocal par un élastique. Si on sait que le sol renferme des composés volatils (HAP, par ex.), il est recommandé de recouvrir l'enceinte d'une feuille d'aluminium opaque, tout en assurant un éclairage latéral suffisant pour fournir l'intensité lumineuse minimale dont on a besoin à la surface du sol (v. le dernier alinéa du présent paragraphe [4.3.2]).
- Pendant les préparatifs de l'essai, il faut, pour chaque variante expérimentale, 10 enceintes (de 2 vers chacune). Pour un essai à plusieurs concentrations, il faut préparer au moins 7 concentrations plus le ou les témoins appropriés, à raison de 10 répétitions par concentration, et on recommande davantage de concentrations (c'est-à-dire au moins 10 plus les témoins).
- L'essai doit être réalisé à la température journalière moyenne de 20 ± 2 °C. En outre, la température instantanée doit toujours être de 20 ± 3 °C.
- L'éclairage des enceintes doit avoir une photopériode journalière fixe (par ex. 16 h ou 12 h), assurée par des lampes à incandescence ou fluorescentes. La photopériode choisie doit être la même que celle à laquelle les vers ont été préalablement été acclimatés (v. § 2.3.3 et 2.4.3). L'intensité lumineuse près de la surface du sol de chaque enceinte devrait être de 400 à 800 lux et elle doit être d'au moins 400 lux. Cet intervalle équivaut à un flux quantique de 5,6 à 11,2 $\mu mol/(m^2 \cdot s)$ sous éclairage fluorescent blanc et cru, de 6,4 à 12,8 $\mu mol/(m^2 \cdot s)$ sous éclairage fluorescent à spectre continu ou de 7,6 à 15,2 $\mu mol/(m^2 \cdot s)$ sous éclairage à incandescence.
- Dans chaque enceinte il faut donner aux vers une quantité identique (c'est-à-dire 5 mL = 1 cuillerée à thé) de bouillie d'avoine (gruau) [v. § 4.3.4], aux jours 0, 14, 28 et 42 uniquement.

4.3.3 Critères de validité de l'essai

Pour que les résultats de cette méthode d'essai biologique soient considérés comme valides, il faut respecter chacune des conditions suivantes :

- Le taux moyen de survie des vers adultes maintenus dans le *sol témoin négatif* pendant 28 jours doit être d'au moins 90 % [59, 60].
- Le taux de reproduction des vers adultes dans le *sol témoin négatif* doit être en moyenne d'au moins 3 jeunes vivants par adulte [60].
- Le poids sec individuel moyen des jeunes vers dans le *sol témoin négatif* doit être d'au moins 2,0 mg à la fin de l'essai.

4.3.4 Alimentation

Normalement, on donne aux vers de chaque enceinte une quantité mesurée de bouillie d'avoine (v. § 2.3.6) à

57. L'absence de fouissement pourrait traduire une réaction d'évitement chez les vers. Ce pourrait être également le signe de leur mauvais état de santé au début de l'essai. La comparaison du taux moyen (± σ) des vers fouissant dans le *sol témoin négatif* (et, le cas échéant, dans le *sol de référence*) pendant la première heure de l'essai, au taux de vers fouissant dans chaque sol à l'étude, pendant cette période (ou ensuite, v. § 4.3.5), pourrait révéler la possibilité que les vers manifestent une réaction d'évitement à une ou à plusieurs des variantes expérimentales.

58. On peut opter pour la prolongation de l'essai à 63 jours (9 semaines) [v. § 4.3.1 et 4.3.5].

59. On peut opter pour la prolongation de la durée d'exposition des vers adultes à 35 jours (v. § 4.3.1 et 4.3.5), auquel cas ce taux de survie s'applique également.

60. L'ISO (1998) et l'OCDE (OECD, 2000) ont appliqué ce critère (ou une valeur équivalente) pour décider de la validité de l'essai de mesure des effets de substances chimiques sur la reproduction d'*E. andrei/fetida*.

chacune des journées suivantes de l'essai, uniquement : jours 0, 14, 28 et 42[61]. La quantité de nourriture distribuée dans chaque enceinte à chacun de ces repas doit être d'un volume identique (c'est-à-dire 5 mL = 1 cuiller à thé) de bouillie d'avoine dont le poids sec équivaut à 230 à 250 mg de flocons d'avoine secs (Stephenson, G.L., Aquaterra Environmental, Orton, ON, communication personnelle, 2001). On prépare cette bouillie pour chaque repas en ajoutant un tiers de volume de flocons d'avoine séchés (on recommande les flocons d'avoine Quaker Oats[MD] à cuisson rapide [3 à 5 min] ; v. § 2.3.6) à deux tiers de volume d'eau désionisée et on fait cuire au four à micro-ondes pendant 3 à 5 minutes seulement, à « haute » température, puis on laisse refroidir (Stephenson, G.L., Aquaterra Environmental, Orton, ON, communication personnelle, 2001). On peut également faire bouillir les flocons séchés dans de l'eau désionisée pendant 3 à 5 minutes sur une plaque chauffante ou un élément de cuisinière, tout en agitant périodiquement. On devrait laisser le mélange refroidir, le brasser tout en prélevant chaque aliquote de 5 mL à distribuer à chaque enceinte. La consistance recommandée de la bouillie est celle d'une suspension visqueuse ; on peut ajouter de l'eau à la bouillie (ou prolonger au besoin la durée de cuisson) pour obtenir cette viscosité.

Au jour 0, avant d'introduire les vers dans les enceintes, on devrait pratiquer une petite dépression au centre de la surface du sol de chaque enceinte. On devrait déposer dans cette dépression 5 mL (= 1 cuillerée à thé) de bouillie d'avoine puis recouvrir cette dernière d'une mince couche de sol environnant pour réduire la croissance de champignons microscopiques. On devrait ensuite introduire les vers adultes, à raison de 2 par enceinte (v. § 4.3.1). Au jour 14, on retire la pellicule obturant chaque enceinte et on distribue une autre portion de 5 mL de bouillie d'avoine (conformément au mode opératoire du jour 0). Au jour 28 et après le retrait des vers adultes et le retour du reste du contenu du bocal dans chaque enceinte (§ 4.3.5), on distribue dans chaque enceinte une autre portion de 5 mL de bouillie d'avoine (pour le développement et la croissance de la progéniture des vers), de la même manière qu'auparavant. Au jour 42, on distribue une dernière portion de 5 mL de bouillie d'avoine dans chaque enceinte. Quand on dépose la nourriture dans les enceintes, aux jours 14, 28 et 42, on ne devrait pas toucher à la vieille nourriture dont on constante la présence dans la couche superficielle de sol (puisque les vers nouveau-nés y creusent fréquemment leurs galeries).

4.3.5 Observations et mesures pendant l'essai

Il faut observer et consigner l'état, l'aspect et le nombre de vers vivants introduits dans chaque enceinte au jour 0. Une heure après, on devrait consigner le nombre de vers à la surface du sol de chaque bocal ou collé contre la paroi interne ou le fond de chaque enceinte (v. § 4.3.1).

À chaque distribution de nourriture (v. § 4.3.4), on devrait retirer la pellicule recouvrant chaque enceinte et consigner le nombre de vers morts ou vivants se trouvant à la surface du sol. Ensuite, on devrait examiner la couche de surface du sol de chaque enceinte pour évaluer la présence et la quantité de tout reste de nourriture et pour décider s'il faut ou non sauter le repas (v. § 4.3.4). On devrait alors faire des observations et consigner le nombre de vers aperçus à l'intérieur de chaque bocal, sur les parois de verre ou le fond (ce qui pourrit être un signe d'une réaction d'évitement du sol qui s'y trouve).

Au jour 28, on devrait retirer les pellicules de toute enceinte supplémentaire que l'on utilise pour déterminer si, dans les variantes expérimentales auxquelles on s'intéresse, la production de progéniture est acceptable (v. § 4.3.1) à cette date [62]. On devrait examiner le contenu de ces enceintes supplémentaires pour y déceler la présence de cocons ou de jeunes vers. Si on observe des cocons ou

61. Si, aux jours 14 et/ou 28 uniquement, on constate la présence de restes de nourriture (c'est-à-dire un reste du bol de bouillie) dans la couche superficielle de sol dans une partie ou la totalité des bocaux représentant une variante expérimentale, on ne devrait pas fournir de nourriture supplémentaire aux vers de ces enceintes, tandis que les vers de toutes les autres enceintes où il ne reste manifestement pas de nourriture devraient recevoir leur ration normale (c'est-à-dire 5 mL de bouillie d'avoine). Pour éviter le risque de gavage et celui d'une prolifération de moisissures ou de sorption excessive de contaminants toxiques causée par les restes, risques qui peuvent être propres à l'enceinte, il est recommandé de faire sauter ces repas aux vers en prenant une décision pour chaque bocal. Dans toute variante expérimentale où se trouve du sol artificiel ou constituée de sol artificiel, on doit donner à manger aux vers aux jours prévus, sans exception (c'est-à-dire aux jours 0, 14, 28 et 42), puisque ce sol est par ailleurs déficient en aliments organiques naturels.

62. Ces enceintes supplémentaires pourraient comprendre au moins un bocal supplémentaire renfermant du sol témoin négatif, au moins un bocal renfermant du sol de référence (si cela fait partie de l'essai définitif) et au moins un bocal renfermant la concentration minimale de sol à l'étude dans un essai à plusieurs concentrations.

des jeunes dans chacune de ces variantes expérimentales, on devrait retirer la pellicule de chacune des enceintes servant à l'essai définitif et on devrait en examiner le contenu (voir l'alinéa suivant). Si on n'observe ni cocon ni jeune ver dans les enceintes supplémentaires représentant chacune de ces variantes, il est recommandé de ne pas perturber les enceintes utilisées dans l'essai définitif pendant encore 7 jours avant d'en examiner et d'en retirer les adultes (ESG, 2001, 2002 ; ESG et Aquaterra Environmental, 2002). Dans ce cas, on devrait remplacer le contenu de chaque enceinte supplémentaire (y compris tous les cocons et tous les vers vivants, jeunes et adultes) et le maintenir dans les conditions expérimentales jusqu'à ce qu'on le réexamine.

Ensuite (c'est-à-dire au jour 28 ou, parfois, au jour 35 ; v. l'alinéa précédent), il faut retirer la pellicule recouvrant chaque enceinte servant à l'essai définitif, tout comme on devrait le faire pour les pellicules recouvrant chaque enceinte supplémentaire. On devrait consigner le nombre de vers adultes morts et vivants à la surface du sol et collés contre la paroi intérieure ou le fond de verre de chaque enceinte. Ensuite, on doit transvaser le contenu de chaque enceinte dans un bac de tri ou sur une feuille de plastique et dénombrer les vers adultes, vivants et morts, et consigner les résultats. On devrait toucher doucement les adultes qui semblent morts, à leur extrémité antérieure, avec une tige de verre ou une spatule ; par définition, la mort est l'absence de toute réaction. Il faut compter pour morts les adultes manquant à l'appel. On devrait consigner l'aspect (par ex. normal ou signes d'altération de la couleur ou lésions) et le comportement (par ex. activité normale ou léthargie) de chaque adulte survivant. Immédiatement après cette évaluation, il faut se débarrasser de tous les adultes (les vivants comme les morts) et retourner le sol à l'étude dans son bocal avec tout cocon ou tout jeune qui s'y trouve. Il faut replacer la pellicule recouvrant chaque enceinte. Les observations du nombre de jeunes verts nés pendant l'essai et de leur *croissance* (poids sec final des vers), de leur aspect et de leur comportement se font à la fin de l'essai (c'est-à-dire au jour 56 ou, parfois, 63).

Il faut mesurer la température de l'air dans le laboratoire d'essais (§ 3.1) quotidiennement (par ex. au moyen d'un thermomètre à maximum et à minimum) ou en continu (par ex. au moyen d'un thermographe).

Chaque semaine, on devrait examiner l'humidité apparente du contenu d'une ou de plusieurs enceintes expérimentales correspondant à chaque variante expérimentale. Si, dans l'une d'elles, le sol semble trop sec en quelque moment que ce soit pendant l'essai, on devrait examiner toutes les répétitions représentant cette variante et on devrait humidifier la surface du sol de chaque enceinte qui semble trop sec, par pulvérisation d'eau désionisée, à l'aide d'un dénébulisateur distribuant environ 1 mL d'eau à chaque coup [63]. C'est au moment de la distribution de nourriture (c'est-à-dire aux jours 0, 14, 28 et 42) que l'on juge de l'humidité apparente de chaque sol à l'étude et que l'on pulvérise de l'eau à la surface de chaque répétition, au besoin.

Au début et à la fin de l'essai, il faut mesurer et consigner le pH et l'humidité du sol à l'étude représentant chaque variante expérimentale (y compris le *sol témoin négatif* et, le cas échéant, le *sol de référence*). En outre, il est recommandé de mesurer la conductivité au début et à la fin de l'essai, dans les cas où le sol à l'étude contiendrait une forte teneur en sels. Les mesures initiales devraient porter sur un échantillon composite constitué de sous-échantillons de chaque *lot* du sol à l'étude que l'on utilise pour la préparation des répétitions d'une variante expérimentale particulière (v. § 4.3.1). Les mesures finales (c'est-à-dire au jour 56 ou, parfois, au jour 63) devraient se faire sur des sous-échantillons des répétitions de chaque variante à laquelle les vers ont été exposés, après les observations finales de la répartition, de la survie, de l'aspect et du comportement des vers (v. § 4.2.6). On devrait mesurer le pH et l'humidité du sol conformément aux conseils du § 4.1.5.

On pourrait doser dans les sols à l'étude les substances ou

63. L'humidité apparente d'un sol dépend du degré d'activité des vers qui y vivent, de même que de la nature du sol et de la quantité d'eau perdue par évaporation. Typiquement, la perte due à l'évaporation dans une enceinte expérimentale peut atteindre 3 mL par semaine. Cependant, les apports hebdomadaires d'eau entraînent fréquemment un excès d'humidité du sol à la fin de l'essai. Toute décision concernant la pulvérisation ou non d'eau à la surface du sol de chaque enceinte devrait se fonder sur l'humidité apparente du sol, pendant chaque période hebdomadaire d'observations (Stephenson, G.L., Aquaterra Environmental, Orton, ON, communication personnelle, 2001). Pour évaluer cette propriété, on devrait soumettre un peu (une pincée) de sol de surface de l'enceinte à un essai qualitatif d'expression de l'humidité (v. § 5.3). Si le sol n'exprime pas d'eau, c'est qu'il est probablement trop sec. Dans ce cas, on devrait pratiquer une légère nébulisation d'eau à la surface du sol de l'enceinte.

produits chimiques auxquels on s'intéresse. Les conseils du § 4.1.5 s'appliquent ici. On devrait consulter les § 5.4 et 6.3 pour de plus amples renseignements.

4.3.6 Fin de l'essai

Pour conclure l'essai de toxicité d'un sol, on devrait consigner le nombre de jeunes vers vivants que l'on observe à la surface du sol, dans chaque enceinte ayant servi à l'essai définitif, ou collés contre la paroi ou le fond de verre de chaque enceinte, au jour 56 (ou, parfois, au jour 63 ; v. § 4.3.5). Ensuite, il faut compter et consigner le nombre de jeunes vers vivants qui se trouvent à l'intérieur de chaque enceinte.

Dans le cadre des études de mise au point connexes à la normalisation de cette méthode d'essai biologique, Stantec et Aquaterra Environmental (2004) ont conçu un mode opératoire inédit d'extraction thermique pour recouvrer les jeunes survivants dans le sol de chaque enceinte, à la fin de l'essai. Ce mode d'extraction s'est révélé efficace et efficient : nous en recommandons l'utilisation régulière avec cette méthode d'essai[64]. Pour l'appliquer, on transfère successivement les bocaux dans un bain d'eau thermostaté (40 à 45 °C), tout en s'assurant que son niveau ne s'élève pas au-dessus de la moitié de la hauteur de sol dans chaque bocal. On laisse le bocal dans l'eau pas plus de 15 minutes. Ensuite; on extrait soigneusement la couche superficielle de 2 cm de sol du bocal et on la dépose dans un bac de tri ou sur une feuille de plastique. On fouille ce sous-échantillon de sol à l'étude à l'aide d'une pincette à bout émoussé, tout en récupérant tous les jeunes vers survivants. On devrait toucher doucement les vers qui semblent morts à leur extrémité antérieure au moyen d'une tige de verre ou d'une spatule. Par définition, la mort est l'absence de toute réaction. On se débarrasse des cadavres.

On devrait consigner, pour chaque enceinte, l'apparence (par ex. normal ou signes d'altération de la couleur ou lésions) et le comportement (par ex. activité normale ou léthargie) des vers survivants. Ensuite, on doit rapidement rincer les jeunes vers survivants retrouvés dans chaque enceinte à l'eau désionisée ou distillée, pour éliminer toute particule de sol adhérente. On doit ensuite transférer collectivement les vers rincés de chaque enceinte sur une serviette de papier ou sur du papier buvard humides. On devrait ensuite les transférer dans une coupelle à peser, propre, d'aluminium, préalablement numérotée, tarée et gardée au dessiccateur[65].

Le nombre de cocons dont des jeunes ont éclos ou non, à la fin de l'essai, bien qu'il ne fasse pas partie de l'effet mesuré par l'essai (v. § 4.3.7), pourrait se révéler utile pour certains essais, pour discerner un effet nocif sur le développement (retardé) des vers de terre ou la survie des jeunes au début de leur vie. Pour permettre cette observation (facultative), on devrait consigner le nombre de cocons dont des jeunes ont éclos ou non et que l'on a trouvés dans chaque enceinte [66]. Comme l'extraction thermique, décrite ci-dessus, ne convient pas à un essai exigeant la récupération des cocons, il faut soigneusement fouiller tout le sol de chaque enceinte, tout en recouvrant et en dénombrant les cocons dont des jeunes ont éclos et ceux dont des jeunes n'ont pas éclos ainsi que les jeunes vers de terre vivants.

On porte à l'étuve des coupelles distinctes, chacune renfermant le groupe de jeunes survivants retrouvés dans chaque enceinte expérimentale, et on en fait sécher le contenu à 90 °C, jusqu'à l'obtention d'un poids constant (ce qui, habituellement prend au moins 48 h) [Aquaterra Environmental et ESG, 2000]. Au sortir de l'étuve, on porte sans délai les coupelles au dessiccateur. Après refroidissement, on devrait retirer chaque coupelle

64. Le Dr Kees van Gestel (Institut des sciences écologiques, Amsterdam) a recommandé l'emploi de la chaleur pour améliorer l'efficacité du recouvrement des jeunes vers de terre dans les enceintes expérimentales à la fin de l'essai d'une durée de 8 semaines. La chaleur chasse les survivants vers la couche fraîche de sol au-dessus du niveau du bain, ce qui a l'avantage de faciliter et d'accélérer leur recouvrement dans une tranche de sol sensiblement réduite par rapport au contenu total de l'enceinte (~ 350 mL). Stantec et Aquaterra Environmental (2004) ont constaté que, par ce moyen, on avait comprimé de 30-40 minutes à 15-20 minutes à peine le temps de fouille nécessaire pour retrouver les vers survivants dans chaque enceinte. Le taux de recouvrement des vers était typiquement de 100 %, et, dans tous les cas, on retrouvait au moins 94 % des survivants par l'extraction thermique (Stantec et Aquaterra Environmental, 2004).

65. Si on craint les erreurs de pesée à cause des dépôts (de cire, par ex.) dans les coupelles, on devrait sécher ces dernières à l'étuve, pendant 48 h, jusqu'à l'obtention d'un poids constant (EC, 1997a, b, 2001).

66. Les cocons dont des jeunes ont éclos sont vides et translucides. Ils s'affaissent ou se déforment facilement sous la pression, faible, d'une pince. Au contraire, les cocons dont les jeunes ne sont pas éclos sont habituellement rigides, opaques, et leur couverture extérieure ne cède pas facilement sous la faible pression de la pince, bien qu'ils s'ouvrent soudainement si on augmente cette pression.

individuellement et au hasard du dessiccateur et la peser immédiatement [67] à 0,1 mg près, sur une balance capable de mesures exactes à cette limite. Pour chaque groupe, on calcule le poids sec moyen d'un jeune ver survivant (§ 4.3.7).

Pendant la série de pesées des cadavres secs des groupes de jeunes vers survivants de l'essai, on devrait retourner au dessiccateur la première coupelle ayant été pesée (et son contenu) et on devrait la peser de nouveau à la fin de la série de pesées. On vérifie ainsi le gain ultérieur d'eau par les coupelles dans le dessiccateur, pendant les pesées, ce qui peut se produire lorsque l'on retire chaque coupelle afin de la peser. Le gain de poids de la première coupelle pendant cette période ne devrait pas excéder 5 % ; s'il excède ce taux, on devrait remettre à sécher toutes les coupelles pendant au moins deux heures et les peser de nouveau.

Après avoir recouvré les jeunes vers de chaque enceinte expérimentale, on devrait prélever des sous-échantillons de chaque sol à l'étude (y compris du *sol témoin négatif* et, le cas échéant, du *sol de référence*) pour en déterminer le pH et l'humidité (§ 4.3.5). On devrait également doser à ce moment les autres constituants chimiques (c'est-à-dire les contaminants), à l'aide de sous-échantillons représentatifs de chaque sol à l'étude (§ 4.3.5).

4.3.7 Effets mesurés (paramètres) et calculs

Pour chaque essai, il faut calculer et signaler le taux moyen de survie (± σ) dans tous les groupes (répétitions) de vers adultes (n = 10) exposés à chaque variante expérimentale pendant 28 jours. Dans un essai à concentration unique (v. § 5.3 et 6.2), on compare le taux moyen (± σ) de survie des adultes au jour 28, déterminé pour chaque variante, au taux de survie des vers dans l'échantillon ou les échantillons de *sol de référence* ou, au besoin, à celui des vers dans le *sol témoin négatif*. Dans un essai à plusieurs concentrations (v. § 5.3 et 6.2), on doit calculer et signaler la CL 50 après 28 j pour les vers adultes si on possède suffisamment de données à cette fin. Environnement Canada (2004b) donne des conseils sur le calcul des CL 50, qu'il faudrait suivre ; le § 6.4.1 donne d'autres conseils à cet égard.

Le taux de reproduction mesuré par cet essai se fonde sur le nombre de jeunes survivants ayant éclos dans chaque répétition et dans chaque variante expérimentale pendant les 56 jours de l'essai. Une réduction sensible de ce nombre est considérée comme le signe d'un effet toxique de la variante sur le succès reproducteur des vers adultes. Dans un essai à concentration unique (v. § 5.3 et 6.2), on détermine le nombre moyen (± σ) de jeunes survivants dans le sol à l'étude au jour 56 et on le compare au nombre correspondant dans l'échantillon ou les échantillons de *sol de référence* ou, au besoin, dans le *sol témoin négatif*. Pour cette comparaison, on devrait appliquer le *test t de Student* ou un autre test statistique approprié (EC, 2004b). Dans un essai à plusieurs concentrations (v. § 5.3 et 6.2), il faut calculer et signaler (si les données le permettent) [68] la *CI p* inhibitrice de la reproduction à 56 jours. Environnement Canada (2004b) donne des conseils et des orientations pour le calcul des CI p, qu'il faudrait suivre ; le § 6.4.2 (y compris l'annexe J) donne d'autres conseils à cet égard. Au début, il faut appliquer des techniques de régression (v. § 6.4.2.1) aux données relatives à plusieurs concentrations devant servir au calcul d'une CI p [69]. Si les

67. Les cadavres séchés peuvent absorber facilement la vapeur d'eau, de sorte que l'on devrait les peser rapidement et normaliser la durée de pesée des coupelles.

68. Par le passé, les chercheurs ont souvent analysé les données quantitatives sur les effets sublétaux à partir des résultats d'essais à plusieurs concentrations, en calculant la concentration sans effet observé (CSEO) et la concentration minimale produisant un effet observé (CMEO). Ces effets statistiques mesurés possèdent plusieurs inconvénients, notamment celui de dépendre des concentrations choisies pour l'essai et de ne pas pouvoir donner une indication de la précision (c'est-à-dire d'interdire le calcul des limites de confiance à 95 % ou d'autres limites de confiance) [NERI, 1993; EC, 2004b]. Compte tenu de ces inconvénients, la CI p est l'effet statistique mesuré qu'il faut calculer relativement aux données sur la reproduction et la croissance obtenues grâce à un essai à plusieurs concentrations employant *E. andrei*.

69. La régression est la méthode de choix pour l'estimation de la CI p. Elle comporte le filtrage mathématique des données en fonction d'un modèle choisi, puis le calcul du paramètre statistique au moyen du modèle qui décrit le mieux la relation entre la concentration d'exposition et la réaction (réponse). À l'origine, Stephenson *et al.* (2000b) ont recommandé des techniques de régression non linéaire pour plusieurs raisons, notamment : la relation existant entre la concentration d'exposition et la réaction des vers de terre (croissance ou reproduction) est typiquement non linéaire ; l'hétéroscédasticité des données ne peut pas être réduite par transformation ; la technique de simulation bootstrap, plus standard, souffre de plusieurs limitations à l'égard de ces types de données ; la régression linéaire peut réussir à bien représenter les distributions d'effets présentant un phénomène d'hormèse. En utilisant des techniques mathématiques standard, on peut réussir à bien décrire une régression selon

les données devaient ne pas permettre pas à elles seules le calcul de la CI p après 56 jours de l'inhibition de la reproduction grâce à la régression appropriée (v. annexe J), on devrait tenter, à cette fin, l'interpolation linéaire de ces données à l'aide du programme ICPIN (v. § 6.4.2.2).

La *croissance* — effet mesuré par l'essai — se fonde sur le poids sec moyen de chaque jeune ver né dans chaque variante de l'expérience et ayant survécu à la période d'essai de 56 jours. Une réduction significative de ce poids est considérée comme le signe d'un effet toxique de la variante sur la croissance des jeunes survivants nés des vers (adultes) utilisés au début de l'essai. Pour un essai à concentration unique (v. § 5.3 et 6.2), on détermine le poids sec moyen (± σ) de chaque ver survivant dans le sol à l'étude au jour 56 et on le compare à celui des vers de l'échantillon ou des échantillons de *sol de référence* ou, au besoin, à celui des vers du *sol témoin négatif*. Pour cette comparaison, on devrait utiliser le *test t de Student* ou un autre test statistique approprié (EC, 2004b). Pour un essai à plusieurs concentrations (v. § 5.3 et 6.2), il faut calculer et signaler (si les données le permettent)[68] la CI p après 56 jours pour l'inhibition de la croissance (c'est-à-dire un poids sec moyen moindre chez les jeunes vers). On peut appliquer les conseils et les orientations données dans le § 6.4.2 pour le calcul des CI p et on devrait les suivre. À cet égard, l'approche décrite dans l'alinéa précédent pour le calcul de la CI p après 56 jours de l'inhibition de la reproduction s'applique ici aussi, lorsque l'on calcule une CI p après 56 jours de l'inhibition de la croissance.

4.3.8 Essais employant un toxique de référence

L'utilisation régulière d'un toxique de référence est nécessaire pour évaluer, dans des conditions expérimentales normalisées, la sensibilité relative d'une partie de la population de vers de terre adultes d'un élevage particulier (§ 2.3.9) ou d'une enceinte particulière d'acclimatation (§ 2.4.9) où on choisit des organismes pour un essai permettant de mesurer les effets de l'exposition prolongée de ces organismes (vers de terre) sur leur survie, leur reproduction et leur croissance. Les essais employant un toxique de référence servent également à démontrer la *précision* et la fiabilité des données produites par le personnel de laboratoire sur ce toxique de référence, dans des conditions expérimentales normalisées.

Au début de chaque essai d'une durée de 56 jours visant à mesurer les effets d'un sol effectivement ou potentiellement contaminé sur la survie, la reproduction et la croissance de vers de terre, il faut entreprendre un essai de létalité aiguë d'une durée de 7 jours employant un toxique de référence et exécuté conformément aux conditions et aux modes opératoires décrits dans le § 4.1.8 (et résumés dans le tableau 5). Cet essai de toxicité de référence doit employer des *E. andrei* adultes, prélevés dans la même population que celle avec laquelle on a réalisé l'essai d'une durée de 56 jours (v. § 2.3.9 et 2.4.9). Le toxique de référence recommandé pour cet essai d'une durée de 7 jours est l'acide borique (v. § 4.1.8).

Outre des essais de létalité aiguë employant un toxique de référence, on recommande au laboratoire effectuant des essais d'une durée de 8 semaines avec des échantillons de sol contaminé (prélevés sur le terrain ou additionnés d'une substance) qu'il réalise un ou plusieurs essais de même durée sur son ou ses élevages d'*E. andrei* avec un toxique de référence. Conformément aux conseils donnés dans le document de l'OCDE (OECD, 2000), ces essais devraient être effectués soit deux fois par année, au moins, ou, lorsque les essais de 8 semaines sur un sol contaminé sont moins fréquents, parallèlement avec chaque essai définitif de toxicité d'un sol. Les conditions et modes opératoires à appliquer à ces essais de toxicité de référence devraient être conformes à ceux qui sont décrits dans le § 4.3 du présent document. On devrait comparer toute donnée relative à un effet mesuré (c'est-à-dire la CI p et/ou la CL 50 après 28 j ; v. § 4.3.7) aux valeurs obtenues antérieurement par ce laboratoire sur le toxique de référence. Ces essais et cette comparaison permettent d'obtenir l'assurance que les conditions expérimentales et les modes opératoires du laboratoire, dans l'exécution d'un essai de 8 semaines sont convenables et de vérifier que la réaction, après 8 semaines, des vers au toxique de référence n'a pas sensiblement changé par rapport à leur réaction à des essais effectués antérieurement avec cette substance dans le laboratoire. L'acide borique additionné à un sol artificiel est le toxique recommandé de référence pour cet essai de 8 semaines[70, 71].

---

des termes utilement informatifs pour des tiers, on peut prédire des effets à de fortes et à de faibles concentrations et on peut estimer des intervalles de confiance. On peut en grande partie remédier aux lacunes de la méthode de lissage et d'interpolation (EC, 2004b).

70. Un certain nombre d'essais de toxicité de référence d'une durée de 8 semaines (ou, parfois, de 9 semaines) effectués par Stantec et Aquaterra Environmental (2004) avec de l'acide borique, conformément à la méthode d'essai biologique décrite dans le § 4.3 du présent document ont abouti à des

constatations similaires pour *E. andrei.* Dans deux essais employant des vers de terre adultes d'élevages asynchrones ou synchrones, les CL 50 après 35 jours pour ces vers étaient de 2 706 ou de 3 207 mg d'acide borique par kilogramme sec de sol artificiel, respectivement (Stantec et Aquaterra Environmental, 2004). Les données relatives au nombre de vers vivants de deuxième génération, nés pendant ces essais et deux essais supplémentaires, effectués avec des vers d'élevages asynchrones ou synchrones conformément au § 4.3, ont permis de calculer des CI 50 variant de 270 à 568 mg d'acide borique par kilogramme sec de sol artificiel et des CI 20 variant de 163 à 425 mg/kg. Les données sur le poids sec de la progéniture survivante, engendrée pendant ces quatre essais, ont permis de calculer des CI 50 variant de 147 à 948 mg d'acide borique par kg sec et des CI 20 variant de 23 à 414 mg/kg. Les résultats d'essais parallèles effectués avec des vers d'élevages asynchrones ou synchrones ont montré que les écarts entre les paramètres statistiques respectifs étaient, dans chaque cas, petits et que les limites de confiance à 95 % se superposaient (Stantec et Aquaterra Environmental, 2004). Stantec et Aquaterra Environmental (2004) ont employé les concentrations suivantes d'acide borique pour en calculer les effets sublétaux et létaux par des essais d'exposition prolongée à ce toxique de référence : 0, 7, 14, 28, 56, 113, 225, 450, 900, 1 800 et 3 600 mg/kg sec de sol. On recommande un intervalle élargi (fondé sur une série logarithmique de concentrations ; v. annexe I) qui comprend une ou deux fortes concentrations pour les essais qui, à l'avenir, viseront à calculer les effets létaux et sublétaux. Pour les essais limités aux effets sublétaux, les concentrations suivantes d'acide borique se sont révélées convenables pour le calcul des CI 50 et des CI 20 agissant sur les effectifs de la progéniture vivante et son poids sec à la fin de l'essai : 0, 10, 16, 30, 50, 100, 300, 560 et 1 000 mg/kg de sol (Stantec et Aquaterra Environmental, 2004).

71. Le § 6.2, sur la préparation de mélanges pour les essais, comprend un exemple montrant les quantités d'eau désionisée ou distillée et d'acide borique à ajouter à un sol artificiel sec pour préparer une variante de titre donné en acide borique qui servira dans un essai de toxicité de référence. Les calculs exposés dans cet exemple montrent les quantités d'eau nécessaire pour ajuster l'humidité du sol artificiel selon un taux fixe (c'est-à-dire 70 %) de la capacité de rétention en eau du sol, tout en tenant compte du volume de la solution mère d'acide borique pour ajuster globalement le taux d'humidité du sol.

Modes opératoires particuliers pour l'essai de toxicité d'un sol prélevé sur le terrain ou d'une matière particulaire semblable

La présente section renferme des instructions précises pour la préparation et l'essai d'échantillons de sol (d'un emplacement à l'étude) prélevés sur le terrain ou d'une matière particulaire semblable. Ces instructions s'ajoutent aux modes opératoires exposés dans la section 4.

Un certain nombre de publications consacrées à ces sujets renferment des conseils détaillés sur le prélèvement, la manutention, le transport, l'entreposage et les méthodes d'analyse du sol prélevé sur le terrain (par ex. van Ee *et al.*, 1990 ; Webster et Oliver, 1990 ; USEPA, 1991 ; Keith, 1992 ; Klute, 1986 ; Carter, 1993 ; OMAFRA, 1999). Faute de conseils propres à ces questions dans les publications d'Environnement Canada, on devrait consulter ces publications et s'y conformer (en sus des conseils donnés dans le présent document), pour le prélèvement d'échantillons de sol sur le terrain et leur préparation en vue d'essais de toxicité employant des vers de terre, conformément à l'une des méthodes d'essai biologique décrites dans la présente publication.

5.1 Prélèvement des échantillons

Crépin et Johnson (1993) résument de façon utile le plan de prélèvement d'échantillons sur le terrain et les techniques convenables à cette fin. Les études de la toxicité des sols effectuées sur le terrain à l'aide d'essais biologiques employant des vers de terre ou d'autres organismes convenables, inféodés aux sols (par ex. EC, 2004d, e) font souvent partie d'études plus exhaustives (par ex. Callahan *et al.*, 1991 ; van Gestel, 1992 ; Heimbach, 1993 ; Holmstrup, 2000 ; Saterbak *et al.*, 2000 ; van Gestel *et al.*, 2001). Ces études pourraient comprendre une *batterie d'essais de toxicité* visant à évaluer la toxicité du sol, de même que des essais sur la bioaccumulation des contaminants, des analyses chimiques, des relevés biochimiques des organismes de l'épifaune ou de l'endofaune et, peut-être, le recueil de données géologiques et hydrographiques. On peut améliorer la corrélation statistique et comprimer les coûts si on prélève les échantillons conjointement pour tous ces essais, analyses et acquisitions de données.

Les échantillons de sol à utiliser dans une ou plusieurs des trois méthodes d'essai biologique décrites dans le présent document (section 4) pourraient être prélevés à un rythme trimestriel, semestriel ou annuel, dans un certain nombre de lieux effectivement ou potentiellement contaminés, pour les besoins de la *surveillance* et de l'assurance du *respect des règlements*. On pourrait également prélever des échantillons de sols en une ou plusieurs occasions pendant des études sur le terrain d'emplacements pour y définir la qualité des sols à l'échelle spatiale (c'est-à-dire horizontale ou verticale) ou temporelle. On pourrait prélever les échantillons en un ou plusieurs emplacements en tant que *sol de référence* (présumé non contaminé) pendant chaque campagne de prélèvement sur le terrain[72].

Dans un emplacement à l'étude, le nombre de stations où on fait des prélèvements et le nombre d'*échantillons réitérés* par station est propre à chaque étude. Il s'agit, dans la plupart des cas, d'un compromis entre les contraintes logistiques, les contraintes pratiques (par ex. de temps et de coûts) et les considérations statistiques. Webster et Oliver (1990), Crépin et Johnson (1993) et l'OMAFRA (1999) donnent des conseils sur le plan d'échantillonnage ; van Ee *et al.* (1990) et l'USEPA (1991) traitent de questions concernant l'assurance et la maîtrise de la qualité.

Pour les besoins de certaines opérations de surveillance ou à des fins réglementaires, on devrait prélever des échantillons réitérés (c'est-à-dire des échantillons séparés, prélevés sur le même emplacement, mais constitués de

72. Idéalement, on prélève le *sol de référence* à proximité du ou des emplacements auxquels on s'intéresse. Ce sol possède des caractéristiques géochimiques (par ex. texture, teneur en COT, en matière organique, pH) semblables à celles du ou des sols à l'étude, que l'on prélève sur le terrain, mais sans contaminant d'origine anthropique. Il n'est pas inhabituel, pour des emplacements de référence proches, d'être contaminés à un certain point par des substances d'origine anthropique et, parfois, le sol de référence pourrait être toxique ou par ailleurs inacceptable pour un essai de toxicité d'un sol, en raison de propriétés physicochimiques ou biologiques naturelles.

carottes ou du contenu de bennes différentes) dans chaque *station d'échantillonnage*, y compris dans une ou plusieurs stations de référence [73]. Chacun de ces échantillons réitérés devrait subir un essai de toxicité pour les vers de terre, dans au moins 5 enceintes expérimentales par échantillon réitéré, si on effectue un essai de létalité aiguë (§ 4.1) ou un essai de réaction aiguë d'évitement (§ 4.2) et au moins 10 enceintes par échantillon réitéré, si l'on effectue un essai d'une durée de 8 semaines pour mesurer les effets d'une exposition prolongée (§ 4.3). L'application du calcul de la puissance (v. § 5.5.2) aux données relatives à l'effet mesuré (paramètres de mesure) sur des sols provenant du même emplacement ou d'emplacements semblables aidera à déterminer la nécessité d'appliquer des essais à des échantillons supplémentaires subdivisés en laboratoire de chaque prélèvement réitéré sur le terrain. En outre, certains tests statistiques nécessitent un nombre minimal de répétitions. À certaines autres fins (par ex. études préliminaires ou études approfondies de la répartition spatiale de la toxicité), le plan de l'étude pourrait englober un seul échantillon de chaque station, auquel cas on l'homogénéiserait normalement et on le répartirait entre 5 à 10 enceintes expérimentales identiques (répétitions). Cette approche empêche toute détermination de la toxicité moyenne dans une station donnée d'échantillonnage et empêche tout à fait toute conclusion selon laquelle la station diffère de la station témoin ou de la station de référence ou de tout autre endroit. Cependant, elle permet la comparaison statistique de la toxicité de cet échantillon particulier à celle de l'échantillon de référence ou de l'échantillon témoin ou d'un ou de plusieurs échantillons d'autres endroits. Il importe de réaliser que l'on ne peut extrapoler aucune conclusion sur les différences issues de l'essai d'échantillons uniques prélevés sur le terrain, sans réitération, pour formuler une ou des conclusions sur les stations d'échantillonnage.

On devrait chercher pour le prélèvement d'un *sol de référence* des emplacements où les propriétés géochimiques du sol sont semblables à celles du sol des emplacements à l'étude. Il pourrait ne pas être justifié de faire correspondre la teneur en COT (%) ou la teneur en matière organique (%) dans les cas où la *pollution* (par ex. dans les boues résiduaires ou industrielles ou due à ces boues) explique la teneur élevée en carbone organique et en matière organique dans les sols à l'étude. Des études préliminaires visant à évaluer la toxicité et les propriétés géochimiques du sol dans la ou les régions auxquelles on s'intéresse et dans des emplacements proches permettent de choisir les emplacements appropriés des stations de prélèvement du sol de référence.

On pourrait prélever des échantillons de boues urbaines ou industrielles (par ex. boues d'épuration, stériles déshydratés ou biosolides d'un clarificateur industriel ou d'un étang de décantation) pour l'évaluation de leur(s) effet(s) toxique(s) pour les vers de terre et pour des analyses géochimiques et le dosage des contaminants. On pourrait également prélever d'autres déchets particulaires dont on envisage l'épandage pour en faire l'évaluation toxicologique et physicochimique.

On peut trouver des publications techniques donnant des conseils sur divers plans et modes opératoires de l'échantillonnage des sols (par ex. Petersen et Calvin, 1986 ; Keith, 1992 ; Crépin et Johnson, 1993). Les méthodes de prélèvement des échantillons (c'est-à-dire par carottier, benne ou prélèvement d'échantillons composites) dépendent des objectifs de l'étude ainsi que de la nature du sol ou des autres matières particulaires que l'on prélève. Pour le prélèvement d'échantillons de sol, on utilise fréquemment une pelle, une tarière ou un carottier (de préférence en acier inoxydable) [ASTM, 1999b].

La surface de l'endroit où chaque échantillon doit être prélevé devrait être débarrassée de tout débris, brindilles, feuilles, pierres, chaume et litière. Si l'endroit se trouve dans un endroit herbeux ou occupé par d'autres végétaux, on devrait raser cette végétation et en l'en débarrasser avant de prélever l'échantillon. L'arrachage devrait entraîner le moins possible de particules de sol avec les racines. On devrait arracher les chevelus racinaires denses (par ex. de graminées) puis les secouer vigoureusement pour en détacher les particules de sol. Les échantillons de sol à prélever pour l'évaluation de la toxicité et des propriétés chimiques devraient provenir d'une ou de plusieurs profondeurs qui représentent l'horizon ou les horizons auxquels on s'intéresse (par ex. l'horizon superficiel ou un ou plusieurs horizons plus profonds du sol ou du sous-sol si on s'intéresse à l'historique du dépôt des contaminants).

On devrait calculer, avant d'entreprendre le programme d'échantillonnage, le volume nécessaire de sol par

73. L'ASTM (1999b) recommande, comme minimum, le prélèvement, dans chaque station d'échantillonnage, et l'essai de trois échantillons réitérés.

échantillon. Ce calcul devrait tenir compte de la quantité de sol nécessaire à la préparation d'échantillons subdivisés en laboratoire pour les essais de toxicité du sol ainsi que des échantillons nécessaires à la caractérisation granulométrique, au dosage du COT (%), au dosage de la matière organique (%), à la détermination de l'humidité et à des analyses chimiques particulières. On a normalement besoin de 5 à 7 L de sol par échantillon, bien que ce volume dépende des objectifs et du plan de l'étude (par ex. essai à concentration unique ou à plusieurs concentrations) ainsi de le la nature des analyses chimiques à effectuer et, peut-être, de la nature du sol (par ex. nécessité d'éliminer l'excès d'eau et/ou les débris au laboratoire, ce qui risque de réduire le volume de l'échantillon). Pour obtenir le volume nécessaire, il faut souvent combiner des sous-échantillons prélevés par le dispositif d'échantillonnage. On devrait utiliser dans tous les emplacements échantillonnés sur le terrain la même méthode de prélèvement.

5.2 Étiquetage, transport, entreposage et analyse des échantillons

Les récipients servant au transport et à l'entreposage des échantillons de sol prélevés sur le terrain ou de matières particulaires semblables doivent être d'un matériau non toxique. Le choix du récipient dépend du volume de l'échantillon et de ses éventuelles utilisations finales. Les récipients doivent être soit neufs, soit nettoyés à fond, soit chemisés de plastique de qualité. On utilise couramment des sacs de plastique épais (par ex. 4 mils) pour le transport et l'entreposage des échantillons (ASTM, 1999b). Si on utilise des sacs de plastique, il est recommandé de placer chacun d'eux dans un second récipient propre, opaque (par ex. une glacière ou un seau de plastique muni d'un couvercle) pour prévenir les déchirures, soutenir la masse de l'échantillon et le maintenir à l'obscurité pendant son transport.

Après avoir déposé l'échantillon dans le récipient, on devrait réduire au minimum l'espace libre (par ex. en expulsant l'air du sac de plastique partiellement rempli en pressant sur le sac, puis en le fermant avec du ruban adhésif). Immédiatement après le remplissage, il faut sceller, étiqueter ou coder chaque récipient. L'étiquetage et les enregistrements connexes qu'on effectue alors doivent comprendre au moins un code ou une description identifiant le type d'échantillon (par ex. prélevé par benne, par carottier ou composite), sa source, l'endroit précis du prélèvement, le mode d'occupation ou d'utilisation du terrain, le numéro de réitération, la date du prélèvement ; ces données devraient comprendre le nom et la signature du ou des préleveurs. Les préleveurs de sol devraient également tenir des dossiers décrivant dans le détail ce qui suit :

- la nature, l'apparence et le volume de chaque échantillon ;
- le mode opératoire et l'appareillage utilisés pour le prélèvement ;
- tout mode opératoire utilisé pour obtenir des échantillons composites ou des sous-échantillons d'échantillons prélevés par carottier ou par benne sur le terrain ;
- le nombre d'échantillons réitérés prélevés dans chaque station d'échantillonnage ;
- le programme d'échantillonnage ;
- les types et le nombre de récipients utilisés pour le transport des échantillons ;
- toute mesure effectuée sur le terrain (par ex. température, pH, humidité du sol), sur les lieux du prélèvement ;
- les modes opératoires du refroidissement et du transport des échantillons et les conditions dans lesquelles ces opérations ont eu lieu ;
- les observations des conditions existant dans l'environnement, au moment du prélèvement (par ex. pluie) ;
- les observations de la faune du sol et de la végétation sur les lieux du prélèvement.

Les échantillons de sol ne devraient pas geler ni surchauffer pendant le transport ou l'entreposage. Il est recommandé de les conserver à l'obscurité (c'est-à-dire de les garder dans des récipients de transfert opaques tels que des glacières ou des seaux de plastiques munis d'un couvercle) pendant le transport, particulièrement s'ils peuvent renfermer des HAP ou d'autres substances ou produits chimiques susceptibles de photoactivation ou, par ailleurs, risquant d'être altérés par une exposition à la lumière du jour. Au besoin, on devrait utiliser des blocs ou sachets réfrigérants, de la glace ordinaire ou d'autres moyens assurant la réfrigération des échantillons (par ex. 7 ± 3 °C) durant le transport.

Il faut consigner la date de réception de l'échantillon au laboratoire ainsi que sa température à la réception. Il faut garder dans des récipients hermétiques les échantillons à conserver pour usage ultérieur. Si le sol renferme des contaminants volatils ou si on s'intéresse particulièrement

à ces derniers, on devrait purger tout l'air se trouvant dans l'espace libre du récipient avec de l'azote, avant de fermer hermétiquement ce récipient. Il ne faut pas que les échantillons gèlent, même partiellement, pendant le transport ou l'entreposage (à moins d'avoir déjà été congelés au moment du prélèvement), et on ne doit pas les laisser se déshydrater. Si, cependant, un ou plusieurs échantillons sont saturés d'eau excédentaire à leur arrivée au laboratoire (par ex. ils ont été prélevés pendant une grosse pluie), on peut les déposer sur une feuille de plastique, pendant une courte période (par ex. une ou plusieurs heures) pour laisser s'écouler ou s'évaporer l'eau excédentaire. Ensuite, on devrait remettre l'échantillon dans son récipient de transport ou le transvaser dans un récipient plus hermétique, en vue de l'entreposage.

Il est recommandé d'entreposer les échantillons à l'obscurité, à 4 ± 2 °C. Il faut appliquer ces conditions d'entreposage dans les cas où des HAP ou d'autres contaminants sensibles à la lumière seraient présents ou si on sait que les échantillons renferment des substances volatiles instables auxquelles on s'intéresse. On recommande également de soumettre à l'essai les échantillons de sol ou de matière particulaire semblable le plus tôt possible après le prélèvement. On devrait entreprendre l'essai ou les essais de toxicité dans les deux semaines suivant le prélèvement et, de préférence, dans la semaine qui suit. L'essai doit débuter dans les six semaines, à moins que l'on sache que les contaminants du sol sont altérés ou ont un certain âge et sont, par conséquent, considérés comme stables.

Il est souhaitable de tamiser à sec (c'est-à-dire par pression mais non par voie hydraulique) les échantillons au travers d'un tamis à mailles larges, pour en éliminer les grosses particules (v. § 5.3). Cette étape peut se faire sur le terrain. Les matières grossières indésirables (par ex. les gros graviers ou les grosses pierres, les gros débris, les invertébrés indigènes ou les matières végétales macroscopiques) peuvent également être éliminées sur le terrain avant le transport de l'échantillon. Au laboratoire, on devrait mélanger à fond chaque échantillon de sol prélevé sur le terrain (§ 5.3) et y prélever des sous-échantillons représentatifs pour la caractérisation physicochimique. Chaque échantillon (y compris tous les échantillons de *sol témoin négatif* et de *sol de référence*) doit être caractérisé par l'analyse, sur des sous-échantillons, des caractéristiques suivantes au moins :

- la répartition granulométrique (% de sables, de limons et d'argiles) ;
- la teneur en COT (%) ;
- la teneur en matière organique (%) ;
- l'humidité (%) ;
- la capacité de rétention en eau (%, par rapport au poids sec de sol) ;
- le pH ;
- la conductivité.

En outre, on devrait analyser :

- la texture ;
- la capacité d'échange cationique ;
- les principaux cations ;
- les insecticides organophosphorés ;
- les insecticides organochlorés.

On pourrait également analyser :

- la densité apparente ;
- la fertilité ;
- le rapport C/N ;
- le carbone inorganique total ;
- les matières volatiles totales ;
- la demande biochimique d'oxygène ;
- la demande chimique d'oxygène ;
- le potentiel d'oxydoréduction ;
- l'azote total ;
- le phosphore total ;
- les métaux ;
- les hydrocarbures pétroliers (y compris les HAP) ;
- un série d'herbicides.

Sauf indication contraire, les analyses physicochimiques et toxicologiques identiques devraient être effectuées sur des sous-échantillons représentatifs de chaque échantillon réitéré de sol prélevé sur le terrain (y compris de *sol de référence*) pour une étude particulière de la qualité du sol, ainsi que sur un ou plusieurs sous-échantillons de *sol témoin négatif.*

5.3 Préparation de l'échantillon en vue de l'essai

Il ne faut pas tamiser par voie hydraulique le sol prélevé sur le terrain ou les déchets particulaires semblables, ce qui entraînerait les contaminants présents dans l'eau interstitielle ou lâchement fixés par sorption à la matière particulaire. On devrait normalement débarrasser l'échantillon des gros graviers ou des grosses pierres, des débris, des invertébrés indigènes ou de la matière végétale

macroscopique, à l'aide de pincettes ou à la main (gantée). Si un échantillon renferme beaucoup de débris (par ex. matière végétale, copeaux de bois, verre, plastique, gros graviers) ou de gros invertébrés macroscopiques, on peut l'en débarrasser par tamisage sous pression au travers d'un tamis à mailles larges (par ex. d'environ 6 mm de côté ; ASTM, 1999b).

On devrait rédiger et consigner au laboratoire d'essais une description qualitative de chaque échantillon de sol à l'étude, prélevé sur le terrain, y compris des renseignements sur sa couleur, sa texture ainsi que la présence et la description des racines, des feuilles et des organismes macroscopiques terricoles. Sauf si les objectifs particuliers de l'étude ou de la recherche en décident autrement, on devrait homogénéiser, au laboratoire, avant de l'utiliser, chaque échantillon de matière à l'étude, prélevé sur le terrain (USEPA, 1989 ; ASTM, 1999b) [74]. Le mélange risque de modifier la concentration et la biodisponibilité des contaminants dans le sol, et l'homogénéisation de l'échantillon pourrait ne pas être souhaitable dans tous les cas ni à toutes les fins.

Comme il est mentionné dans le § 3.5, on pourrait soumettre à un essai à concentration unique (typiquement à la concentration de 100 %) un ou plusieurs échantillons de sol prélevés sur le terrain ou en évaluer la toxicité dans un essai à plusieurs concentrations, en vertu duquel on prépare une série de concentrations (dilutions) par mélange de quantités mesurées de sol dans un sol témoin négatif ou dans un sol de référence. Dans l'essai à plusieurs concentrations, la série suivante de dilutions (8) pourrait se révéler utile (dans la gamme de 100 à 1 %) : 100, 80, 50, 30, 15, 7,5, 3, 1 % plus 0 %. Dans le § 6.2, on trouve des conseils sur d'autres séries de dilutions qui pourraient se révéler aussi utiles sinon plus, de même que des conseils sur la préparation de mélanges qui pourraient s'appliquer également à un essai à plusieurs concentrations portant sur un ou plusieurs échantillons de sol prélevés sur le terrain. Pour obtenir des conseils supplémentaires sur le choix des concentrations d'essai, prière de consulter les observations se trouvant au début de la section 4. Dans chaque cas, l'essai doit comprendre une variante expérimentale constituée uniquement de sol témoin négatif (v. § 3.2).

Pour obtenir un échantillon homogène, transférer ce dernier dans le bol propre et rigide d'un mélangeur (par ex. un gros bol d'acier inoxydable ou de plastique). On devrait mélanger l'échantillon à la main (gantée) ou au moyen d'un outil fait d'un matériau non toxique, tel qu'une cuiller d'acier inoxydable ou par des moyens mécaniques (par ex. un mélangeur à main domestique à batteurs tournant à faible vitesse ou un fouet à œufs à fil) jusqu'à obtention d'une texture et d'une couleur homogènes. Pendant le mélange, on devrait veiller à ce que le mélange ne détruise pas entièrement la structure du sol. On devrait s'arrêter dès que la texture et la couleur de l'échantillon semblent homogènes.

Pour chaque échantillon à étudier, les conditions de mélange, y compris sa durée et sa température, doivent être aussi semblables que possible. Si on s'interroge sur l'efficacité du mélange de l'échantillon, on devrait prélever des sous-échantillon du sol après mélange et les analyser séparément pour déterminer l'homogénéité de la granulométrie, celle de la ou des substances auxquelles on s'intéresse, etc. L'eau qui se sépare de l'échantillon pendant le transport ou l'entreposage doit y être incorporée de nouveau.

La structure du sol est un important facteur de la survie, de la reproduction et de la croissance des vers de terre, et l'humidité influe beaucoup sur elle. Un mode opératoire qualitatif, dit officieusement « *essai d'expression de l'humidité* » permet de déterminer si l'échantillon de sol se trouve à une humidité optimale. Il pourrait se révéler utile pour ajuster humidité de chaque échantillon de sol à un pourcentage particulier de sa capacité de rétention en eau (v. les alinéas qui suivent) en vue d'un essai de toxicité. On peut également l'effectuer pendant un essai de toxicité (v. § 4.1.5 et 4.3.5) [75]. Pour effectuer cet essai, on prélève un petit sous-échantillon représentatif du sol (par ex. une pincée), au hasard, à la main gantée et on le comprime légèrement entre le pouce et l'index. Si le sol

74. L'homogénéisation systématique vise notamment à mélanger au sol toute eau de porosité remontant à la surface de l'échantillon pendant le transport et l'entreposage. Elle est également indispensable pour redistribuer les constituants qui se sont tassés et stratifiés par granoclassement pendant le transport et l'entreposage.

75. On peut appliquer l'essai d'expression de l'humidité pendant l'essai de létalité d'une durée de 14 jours employant des vers de terre pour la vérification facultative, à la 7e journée, de la survie, de l'apparence et du comportement de ces vers (v. § 4.1.5). Cette manipulation est également utile aux observations hebdomadaires de l'humidité du sol pendant l'essai d'une durée de 8 ou 9 semaines servant à mesurer les effets d'une exposition prolongée à des échantillons de sol (v. § 4.3.5).

exprime un peu d'eau, c'est que son humidité est acceptable. Si, toutefois, aucune eau n'apparaît, le sol est probablement trop sec. Si, au contraire, le sous-échantillon exprime une quantité notable d'eau, c'est qu'il est probablement trop humide.

L'humidité d'un échantillon donné de sol prélevé sur le terrain devrait être normalisée par détermination de sa *capacité de rétention en eau*, puis hydratation à une humidité optimale fondée sur un pourcentage de cette capacité. Il faut déterminer ce taux optimal pour chaque échantillon de sol prélevé sur le terrain avant la préparation de l'échantillon et le début de l'essai. À cette fin, on doit d'abord déterminer l'humidité de chaque échantillon homogénéisé (c'est-à-dire de chaque échantillon de sol à l'étude, y compris le sol témoin négatif) [§ 4.1.1, 4.1.5, 4.2.1 et 4.3.1]. Ensuite, il faut déterminer la capacité de rétention de chaque échantillon, en employant un mode opératoire normalisé reconnu (v. les trois alinéas qui suivent). On hydrate ensuite un sous-échantillon de chaque échantillon de sol jusqu'à ce que l'on obtienne une consistance homogène, friable, avec des fragments d'environ 3 à 5 mm de diamètre [76]. D'après l'humidité initiale et la capacité de rétention en eau de l'échantillon ainsi que la quantité d'eau ajoutée pour obtenir la consistance recherchée du sol, on peut calculer et exprimer l'humidité optimale de l'échantillon en pourcentage de la capacité de rétention en eau de chaque sol. Une fois ce taux visé (ou optimal) déterminé, on peut normaliser l'humidité de chaque échantillon de sol à l'étude (y compris du sol témoin négatif) au taux choisi (propre à l'échantillon). On devrait ajouter de l'*eau d'essai* (c'est-à-dire désionisée ou distillée) à chaque échantillon dont l'humidité est inférieure au taux optimal prédéterminé de sa capacité de rétention en eau jusqu'à l'obtention de ce taux [77] (Aquaterra Environmental, 1998a). Si un échantillon est trop humide, on devrait l'étendre en couche mince sur une feuille propre de plastique (par ex. un sac neuf à ordures, de plastique) ou sur un plateau d'un matériau propre, non réactif (par ex. d'acier inoxydable ou de plastique) et le laisser sécher par évaporation à la température ambiante (~ 20 °C). La réhydratation au taux optimal prédéterminé de sa capacité de rétention en eau pourrait être nécessaire. Après avoir ajusté l'humidité de l'échantillon au taux voulu de sa capacité de rétention en eau, il faut déterminer l'humidité (%) du sol hydraté et consigner puis signaler la capacité de rétention en eau et le taux d'humidité.

La capacité de rétention en eau d'un sol particulier est généralement propre au type de sol et c'est, au bout du compte, le résultat de l'interaction de nombreuses variables liées à la structure du sol (par ex. micro- et macroagrégation, porosité, densité apparente, texture, teneur en matière organique). Un certain nombre de méthodes peuvent servir à déterminer la capacité de rétention en eau ; cependant, la plupart exigent que les mesures se fassent sur un échantillon intact (par ex. une carotte de sol) dont les caractéristiques (agrégations structurales, porosité, densité apparente, texture et teneur en matière organique) sont préservées pendant le prélèvement. L'USEPA (1989) a décrit une méthode convenant aux essais de toxicité et utilisant des matières non consolidées (telles que des échantillons de sols prélevés sur le terrain, ayant été séchés, tamisés et homogénéisés ou des échantillons de sol préparés au

76. Une étude non publiée d'Environnement Canada (Princz, J., Environnement Canada, DMB, Ottawa, communication personnelle, 2004) a permis de déterminer l'humidité optimale de chacun des divers types de sols utilisés pour l'élaboration de chacune des méthodes d'essai biologique décrites dans la présente publication (v. § 3.2 et annexe H). Cette humidité se fonde sur un pourcentage de la capacité de rétention en eau de chaque échantillon. Le pourcentage optimal de la capacité de rétention de ces sols variait de 45-50 % dans le cas des limons et des loams sableux à 60 % dans celui des loams argileux. Ces valeurs ont été considérées comme optimales, puisque, à ces taux de saturation, le sol se mélangeait bien, possédait une humidité convenable, selon le test d'expression de l'humidité, et possédait une structure acceptable, c'est-à-dire que la « macroagrégation » résultante des particules de sol favorisait la bonne santé des vers. L'expérience révèle que la teneur effective en humidité des sols hydratés jusqu'à l'obtention des conditions optimales peut varier considérablement (par ex. de 20 %, dans les loams sableux, à 50 %, dans les loams argileux), selon la densité apparente et la capacité de rétention en eau des échantillons que l'on soumet à l'essai (ESG et Aquaterra Environmental, 2002 ; Becker-van Slooten *et al.*, 2003).

77. Parfois, certains chercheurs s'y prennent autrement : ils normalisent (et ajustent) l'humidité de chaque échantillon de sol prélevé sur le terrain à un taux fixe, tel que 35-45 % de son poids sec (ASTM, 1999b ; EC, 2000b). L'inconvénient, toutefois, est que certains échantillons de sol prélevés sur le terrain peuvent sembler très humides et posséder de l'eau stagnante à leur surface après hydratation à seulement 35-45 % de leur poids sec ; tandis que les sols d'autres emplacement à l'étude peuvent sembler considérablement plus secs après le même taux d'hydratation (ASTM, 1999b ; EC, 2000b). C'est pourquoi nous ne recommandons pas cette manière de faire.

laboratoire à partir de leurs constituants) [78]. Nous exposons ci-après cette méthode.

Pour cette méthode, on dépose environ 130 g (poids frais) d'échantillon dans un plat d'aluminium ou dans une boîte de Petri (15 × 1 cm) et on le fait sécher à 105 °C jusqu'à l'obtention d'un poids constant (ce qui prend habituellement au moins 24 h). On introduit ensuite 100 g du sol séché à l'étuve dans un becher de verre de 250 mL avec 100 mL d'eau distillée ou désionisée. On mélange à fond la suspension résultante avec une tige de verre. On place dans un entonnoir de verre (grand diamètre intérieur : 100 mm ; hauteur de la tige : 95 mm) un papier filtre plié (de 185 mm de diamètre à porosité grossière Fisherbrand P8, papier filtre crêpé pour analyse qualitative ; n° de cat. 09-790-12G). La bordure du papier filtre plié devrait arriver au ras du rebord de l'entonnoir. À l'aide d'une pipette, verser lentement 9 mL d'eau distillée ou désionisée sur le papier filtre, de façon à en mouiller toute la surface. On pèse ensuite l'entonnoir et le papier filtre hydraté. Pour obtenir la masse initiale de l'entonnoir plus le papier filtre hydraté plus le sol séché(v. *I* dans l'équation 1 ci-après), on ajoute la masse du sol séché (100 g) à la masse de l'entonnoir et du papier filtre mouillé.

On insère ensuite la tige de l'entonnoir dans un erlenmeyer de 500 mL et on verse lentement la suspension aqueuse de sol dans le papier filtre hydraté maintenu dans l'entonnoir. Par rinçage, on entraîne tout le sol restant dans le becher et sur la tige de verre dans l'entonnoir, pour s'assurer de recevoir sur le filtre la totalité des matières solides, mais en usant du minimum d'eau nécessaire. Ensuite, on couvre bien l'entonnoir avec une feuille d'aluminium et on laisse le liquide s'écouler pendant 3 h à la température ambiante. Après ces trois heures, on pèse l'entonnoir, le papier filtre hydraté et le sol humide, c'est-à-dire la masse finale totale de l'entonnoir, du papier filtre hydraté et du sol (humide) [v. *F* de l'équation 1 ci-après].

On calcule ensuite la capacité de rétention en eau du sous-échantillon de sol dans l'entonnoir, en pourcentage du poids sec de sol, à l'aide de l'équation suivante :

$$CRE = \frac{F - 1}{D} \times 100 \qquad \text{(équation 1)}$$

où : CRE = la capacité de rétention en eau (%)
F = la masse totale de l'entonnoir, du papier filtre hydraté et du sol humide
I = la masse totale de l'entonnoir, du papier filtre hydraté et du sol sec
D = 100 g (c'est-à-dire le poids sec de sol)

On devrait déterminer la CRE de chaque échantillon de sol à l'étude en triple, au moyen de trois sous-échantillons.

Le pourcentage d'eau (P_w) ajouté à l'échantillon de sol prélevé sur le terrain afin d'obtenir le degré souhaité d'hydratation (c'est-à-dire le pourcentage optimal de la CRE) peut se calculer comme suit [79] :

78. Des participants à un atelier sur les essais de toxicité des sols parrainé par Environnement Canada et ayant eu lieu à Vancouver (février 2003) ont considéré que la détermination de la capacité de rétention en eau et qu'un pourcentage de cette capacité étaient la façon la plus convenable d'exprimer l'humidité d'un sol (EC, 2004c). Cela a mené à un programme d'essais visant à comparer deux méthodes d'estimation de la capacité de rétention en eau d'un sol (c'est-à-dire conformément à l'annexe C d'ISO [1999] ou à USEPA [1989]) ainsi qu'à une méthode quelque peu différente d'expression de l'humidité du sol, en pourcentage des vides remplis d'eau d'un sol. Les résultats de cette étude ont montré que chaque méthode possédait des avantages et des inconvénients distincts ; cependant, la méthode de l'USEPA (1989) de mesure de la capacité de rétention en eau a été recommandée pour les méthodes d'essai de toxicité des sols d'Environnement Canada lorsque l'on ajuste (au besoin) l'humidité des échantillons de sol (Becker-van Slooten *et al.*, 2004).

79. L'exemple ci-dessous montre les calculs concernant l'hydratation d'échantillons d'un sol contaminé, prélevés sur le terrain et d'un sol témoin négatif, lors de la préparation d'une concentration de 25 % en vue d'un essai de létalité aiguë employant des vers de terre et trois répétitions par variante expérimentale.

Hypothèses :

Premier sol : sol témoin négatif (*tn*)

W_{tn}	=	2,3934 g	P_{Wtn}	=	22,92 %
D_{tn}	=	1,9108 g	M_{Dtn}	=	468,75 g (secs)
CRE_{tn}	=	80,30 %	V_{Wtn}	=	107,44 mL
P_{CREtn}	=	60,00 %	V_{Wtn}	=	107,44 mL
MC_{tn}	=	25,26 %	M_{Wtn}	=	587,14 g (frais)

Second sol : sol contaminé (*c*)

W_c	=	7,0575 g	P_{Wc}	=	1,20 %
D_c	=	5,6174 g	M_{Dc}	=	156,25 g (secs)
CRE_c	=	67,10 %	V_{Wc}	=	1,88 mL
P_{CREc}	=	40,00 %	M_{Wc}	=	196,31 g (frais)
MC_c	=	25,64 %			

$$MC = [(W - D) / D] \times 100 \qquad \text{[équation 1]}$$

P_W = [CRE × (P_{CRE}/100)] – MC [équation 2]
V_W = (P_W × M) / 100 [équation 3]
M_W = (M_D × W) / D

W = poids frais du substrat (g)
D = poids sec du substrat (g)
CRE = capacité de rétention en eau (% du poids sec)
P_{CRE} = pourcentage recherché de la CRE (%)
MC = humidité initiale du substrat (%)
P_W = pourcentage d'eau à ajouter au sol (%)
M_D = masse totale (poids sec) de sol nécessaire à l'expérience
V_W = volume d'eau à ajouter au sol (mL)
M_W = masse totale (poids frais fondé sur l'humidité initiale [MC]) nécessaire à l'expérience

Calculs pour une concentration de 25 % d'un sol contaminé dans un sol témoin négatif

Pour un essai de létalité aiguë employant cet exemple, on pose qu'une masse totale (poids sec) de 625,00 g (poids sec) de sol suffit pour répondre aux besoins de chaque variante expérimentale (c'est-à-dire 200,00 g [poids sec] par répétition × 3 répétitions + 25,00 g (poids sec) de plus de sol pour la détermination du pH, de la conductivité, etc.). Pour simplifier les calculs, on pose, pour les besoins de l'exemple, que 200 g (poids sec) de n'importe quel type de sol suffisent pour constituer l'aliquote de 350 mL de sol à ajouter à chacune des trois enceintes expérimentales (répétitions) par variante expérimentale, dans l'essai de létalité aiguë employant des eisénies (v. § 4.1.1).

Pour une concentration de 25 % de sol contaminé dans un sol témoin négatif, 25 % de la masse totale de sol (poids sec) doit consister en sol contaminé :
= 625,00 g (poids sec) × (25/100)
= 156,25 g (poids sec) de sol contaminé

Le reste des besoins en sol à l'étude pour préparer cette variante expérimentale (c'est-à-dire 75 %) consistera en sol témoin négatif, comme suit :
= 625,00 g (poids sec) × (75/100)
[ou 625,00 g – 156,25 g] (poids sec)
= 468,75 g (poids sec) de sol témoin négatif

En conséquence, la masse totale finale de sol nécessaire (en poids frais) est de 694,58 g [587,14 g de poids frais à la teneur initiale en humidité du sol (c'est-à-dire M_{Wtn}) + 107,44 mL d'eau] pour le sol témoin négatif et 198,19 g [196,31 g de poids frais à la teneur initiale en humidité du sol (c'est-à-dire M_{Wc}) + 1,88 mL d'eau] pour le sol contaminé.

L'humidité finale de chaque sol serait de 48,18 % {[(694,58 – 468,75)/468,75] × 100} dans le cas du sol témoin négatif et de 26,84 % {[(198,19 – 156,25)/156,25] × 100} dans le cas du sol contaminé.

L'humidité finale du sol témoin négatif (c'est-à-dire

$$P_W = [CRE \times (P_{CRE}/100)] - MC \quad \text{(équation 2)}$$

où P_w = le pourcentage d'eau à ajouter au sol (%)
CRE = la capacité de rétention en eau (%)
MC_i = l'humidité initiale du sol.

Le volume d'eau (c'est-à-dire V_w) que l'on devrait ajouter à un échantillon de sol prélevé sur le terrain pour obtenir le degré souhaité d'hydratation (c'est-à-dire le pourcentage optimal de la capacité de rétention en eau de l'échantillon) peut se calculer comme suit [79] :

$$V_W = (P_W \times M)/100 \quad \text{(équation 3)}$$

où : V_w = le volume d'eau à ajouter au sol (mL)
P_W = le pourcentage d'eau à ajouter au sol (%)
M = la masse totale de sol (poids sec) [80] de sol

48,18 %) représente 60 % de la capacité de rétention en eau de ce sol (48,18 ÷ 80,30 = 0,60). L'humidité finale du sol contaminé (c'est-à-dire 26,84 %) représente 40 % de la capacité de rétention en eau de ce sol (26,84 ÷ 67,10 = 0,40).

80. Pour les essais sur des échantillons de sol prélevés sur le terrain, la quantité de sol introduite dans chaque enceinte expérimentale se fonde sur le poids frais de sol équivalant à un volume d'environ 350 mL (v. § 4.1.1, 4.2.1 et 4.3.1). Cependant, *M* (c'est-à-dire la masse totale de sol dont on a besoin pour l'essai) est exprimé comme poids sec dans l'équation du calcul du volume d'eau à ajouter à l'échantillon de sol prélevé sur le terrain pour obtenir le degré souhaité d'hydratation (v. équation 3). Pour calculer la quantité de sol nécessaire par enceinte expérimentale (en poids sec), on introduit un sous-échantillon de sol « humide » dans une enceinte expérimentale (par ex un bocal de verre de 500 mL) afin de déterminer le volume juste de sol nécessaire, par rapport à son poids frais). Par exemple, on pose que (pour un échantillon donné) ce volume équivaut à 270 g (poids humide) et que les poids frais et sec d'un sous-échantillon de ce sol, antérieurement déterminés pour les besoins du calcul de la capacité de rétention en eau de l'échantillon, sont de 4,1507 g et de 2,7813 g, respectivement. Le poids sec équivalant à un volume de 350 mL de cet échantillon de sol (qui possède un poids fraìs de 270 g) peut se calculer comme suit :

$$(270 \text{ g} \times 2{,}7813 \text{ g}) \div 4{,}1507 \text{ g} = 181 \text{ g}$$

On peut arrondir cette masse de sol à 200 g secs, ce qui procure un peu de sol supplémentaire au besoin. En conséquence, dans l'exemple dont il est question ici, la masse de cet échantillon de sol nécessaire dans chaque répétition (exprimée en poids sec) est de 200 g. On peut ensuite calculer la masse totale (*M*) simplement par multiplication de la masse sèche nécessaire à chaque répétition (dans le cas qui nous

nécessaire à l'essai.

Sauf pour les essais de toxicité effectués pour les besoins de la recherche et visant à déterminer l'influence du pH sur la toxicité de l'échantillon, il ne faut pas ajuster le pH des échantillons de sols prélevés sur le terrain. Les études visant à examiner l'effet du pH sur la toxicité de l'échantillon devraient prévoir la réalisation de deux essais en parallèle, en vertu desquels on ajuste le pH d'une ou de plusieurs séries de variantes expérimentales à une valeur fixe au moyen de carbonate de calcium ou d'un acide ou d'une base convenables, tandis que l'on n'ajuste pas le pH d'une ou de plusieurs séries en plusieurs exemplaires de variantes expérimentales.

Immédiatement après l'hydratation de l'échantillon (ou sa déshydratation) et son mélange, on doit prélever des sous-échantillons de la matière à l'étude, dont on a besoin pour l'essai de toxicité et pour les analyses physicochimiques et on doit les déposer dans des enceintes expérimentales étiquetées (v. § 4.1.1, 4.2.1 et 4.3.1) ainsi que dans les récipients étiquetés nécessaires à l'entreposage de sous-échantillons en vue d'analyses physicochimiques ultérieures. Toute fraction subsistant de l'échantillon homogénéisé dont on pourrait avoir besoin pour les essais supplémentaires de toxicité employant des vers de terre ou d'autres organismes (par ex. conformément à EC 2004d,e) devrait alors également être transvasée dans des récipients étiquetés. Tous les sous-échantillons à conserver devraient être gardés dans des récipients étanches renfermant un espace libre le plus petit possible, puis être conservés à l'obscurité à 4 ± 2 °C (§ 5.2) jusqu'au moment de l'emploi ou de l'analyse. Immédiatement avant l'analyse ou l'utilisation dans un essai de toxicité, il faut remélanger à fond chaque sous-échantillon pour en assurer l'homogénéité.

5.4 Observations et mesures pendant l'essai

On devrait, au moment de la préparation de l'essai, rédiger une description qualitative de chaque matière à l'étude, prélevée sur le terrain. Cela pourrait comprendre des observations de la couleur de l'échantillon, de sa texture et de son homogénéité ainsi que des observations sur la présence de végétaux ou d'invertébrés macroscopiques. On devrait consigner tout changement d'apparence de la matière observée pendant l'essai ou à sa fin.

Dans les § 4.1.5, 4.2.5 et 4.3.5, on trouve des conseils et les exigences propres à chaque essai pour les observations et les mesures à faire pendant l'essai ou à la fin. Ces observations et mesures s'appliquent et doivent être faites lorsque l'on effectue n'importe quel essai de toxicité d'un sol décrit dans le présent document, en employant un ou plusieurs échantillons de sol (d'un emplacement à l'étude) prélevé sur le terrain.

Selon les objectifs et le plan d'expérience de l'essai, on pourrait préparer des enceintes expérimentales supplémentaires au début de l'essai (§ 4.1.1, 4.2.1 et 4.3.1) pour surveiller les propriétés chimiques du sol. Ces enceintes seraient l'objet d'un échantillonnage destructif pendant l'essai et à la fin de ce dernier. On pourrait ou on pourrait ne pas introduire d'organises en expérience dans ces enceintes expérimentales supplémentaires, selon les objectifs de l'étude. On peut doser les substances chimiques se trouvant dans le sol de ces enceintes, en prélevant des parties aliquotes du sol pour les analyses appropriées (v. § 5.2).

5.5 Effets mesurés et calculs

Le thème commun de l'interprétation des résultats des essais ayant porté sur un ou plusieurs échantillons de sol prélevés sur le terrain est une comparaison des effets biologiques exercés par le ou les sols (d'un ou de plusieurs emplacements à l'étude) aux effets constatés dans un *sol de référence*. L'échantillon de référence devrait servir à des comparaisons chaque fois que c'est possible ou convenable, parce que cela permet une évaluation locale, de la toxicité, propre à l'emplacement (EC, 1997a, b, 2001). Parfois, le sol de référence pourrait ne pas convenir à la comparaison en raison de sa toxicité ou de caractéristiques physicochimiques atypiques. En pareil cas, il faudrait comparer les sols à l'étude avec le *sol témoin négatif*. Les résultats que donnera ce dernier aideront à distinguer l'effet des contaminants des autres effets causés par les propriétés physicochimique du sol telles que la granulométrie, la teneur en COT (%) et la teneur en matière organique (%). Indépendamment de l'emploi du *sol de référence* ou du *sol témoin négatif* pour les comparaisons statistiques, il faut utiliser les résultats donnés par le *sol témoin négatif* pour juger de la validité et de l'acceptabilité de l'essai (v. § 4.1.3, 4.2.3 et 4.3.3).

---

occupe : 200 g, poids sec) par le nombre de répétitions à utiliser dans l'essai (c'est-à-dire, en l'occurrence, trois).

L'analyse des résultats diffère selon l'objet de l'essai et les particularités du plan d'expérience. La présente section traite des méthodes d'analyse, en commençant par le plan le plus simple et passant aux plans les plus complexes. Les méthodes standard d'analyse statistique constituent généralement tout ce dont on a besoin pour analyser les résultats. On devrait consulter EC (2004b) pour obtenir des conseils sur les paramètres statistiques de mesure appropriés et sur leur calcul. Comme toujours, on devrait chercher à obtenir les conseils d'un statisticien qui connaît la *toxicologie* pour décider du plan d'expérience et de l'analyse de leurs résultats.

Pour l'interprétation statistique de la signification des constatations découlant des essais de toxicité d'un sol, on a généralement recours à l'analyse de la variance comportant des comparaisons multiples des données relatives aux effets mesurés grâce à des essais à concentration unique employant des échantillons réitérés de sol prélevés sur le terrain dans plus d'une station. Ce test d'hypothèse est susceptible de faiblesses importantes. Notamment, toute augmentation de la variabilité dans l'essai affaiblit sa capacité de distinguer les effets toxiques (c'est-à-dire que l'on conclut à une toxicité moindre). De même, l'emploi d'un petit nombre de répétitions plutôt que d'un grand nombre affaiblit le pouvoir de discrimination de l'essai et mène à la conclusion selon laquelle, toutes autres choses étant égales, la toxicité apparente est moindre (v. § 5.5.2). On ne peut pas se passer du test d'hypothèse quand on compare les données sur la toxicité d'échantillons multiples de sol prélevés sur le terrain (c'est-à-dire d'échantillons réitérés de sol provenant de plus d'une station d'échantillonnage) à une seule concentration (habituellement l'échantillon non dilué c'est-à-dire à 100 % de concentration). Si l'essai a employé diverses concentrations de chaque échantillon de sol et si on détermine des valeurs multiples pour la CI p ou la CE 50 (v. § 6.4), on peut comparer de plusieurs manières ces estimations ponctuelles de la toxicité. On devrait consulter la section 9 de EC (2004b) pour accéder à des conseils sur la comparaison de valeurs multiples de la CI p ou de la CE 50 (y compris de la CL 50).

Les analyses paramétriques comportant l'analyse de variance de données comparatives provenant d'essais à concentration unique employant des échantillons multiples de sol prélevés sur le terrain (c'est-à-dire d'échantillons réitérés provenant de plus d'une station d'échantillonnage) supposent que les données obéissent à la loi normale, que les variantes expérimentales sont indépendantes et que la variance est homogène parmi les diverses variantes. Dans un premier temps de l'analyse statistique, on devrait tester ces hypothèses à l'aide du *test de Shapiro-Wilk* de vérification de la normalité des distributions et du *test de Bartlett d'homogénéité des variances* (Eisenhart *et al.*, 1947 ; Sokal et Rohlf, 1969). Si les données satisfont à ces hypothèses, on peut procéder à l'analyse. Sinon, on pourrait transformer les données [par ex. en racines carrées, en logarithmes ou en arc sin(racine carrée) pour ce qui concerne les données *quantiques* à utiliser dans l'analyse statistique ; Mearns *et al.*, 1986]. Les tests de normalité et d'homogénéité pourraient alors montrer la conformité à la normalité et à l'homogénéité et, de fait, c'est l'issue probable de la transformation. On pourrait tester de nouveau les hypothèses après la transformation (quelle qu'elle soit) des donnée. Les tests paramétriques sont raisonnablement robustes à l'égard des écarts modérés par rapport à la normalité et à l'équivariance ; donc, l'analyse paramétrique (par ex. l'analyse de variance et la comparaison multiple) devrait aller de l'avant même si la transformation laisse subsister une légère non-conformité. L'exclusion d'un ensemble de données pour cause d'irrégularités mineures ferait perdre le bénéfice d'une analyse satisfaisante et sensible et ferait renoncer à la détection des effets réels de la toxicité [81]. On devrait également appliquer en parallèle des tests non paramétriques d'analyse statistique, la plus sensible des deux analyses (valeur moins élevée de l'effet mesuré) donnant les estimations finales de la toxicité. On devrait consulter la section 3 dans EC (2004b) pour obtenir des conseils sur la comparaison des résultats d'essais à concentration unique ayant porté sur des échantillons

81. Les tests de la normalité et de l'homogénéité deviennent moins significatifs si le nombre d'échantillons typiquement prélevés dans les études d'écotoxicologie diminue dans chaque station d'échantillonnage. L'établissement de graphiques de l'allure générale de la distribution de la toxicité et de ses écarts apparents ainsi que l'examen de ces graphiques peuvent être plus révélateurs. C'est pourquoi on les recommande (EC, 2004b). L'égalité de la taille des échantillons et l'amplitude de la variation sont probablement des facteurs plus importants pour les résultats de l'analyse paramétrique, mais, en toxicologie, on s'en est peu soucié. La robustesse de l'analyse de variance est révélée par sa capacité de produire des probabilités réalistes si la distribution des données est raisonnablement symétrique et si les variantes expérimentales diffèrent entre elles selon un rapport inférieur à 3 (Newman, 1995).

réitérés, prélevés en plusieurs stations, à l'aide de tests paramétriques et non paramétriques.

Si on effectue un essai à plusieurs concentrations sur un ou plusieurs échantillons de sol prélevés sur le terrain et dilué avec du *sol témoin négatif* ou du sol de référence *non contaminé*, on devrait suivre les conseils de la section 6 (y compris du § 6.2, pour la réalisation de recherches de la gamme de concentrations à utiliser, et du § 6.4 pour le calcul de la valeur de l'effet mesuré). On devrait consulter la section 9 d'EC (2004b) pour la comparaison de telles estimations ponctuelles de la toxicité dans le cas d'échantillons multiples de sol prélevés sur le terrain.

5.5.1 Variations des plans d'étude et de l'analyse

Une étude très préliminaire pourrait ne disposer que d'un seul échantillon de *sol à l'étude* (c'est-à-dire de *sol d'un emplacement à l'étude* effectivement ou potentiellement contaminé) et d'un échantillon de *sol de référence* en exemplaire unique. Un simple examen des résultats pourrait inspirer la conception d'études plus approfondies.

Si l'on dispose d'un seul échantillon pour l'essai et d'un seul échantillon de référence, chacun subdivisé le même nombre de fois, le *test* t *de Student* conviendrait à l'analyse (Paine et McPherson, 1991 ; EC, 1997a, b, 2001). Ce test est assez robuste et il s'accommode d'un nombre inégal de répétitions des échantillons d'essai et de référence de même que d'une inégalité modérée des variances des deux groupes (Newman, 1995 ; USEPA, 1995).

En principe, on pourrait faire une évaluation préliminaire avec les échantillons prélevés en de nombreuses stations, mais non réitérés ni subdivisés au laboratoire. L'objectif pourrait être de déterminer un nombre réduit de stations d'échantillonnage méritant une étude plus approfondie ou plus détaillée. Les occasions d'analyse statistique seraient limitées. Les données expérimentales non répétées pourraient être comparées aux données de référence, au moyen de méthodes de détection des observations aberrantes (USEPA, 1994a ; Newman, 1995 ; EC, 1997a, b, 2001, 2004b). Un échantillon serait considéré comme toxique si la valeur du résultat qui lui est attribué était rejetée, parce qu'elle serait jugée extrême relativement aux données relatives au *sol de référence* et/ou au *sol témoin négatif*.

Une étude plus habituelle des sols comporterait le prélèvement d'échantillons réitérés en plusieurs endroits, par les mêmes méthodes puis leur comparaison avec des échantillons subdivisés d'un seul *sol de référence* et/ou *sol témoin négatif*. Plusieurs pistes s'offrent à l'analyse, selon le type et la qualité des données, mais, souvent, l'analyse de variance serait suivie d'un des tests de comparaison multiple. Dans l'analyse de variance, le *sol de référence* serait traité de la même manière que le sol d'un endroit quelconque.

Dans ces études portant sur plusieurs endroits, le type de répétition ou de réitération influerait sur l'interprétation des résultats. Si on prélevait des échantillons réitérés à chaque lieu d'échantillonnage et si, au laboratoire, on n'utilisait aucun échantillon subdivisé (répétition), une analyse de variance à un critère de classification permettrait d'évaluer l'écart global dans les résultats de l'essai, pour ce qui concerne le lieu de l'échantillonnage, en sus de la variabilité combinée de l'échantillonnage en cet endroit et de l'exécution de l'essai. Il serait inhabituel — mais l'essai serait beaucoup plus puissant — de disposer d'échantillons réitérés de tous les lieux d'échantillonnage et, également, d'échantillons subdivisés en laboratoire de chaque échantillon réitéré. Ce faisant, les échantillons subdivisés deviendraient les répétitions d'une analyse de variance à un critère de classification hiérarchique (dite aussi *nichée* ou *emboîtée*) et ils seraient la base de variabilité pour la comparaison des écarts entre les échantillons. L'analyse de variance pourrait servir à déceler : *a*) un écart global dans les résultats de l'essai entre les échantillons, pour ce qui concerne le lieu de leur prélèvement ; *b*) une éventuelle différence globale entre les échantillons réitérés, prélevés en divers endroits. Après l'analyse de variance, l'analyse passerait à un ou à plusieurs types de tests de comparaison multiple, décrits ci-après.

Si l'essai n'a porté que sur des échantillons subdivisés de laboratoire (répétitions) et qu'aucun échantillon réitéré de terrain n'a été étudié, on ne peut rien conclure au sujet des différences dues au lieu d'échantillonnage (v. § 5.1). Les répétitions de laboratoire ne révéleraient, entre les échantillons, que des différences supérieures à la variabilité de base des modes opératoires intralaboratoire pour la préparation et l'exécution de l'essai. La variabilité des échantillons due au lieu ne serait pas véritablement évaluée par l'analyse statistique, sauf qu'elle contribuerait à toute différence dans les résultats de l'essai associée au lieu du prélèvement.

Si on voulait comparer les résultats de l'essai des échantillons réitérés de chaque lieu d'échantillonnage aux résultats donnés par le sol de référence, pour déterminer si la toxicité des deux sources de sol (emplacements) différait, on devrait utiliser le *test de Dunnett*. Ce test, qui suppose la normalité des distributions et l'équivariance, se fonde sur une valeur expérimentale d'α (la probabilité de déclarer significative une différence qui n'existe pas). Si le nombre de réitérations n'était pas égal, on pourrait utiliser la *modification de Dunn-Sidak du test t* ou, encore, l'*ajustement de Bonferroni du test t* (p. 189 dans Newman, 1995 ; annexe D dans USEPA, 1995 ; § 7.5.1 dans EC, 2004b).

Dans une étude portant sur de nombreux endroits, on pourrait vouloir savoir quels sont les échantillons provenant de divers endroits ayant présenté des résultats différant statistiquement des résultats des autres échantillons et quels sont les échantillons différant de l'échantillon ou des échantillons de référence et/ou de l'échantillon ou des échantillons témoins négatifs. Cette situation pourrait comporter le prélèvement d'échantillons dans un certain nombre d'endroits à des distances de plus en plus grandes par rapport à la source ponctuelle de contamination, auquel cas on pourrait vouloir connaître quels sont les lieux d'échantillonnage ayant fourni des échantillons présentant une toxicité significativement supérieure à celle des autres et, ainsi, quels emplacements méritent particulièrement d'être dépollués. Le *test de Tukey* est conçu pour une telle analyse. Il fait fréquemment partie des progiciels statistiques et il peut s'appliquer à des échantillons de tailles inégales[82].

82. Il existe une autre approche (EC, 1997a, b, 2001). Pour un nombre égal de répétitions, on recommande la méthode dite *LSD* (pour *Least Significant Difference* [plus petite différence significative]) de Fisher. Cette méthode se fonde sur un taux moindre d'erreur se rapportant à une comparaison par paires pour α, dans la comparaison des données relatives à des échantillons provenant d'un endroit quelconque aux données relatives aux échantillons d'un autre endroit, mais elle maintient la valeur globale d'α à la valeur présélectionnée (habituellement 0,05). On trouve rarement cette méthode dans les progiciels de calcul de la toxicité, mais certains manuels la décrivent (par ex. Steel et Torrie, 1980). Nous recommandons plutôt le *test de Tukey*, en partie parce que le test LSD de Fisher risquerait de déclarer trop facilement des différences significatives. La méthode LSD vise également à ne faire que quelques unes de toutes les comparaisons possibles d'un ensemble de données, et ces comparaisons devraient être spécifiées d'avance.

Si on voulait comparer la toxicité des échantillons de chaque lieu d'échantillonnage à celle de l'échantillon ou des échantillons de référence, mais que les données ne répondaient pas aux exigences de la normalité et de l'équivariance, on remplacerait les tests de l'analyse de variance et les tests ultérieurs par des tests non paramétriques. On utiliserait le *test multiunivoque de Steel* si les répétitions étaient égales, tandis que, dans le cas contraire, il faudrait utiliser le *test de sommation des rangs de Wilcoxon* avec l'ajustement de Bonferroni.

5.5.2 Calcul de la puissance

Un facteur important dont il faut tenir compte dans l'analyse des résultats des essais de toxicité de sols est la possibilité de faux positifs (c'est-à-dire de qualifier de contaminé un lieu *non contaminé :* erreur de type I) ou de faux négatifs (c'est-à-dire de qualifier de *non contaminé* un lieu contaminé : erreur de type II). Les scientifiques sont habituellement prudents dans le choix du niveau de signification (α) pour la tolérance des résultats faux positifs (erreur de type I) et ils le fixent habituellement à P = 0,05 ou 0,01. Récemment, on a incité les toxicologues à signaler à la fois la valeur d'α et celle de la puissance statistique ($1 - \beta$), c'est-à-dire la probabilité de rejeter, avec raison, l'hypothèse nulle (H_0) et de ne pas faire l'erreur de type II. Plusieurs facteur influent sur la puissance statistique, notamment :

- la variabilité des échantillons répétés représentant la même variante expérimentale ;
- α (c'est-à-dire la probabilité de faire une erreur de type I) ;
- l'*ampleur de l'effet* (c'est-à-dire l'ampleur de l'effet véritable que l'essai cherche à déterminer) ;
- n (c'est-à-dire le nombre d'échantillons ou de répétitions utilisées dans l'essai).

Les guides d'Environnement Canada sur les méthodes statistiques applicables aux essais d'écotoxicité (EC, 2004b) renferment de plus amples renseignements et conseils sur les erreurs des types I et II.

On peut se servir du calcul de la puissance *a priori* pour déterminer l'ampleur de l'erreur de type II et la probabilité de résultats faux positifs. On peut également s'en servir pour établir le nombre approprié d'échantillons réitérés et de répétitions de laboratoires pour des études ultérieures comportant le même essai ou pour aider à la sélection des futurs lieux d'échantillonnage. Il est toujours prudent d'inclure dans le plan d'expérience autant de répétitions

qu'il est justifié des points de vue économique et logistique (v. § 5.1) ; le calcul de la puissance aidera à cette détermination. On peut trouver dans USEPA (1994a) une bonne explication de la puissance d'un test et la façon de l'évaluer. Dans EC (2004b), on donne des conseils sur le calcul de la puissance.

Beaucoup de chercheurs éprouvent des difficultés à calculer la puissance et ne l'appliquent pas, rebutés par sa complexité apparente et les différentes formules propres aux divers tests statistiques. Comme solution de rechange à cette complexité, on peut appliquer la *plus petite différence significative* (comme « indice de puissance » ; v. EC, 2004b pour des conseils).

Modes opératoires particuliers de l'essai sur un sol additionné d'une substance

Dans la présente section, on trouvera des conseils et des instructions pour la préparation et l'essai d'un *sol témoin négatif* additionné, à des fins expérimentales, d'une ou de plusieurs substances ou produits chimiques. Ces conseils et instructions s'appliquent à chacune des trois méthodes d'essai biologique décrites dans la section 4. Les conseils donnés dans EC (1995) pour *enrichir* un sédiment témoin négatif d'une ou de plusieurs substances chimiques et effectuer des essais de toxicité avec des mélanges de substances et de sédiment valent encore ici, pour un sol additionné d'une substance. On pourrait devoir évaluer et normaliser davantage les modes opératoires de la préparation de sols additionnés d'une substance, exposés ci-après (§ 6.2) avant d'appliquer les essais de toxicité de sols employant des vers de terre ou d'autres organismes terricoles appropriés pour évaluer les mélanges particuliers de sol et de substance(s) à des fins réglementaires.

On peut examiner expérimentalement la ou les causes de la toxicité d'un sol ainsi que les effets toxiques interactifs de substance(s) ou de produit(s) chimique(s) en association avec un sol par ailleurs *non contaminé,* en enrichissant un *sol témoin négatif* (§ 3.2) en ces substances. Cet enrichissement pourrait concerner une ou plusieurs substances ou produits chimiques. Parmi les autres options des essais de toxicité employant des vers de terre ainsi que les modes opératoires décrits dans le présent document, mentionnons l'enrichissement d'un *sol de référence* (§ 3.4) ou d'un *sol à l'étude* (§ 3.5) d'une ou de plusieurs substances ou produits chimiques. Les essais de toxicité employant un sol additionné d'une gamme de concentrations de substances ou de produits chimiques à l'étude peuvent servir à obtenir des données permettant l'estimation des CL 50 (v. § 6.4.1) et ils peuvent déterminer d'autres paramètres statistiques fondés sur des concentrations seuils causant des effets sublétaux particuliers (v. § 6.4.1 et 6.4.2).

Dans le § 6.2, on décrit le mode opératoire de la préparation de mélanges d'essai d'un sol additionné d'une substance. Dans le § 6.3, on décrit le mode opératoire des observations et des mesures à faire pendant l'essai de toxicité et à sa fin, tandis que, dans le § 6.4, on expose le mode opératoire de l'estimation de l'effet mesuré par des essais à plusieurs concentrations. Ces modes opératoires s'appliquent également aux mélanges de concentrations multiples de *sols à l'étude* prélevés sur le terrain (y compris de matières résiduaires sous forme particulaire telles que les boues ou d'autres déblais de dragage destinés à l'épandage) dans un *sol témoin négatif* ou dans un *sol de référence* et à effectuer des essais à plusieurs concentrations ainsi qu'à déterminer les paramètres statistiques de ces mélanges (v. la section 5 et, particulièrement, le § 5.5). On effectue aussi, en s'inspirant du mode opératoire et des conseils en matière de statistique décrits dans la présente section, des essais à plusieurs concentrations employant un *sol témoin positif* (§ 3.3) ou un ou plusieurs toxiques de référence additionnés à un *sol témoin négatif* (§ 4.1.8, 4.2.8 et 4.3.8). En outre, on peut déterminer l'influence des caractéristiques physicochimiques d'un sol témoin négatif naturel ou artificiel sur la toxicité chimique, grâce à des essais de toxicité employant un sol enrichi selon le mode opératoire et les conseils en matière de statistique exposés dans la présente section.

6.1 Propriétés, étiquetage et entreposage des échantillons

On devrait se renseigner sur les propriétés des substances ou produits chimiques que l'on doit ajouter, à des fins expérimentales, au *sol témoin négatif* [83]. On devrait

83. Certaines études pourraient exiger l'addition (mélange) d'une ou de plusieurs concentrations de substance(s) ou de produit(s) chimiques ou de *sol à l'étude* (par ex. sol prélevé sur le terrain, effectivement ou potentiellement contaminé ou boue d'épuration) dans un *sol témoin négatif* ou un *sol de référence*. D'autres applications pourraient demander l'addition de substance(s) ou produit(s) dans un ou plusieurs échantillons de *sol à l'étude.* Pour les études employant des échantillons de sol contaminé ou d'une matière particulaire semblable (boue d'épuration des eaux domestiques ou boue d'origine industrielle), on devrait suivre les consignes sur la caractérisation des échantillons, données au § 5.2. On devrait prélever (sur le terrain), étiqueter, transporter, entreposer et analyser tout échantillon de sol témoin négatif, de sol de référence, de sol contaminé ou de déchet particulaire à soumettre à des essais de toxicité de sols enrichis, selon les instructions données dans les § 5.1 et 5.2.

également obtenir, relativement à chaque substance ou produit chimique (par ex. pesticides ou d'autres préparations du commerce), des renseignements sur la concentration des impuretés et des ingrédients (actifs ou majeurs), la solubilité dans l'eau, la pression de vapeur, la stabilité chimique, les constantes de dissociation, les coefficients d'adsorption, la toxicité pour l'Homme et les organismes terrestres ainsi que la biodégradabilité. Lorsque la solubilité dans l'eau est douteuse ou problématique, on devrait obtenir et signaler des modes opératoires acceptables, éprouvés, pour la préparation de solutions aqueuses de la ou des substances. À défaut de mode opératoire acceptable pour solubiliser la ou les substances à l'étude dans l'eau, on devrait effectuer des essais préliminaires de leur solubilisation dans l'eau d'essai ou dans un solvant non aqueux et en confirmer les résultats par des analyses. On devrait également obtenir et consigner d'autres renseignements utiles tels que la formule développée, la nature et le pourcentage d'impuretés importantes, la présence et la quantité d'additifs et le coefficient de partage entre le *n*-octanol et l'eau. On devrait obtenir et prendre connaissance de toute fiche signalétique applicable.

Les substances chimiques à soumettre à l'essai devraient être au moins de qualité « réactif », à moins que l'on ne demande un essai sur une préparation du commerce ou une substance de qualité technique. Les récipients des substances doivent être scellés et codés ou étiquetés à leur réception. S'il y a lieu, on devrait indiquer sur l'étiquette ou consigner sur une fiche séparée, consacrée à l'échantillon, les renseignements exigés (nom de la substance, fournisseur, date de réception, responsable des essais, etc.). Les conditions d'entreposage (par ex. température, protection contre la lumière) sont souvent commandées par la nature de la substance.

6.2 Préparation des mélanges d'essai

La veille de l'essai de toxicité (c'est-à-dire au jour – 1), on devrait préparer, introduire dans les enceintes expérimentales et les y laisser pendant la nuit les mélanges de substance(s) ou de produit(s) chimique(s) ajouté(s) au *sol témoin négatif*, avant d'introduire, le lendemain (c'est-à-dire au jour 0), les organismes d'expérience (v. § 4.1.1, 4.2.1 et 4.3.1). On devrait préparer chaque *lot* de sol à l'étude représentant une variante expérimentale (concentration) particulière en une quantité suffisante pour permettre la préparation de toutes les répétitions de cette variante (concentration), de même que toute répétition ou quantité supplémentaires dont on a besoin pour les analyses physicochimiques (§ 6.3) ou d'autres essais de toxicité du sol à l'aide de vers de terre ou d'autres organismes terricoles (par ex. les essais effectués conformément aux méthodes exposées dans EC 2004d ou EC 2004e).

On recommande l'emploi d'un sol artificiel (§ 3.2.2) pour la préparation de chaque mélange d'essai, puisque cette matière offre une approche constante, normalisée, permettant la comparaison des résultats relatifs à d'autres substances ou produits chimiques éprouvés selon une méthode semblable, dans le même laboratoire ou ailleurs (par ex. selon l'OCDE [OECD, 1984] ; l'USEPA, 1989 ; l'ISO, 1993, 1998 ; l'ASTM, 1999b ; ou l'OCDE [OECD, 2000]). Si on utilise un sol artificiel, on devrait employer la recette donnée au § 3.2.2. On devrait préparer la quantité nécessaire de sol artificiel pour l'essai ou les essais, l'hydrater à environ 20 % d'humidité, au besoin en ajuster le pH dans l'intervalle de 6,0 à 7,5 [84], la laisser mûrir au moins 3 jours et l'entreposer à 4 ± 2 °C jusqu'à ce qu'on en ait besoin (v. § 3.2.2). L'humidité finale (y compris celle qui est attribuable à l'ajout d'une quantité mesurée de substance ou de produit chimique à l'étude, dissoute dans *l'eau d'essai* avec ou sans solvant organique) de tout sol additionné d'une substance et préparé à l'aide d'un sol artificiel devrait être de l'ordre de 70 % de la capacité de rétention en eau du mélange final (§ 3.2.2), à chaque variante (concentration) [85]

84. Si, toutefois, on prévoit que la ou les substances ou produits chimiques d'essai modifieront le pH du sol et si l'objet de l'étude est de neutraliser cette influence, on devrait ajuster le pH (en milieu aqueux) de chaque *lot* (concentration) à une valeur normalisée (par ex. pH 6,5). Les études visant à déterminer la mesure dans laquelle la substance à l'étude, basique ou acide, modifie la toxicité du sol additionné d'une série de concentrations de cette substance, en raison de l'influence du pH même, devraient comporter deux essais parallèles. Dans l'un, on ajuste le pH de chaque concentration d'essai à une valeur normalisée (par ex. pH 6,5) en utilisant la quantité nécessaire (qui diffère selon la concentration) de carbonate de calcium, tandis que, dans l'autre essai, on utilise, dans chaque variante expérimentale, une quantité identique de carbonate de calcium, suffisante pour atteindre le pH « normalisé » (par ex. pH 6,5) dans le *témoin négatif*.

85. L'exemple ci-après expose les calculs montrant le volume de l'eau (désionisée ou distillée) et d'une solution mère d'un toxique de référence (acide borique) à ajouter à un échantillon de sol artificiel déjà humide, pour créer un mélange (variante) dont l'humidité est de 70 % de la capacité de rétention en eau (CRE) du sol artificiel. Les calculs tiennent compte du volume de la solution mère d'acide borique ajouté pendant la préparation de la variante,

dans le cadre de l'ajustement global de l'humidité du sol. Pour simplifier les calculs, nous posons que 200 g (poids sec) de sol artificiel (SA) suffisent pour constituer l'aliquote de 350 mL de sol à introduire dans chaque enceinte expérimentale de l'essai de létalité aiguë employant des eisénies, à raison de 3 répétitions pour chaque variante expérimentale utilisée (v. § 4.1.1).

Les équations présentées dans le § 5.3 pour le calcul de la CRE et l'ajustement de l'humidité du sol à un certain pourcentage de cette valeur s'appliquent également ici. Pour cet exemple, nous posons que les hypothèses suivantes s'appliquent (v. § 5.3, pour ce qui concerne les équations et les définitions associées à ces termes).

Hypothèses

Poids frais de sol artificiel (SA)	=	3,2486 g
Poids sec de SA	=	2,6924 g
Humidité (H) du SA	=	[(3,2486 – 2,6924)/ 2,6924] × 100
	=	20,66 % (humidité initiale)
CRE du SA	=	72,10 %
Pourcentage souhaité de la CRE ($\%_{CRE}$)	=	70,00 %
Poids sec de SA nécessaire à l'essai (P_S)	=	[200,00 g/rép. × 3 rép.] + supplément de 25,00 g
	=	625,00 g secs
Poids frais de SA nécessaire à l'essai (P_F)	=	(625,00 × 3,2486)/2,6924
	=	754,11 g frais

Calculs pour la préparation d'un mélange (variante) titrant 2 000 mg d'acide borique par kilogramme sec de sol artificiel

La solution mère est constituée de 25 g d'H_3BO_3 dans 1 L d'eau désionisée.

La quantité d'acide borique nécessaire, ramenée au poids sec de sol est comme suit :

H_3BO_3 = (2 g d'H_3BO_3 / 1 000 g secs de sol) × 625,00 g secs
= 1,25 g d'H_3BO_3

Le volume de solution mère nécessaire est comme suit :

H_3BO_3 = 1,25 g d'H_3BO_3 / (25 g d'H_3BO_3 / 1 000 mL d'eau)
= 50,00 mL de solution mère

Le pourcentage d'eau (P_W) à ajouter à cette variante pour obtenir le pourcentage souhaité (70 %) de la CRE est comme suit :

P_W = [CRE × $\%_{CRE}$ / 100)] – H
= [72,10 × (70,00 / 100)] – 20,66
= 29,81 %

Le volume d'eau (V_W) à ajouter à cette variante pour obtenir le pourcentage souhaité (70 %) de la CRE est comme suit :

V_W = (P_W × P_S) / 100
= (29,81 × 625,00 g secs) / 100
= 186,31 mL d'eau nécessaire

Cependant, comme une partie de ce volume nécessaire, 50,00 mL, est ajoutée avec la solution mère, il ne faut donc, comme volume supplémentaire que (186,31 mL d'eau – 50,00 mL de solution mère) = 136,31 mL.

En conséquence, le poids total final (frais) de sol nécessaire serait de (754,11 g secs, au taux initial d'humidité du sol [c'est-à-dire P_W] + 136,31 mL d'eau + 50,00 mL de solution mère) = 940,42 g, et l'humidité finale du sol, rapportés à son poids sec serait de {[(940,42 – 625,00) / 625,00] × 100} = 50,47 %.

L'humidité finale de cette variante expérimentale (c'est-à-dire 50,47 %) représente 70 % de la capacité de rétention en eau du sol à l'étude (50,47 ÷ 72,10 = 0,70).

L'humidité finale de chaque mélange (variante) utilisé dans un essai devrait être aussi semblable que possible.

On peut choisir d'utiliser un sol témoin naturel (§ 3.2.1) plutôt qu'un sol témoin artificiel (§ 3.2.2) comme *sol témoin négatif* à enrichir d'une ou de plusieurs substances ou produits chimiques ainsi que dans les répétitions correspondantes de sol témoin à inclure dans l'essai. Le mode opératoire décrit dans le présent document à l'égard du sol artificiel s'appliquent également au sol naturel, si on en utilise, si ce n'est que l'humidité finale de chaque *lot* de sol additionné d'une substance (y compris les lots témoins) préparée à l'aide de sol prélevé sur le terrain devrait être ajustée au pourcentage optimal de sa capacité de rétention en eau, conformément aux conseils exposés dans le § 5.3.

Le mode opératoire servant à l'enrichissement expérimental du sol dépend des objectifs de l'étude et de la nature de la substance à l'étude à mélanger au *sol témoin négatif* ou à un autre sol. Souvent, on prépare un mélange de substance et de sol en apprêtant une solution mère de la ou des substances ou produits chimiques à l'étude, puis en en mélangeant une ou plusieurs mesures dans un *sol témoin négatif*, artificiel ou naturel (§ 3.2). Le solvant que l'on préfère pour la préparation des *solutions mères* est l'*eau d'essai* (c'est-à-dire désionisée ou distillée) ; on devrait éviter d'utiliser d'autres solvants que de l'eau d'essai à 100 % , sauf nécessité absolue. Si les substances ou produits chimiques ne se dissolvent pas facilement dans l'eau d'essai, on peut utiliser un peu de solvant organique convenable, miscible dans l'eau, peu toxique (par ex. acétone, méthanol ou éthanol) pour aider

à disperser ces substances dans l'eau. On ne devrait pas utiliser de surfactifs.

S'il faut employer un solvant organique, il faut effectuer l'essai à l'aide d'une série d'enceintes expérimentales ne contenant que du *sol témoin négatif* (c'est-à-dire 100 % de sol *non contaminé,* artificiel ou naturel, ne renfermant pas de solvant ni de substance à l'étude), de même qu'une série d'enceintes renfermant uniquement du sol témoin du solvant (OECD, 1984, 2000 ; ISO, 1993, 1998 ; ASTM, 1999b ; EC, 2000b). À cette fin, il faut préparer un *lot* du *sol témoin du solvant* renfermant la concentration d'agent solubilisant présent dans la plus forte concentration, dans le sol, de substance(s) ou de produit(s) chimique(s) à l'étude. Il faut utiliser du solvant du même *lot* que celui qui a servi à préparer la solution mère des substances à l'étude. On devrait utiliser les solvants avec modération, puisqu'ils pourraient contribuer à la toxicité du sol à l'étude préparé. La concentration maximale de solvant dans le sol ne devrait pas agir sur le comportement des vers de terre pendant l'essai. Si on ne connaît pas cette concentration, on devrait effectuer un essai préliminaire *avec solvant uniquement,* à diverses concentrations, dans le *sol témoin négatif,* pour déterminer la concentration-seuil efficace du solvant que l'on envisage d'utiliser dans l'essai définitif.

Pour les essais comportant la préparation de concentrations de substance additionnée à un sol artificiel, dans lesquelles la substance est insoluble dans l'eau, mais soluble dans un solvant organique, on devrait dissoudre la quantité de substance à l'étude nécessaire à la préparation du volume nécessaire d'une concentration d'essai particulière dans un peu de solvant organique convenable (par ex. de l'acétone). On devrait ensuite pulvériser ou mélanger ce mélange de substance dans un solvant sur ou dans un peu de la quantité finale de sable quartzeux fin dont on a besoin pour la préparation de chaque concentration d'essai comprenant une quantité mesurée d'un mélange particulier de substance dans un solvant ajouté au sol artificiel (v. § 3.2.2). On élimine ensuite le solvant par évaporation, en plaçant le récipient dans une hotte, pendant au moins une heure, jusqu'à ce qu'on ne puisse plus déceler d'odeur résiduelle du solvant. Ensuite, on mélange à fond le mélange de substance dans le sable (dont le solvant a été évaporé) avec la quantité restante de sable préhumidifié et les autres ingrédients nécessaires à la préparation du sol artificiel (§ 3.2.2). On ajoute ensuite la quantité d'eau désionisée nécessaire à l'obtention d'une humidité finale d'environ 70 % de la capacité maximale de rétention en eau de ce sol artificiel, puis on mélange le tout avec le mélange de sol, de sable et de tourbe. On peut alors ajouter aux enceintes expérimentales le sol enrichi de substance (OECD, 2000).

Il faut préparer l'échantillon de *sol témoin négatif* à inclure dans l'essai d'après le même mode opératoire, mais sans addition de la substance à l'étude. En outre, ce sol doit renfermer une concentration de solvant aussi élevée que celle qui se trouve dans n'importe laquelle des concentrations de sol additionné d'une substance que l'on utilise dans un essai.

Si la substance à l'étude à ajouter au sol artificiel est insoluble dans l'eau et dans tout solvant organique convenable (non toxique), on devrait en préparer un mélange constitué de 10 g de sable quartzeux industriel, fin, broyé et de la quantité de la substance nécessaire à l'obtention de la concentration d'essai voulue dans le sol. On devrait alors mélanger à fond ce mélange avec les autres constituants du sol artificiel préalablement humidifié. On ajoute ensuite, en mélangeant, la quantité d'eau désionisée nécessaire pour obtenir une humidité finale d'environ 70 % de la capacité maximale de rétention en eau. On peut ensuite déposer dans les enceintes expérimentales le mélange résultant de sol additionné de la substance (OECD, 2000).

Habituellement, on calcule, on mesure et on exprime les concentrations de substance ou de produit chimique dans le sol en milligrammes de substance à l'étude par kilogramme sec de sol ou en microgrammes par gramme sec (µg/g) [OECD, 1984, 2000 ; ISO, 1993]. De même, les résultats relatifs à l'effet mesuré sont reportés au poids sec de sol (§ 6.4).

Pour chaque variante faisant partie d'un essai, il faut normaliser les conditions de mélange, y compris le rapport solution/sol, la durée du mélange et du repos et la température de mélange et de repos. La durée de mélange d'un *sol enrichi* devrait pouvoir assurer l'homogénéisation chimique et elle peut être de quelques minutes à 24 heures. Pendant le mélange, on devrait maintenir la température basse pour réduire au minimum l'activité microbienne et la modification des caractéristiques physicochimiques du mélange. L'analyse de sous-échantillons du mélange est conseillée, pour déterminer le degré de mélange et d'homogénéité réalisé.

Pour certaines études, il pourrait être nécessaire de ne préparer qu'une seule concentration d'un mélange particulier de sol témoin négatif (ou d'un autre sol) et de substance(s) ou de produit(s) chimique(s) ou un mélange d'une seule concentration de sol contaminé ou de déchet particulaire dans un sol témoin négatif ou un autre sol. Par exemple, on pourrait réaliser un essai à concentration unique pour déterminer si une concentration particulière de substance ou de produit chimique dans un sol *non contaminé* est toxique pour les organismes en expérience. Une telle application pourrait servir à la recherche ou à des fins réglementaires.

On devrait recourir à un essai à plusieurs concentrations, en vertu duquel on ajoute une gamme de concentrations de substance à un *sol témoin négatif* (ou à un autre sol) dans des conditions normalisées, pour déterminer l'effet ou les effets que l'on souhaite mesurer (c'est-à-dire la CL 50, la CE 50, la CI p ; v. § 6.4) des mélanges de substance et de sol. Un essai à plusieurs concentrations employant un *sol témoin négatif* additionné d'un déchet particulaire donné pourrait également convenir. Il faut préparer, pour chaque essai à plusieurs concentrations au moins 5 concentrations plus le ou les témoins afin d'estimer la CL 50 aiguë (v. § 4.1.2 et 4.1.8) ou la CE 50 (ou une autre CE p) provoquant une réaction aiguë d'évitement (v. § 4.2.2) ; on en recommande même davantage (c'est-à-dire 6 à 10 concentrations plus les témoins). Pour un essai à plusieurs concentrations d'une durée de 56 jours (ou plus), il faut préparer au moins 7 concentrations plus le ou les témoins appropriés), et on en recommande davantage (c'est-à-dire au moins 10 plus les témoins) [v. § 4.3.1 et 4.3.2]. Lorsque l'on choisit les concentrations d'essai, on peut utiliser une suite géométrique appropriée de dilutions, chaque concentration successive de la substance ou du produit dans le sol étant au moins la moitié de celle qui la précède dans la suite (par ex. 10, 5, 2,5, 1,25, 0,63 mg/kg). On peut également choisir les concentrations dans d'autres suites logarithmiques appropriées de dilution (v. annexe I) ; on peut également les choisir après avoir effectué un essai préliminaire de toxicité visant à cerner la gamme de concentrations à utiliser. Le lecteur est prié de consulter les remarques liminaires de la section 4 pour obtenir des conseils supplémentaires sur la sélection des concentrations d'essai.

Pour choisir une gamme convenable de concentrations, il peut valoir la peine d'effectuer un essai préliminaire ou un essai de recherche de la gamme de concentrations à utiliser couvrant une gamme plus large de concentrations. On pourrait réduire ou supprimer complètement, pour ce genre d'essai, le nombre de répétitions par variante expérimentale (v. § 4.1.1, 4.2.1 et 4.3.1). Selon l'écart prévu ou révélé (par des études antérieures ayant employé la même substance ou une substance semblable) entre les enceintes expérimentales de la même variante expérimentale, on pourrait également réduire le nombre de répétitions dans les travaux de recherche et les essais biologiques (bioessais) de dépistage à des fins non réglementaires.

D'après les objectifs de l'essai, il pourrait être souhaitable de déterminer l'effet des caractéristiques du substrat (par ex. sa granulométrie ou sa teneur en matière organique) sur la toxicité des mélanges de substance chimique et de sol. Par exemple, on pourrait mesurer l'influence de la granulométrie du sol sur la toxicité chimique en effectuant des essais parallèles à plusieurs concentrations employant une série de mélanges constitués de la ou des substances ou produits chimiques à l'étude dans différentes fractions granulométriques (c'est-à-dire des classes granulométriques tamisées) ou dans différents types de *sol témoin négatif* naturel ou artificiel (§ 3.2). De même, on pourrait examiner le degré dans lequel la teneur en carbone organique total (%) ou la teneur en matière organique (%) du sol peut modifier la toxicité chimique, en effectuant des essais parallèles à plusieurs concentrations employant différents mélanges de substances et de sol préparés avec une série de sols témoins négatifs enrichis en matière organique. On devrait inclure dans l'essai, en tant que témoin séparé, chaque fraction granulométrique ou chaque préparation de *sol témoin négatif* naturel ou artificiel utilisé dans la préparation de ces mélanges.

Selon les objectifs et le plan de l'étude, on pourrait effectuer certains essais de toxicité d'un sol employant des vers de terre avec des échantillons de sol témoin négatif ou de sol de référence auxquels on applique, en surface, une ou des substances ou produits chimiques, plutôt que de les y mélanger. On peut appliquer ces traitements de surface sur le terrain ou en laboratoire. Les modes opératoires de l'application de substance(s) comprennent l'emploi d'un pulvérisateur à trajet balisé et étalonné pour assurer la distribution uniforme de la substance sur une surface donnée. On peut doser la ou

les substances ou produits chimiques dans le sol, grâce à la profondeur de pénétration, à la superficie ou à la largeur de la surface couverte en une passe, au calibre de la ou des buses, à la pression et à la vitesse de déplacement du pulvérisateur (Stephenson, G.L., Aquaterra Environmental, Orton, ON, communication personnelle, 2001). L'OCDE (OECD, 2000) donne des conseils sur les substances à appliquer à la surface du sol en préparation d'essais pour en mesurer l'effet sur la reproduction des vers de terre.

6.3 Observations et mesures pendant l'essai

Lorsque l'on met l'essai sur pied, on devrait faire la description qualitative de chaque mélange de *sol additionné d'une substance.* Cela pourrait englober des observations de la couleur, de la texture et de l'homogénéité apparente (visuelle) de chaque mélange. On devrait consigner toute modification de l'aspect du mélange pendant l'essai ou à la fin de ce dernier.

Dans les § 4.1.5, 4.2.5 et 4.3.5, on trouve des conseils et des exigences particulières sur les essais, relativement aux observations et aux mesures à faire au début et à la fin de l'essai et pendant ce dernier. Ces observations et mesures s'appliquent et doivent être effectués pendant la réalisation de n'importe lequel des essais de toxicité d'un sol décrits dans le présent document et pour lesquels on utilise un échantillon ou plus de sol additionné d'une substance.

Selon les objectifs de l'essai et son plan d'expérience, on pourrait préparer des enceintes expérimentales supplémentaires au jour – 1 (v. § 4.1.1, 4.2.1 et 4.3.1) pour surveiller les caractéristiques chimiques du sol. Ces enceintes supplémentaires feraient l'objet d'un prélèvement destructif pendant l'essai (c'est-à-dire au jour 0 et, dans certains cas, en d'autres jours, à mesure que l'essai se déroule) ainsi qu'à la fin de l'essai. On pourrait y introduire ou non des organismes, en fonction des objectifs de l'étude. On pourrait mesurer les concentrations chimiques dans le sol de ces enceintes après avoir prélevé des parties aliquotes de sol pour les analyses appropriées, au début de l'essai et à mesure qu'il se déroule et/ou à la fin de ce dernier.

Il faut mesurer la qualité (y compris le pH et l'humidité) de chaque mélange de sol enrichi à l'étude (y compris du *sol témoin négatif*) et consigner les résultats au début et à la fin de l'essai, comme il est décrit dans les § 4.1.5, 4.2.5 et 4.3.5. Si les capacités d'analyse le permettent, il est recommandé d'analyser la ou les solutions mères en même temps qu'une ou plusieurs parties aliquotes de chaque mélange de sol enrichi, pour déterminer les concentrations chimiques et évaluer la qualité de l'enrichissement. Ces aliquotes et solutions devraient être conservées, entreposées et analysées conformément à des modes opératoires appropriés et validés.

À moins d'avoir de bonnes raisons de croire que les dosages ne sont pas exacts, on devrait calculer les résultats toxicologiques de chaque essai dans lequel on mesure des concentrations dans chaque mélange de sol enrichi faisant partie de l'essai et les exprimer en fonction de ces valeurs mesurées. Il faudrait au moins prélever des parties aliquotes des échantillons aux concentrations forte, médiane et faible, au début et à la fin de l'essai [86] ; auquel cas, les valeurs calculées des effets mesurés (§ 6.4) se fonderaient sur des valeurs nominales. On devrait comparer tout résultat de ce dosage de la ou des substances ou produits chimiques à l'étude aux concentrations nominales, signaler tout écart qu'il présente et par rapport aux concentrations nominales et en discuter. Si on utilise les concentrations nominales pour exprimer les résultats toxicologiques, il faut l'expliciter dans le rapport particulier de l'essai (v. § 7.1.6).

6.4 Paramètres ultimes (effets mesurés) et calculs

Les essais à plusieurs concentrations employant des mélanges de sols enrichis se caractérisent par des paramètres statistiques propres à chaque essai (v. § 4.1.7, 4.2.7 et 4.3.7). On trouve des conseils sur le calcul de la CL 50 (§ 4.1.7 et 4.3.7) ou de la CE 50 (§ 4.2.7) dans le § 6.4.1 ci-après, tandis que, pour le calcul d'une CI p (d'après les donnés révélant une inhibition de la fonction de reproduction ou de la croissance ; v. § 4.3.7), il faut aller au § 6.4.2. Dans le § 5.5, on donne des conseils sur le calcul et la comparaison de ces paramètres révélés par des essais à concentration unique utilisant des échantillons de sol prélevés sur le terrain, qui s'appliquent également aux essais à concentration unique effectués sur des mélanges de sol enrichi. Pour plus de renseignements sur ces statistiques et d'autres statistiques paramétriques (ou non paramétriques) appropriées, à

86. Certaines substances pourraient être réputés stables dans les conditions expérimentales définies. Comme leur concentration serait peu susceptible de diminuer pendant l'essai, on pourrait choisir de limiter leur dosage aux échantillons prélevés uniquement au début.

appliquer aux effets mesurés, on devrait consulter le rapport d'Environnement Canada sur les statistiques permettant la détermination des effets toxiques mesurés (EC, 2004b).

Dans tout essai qui comprend un *sol témoin du solvant* (v. § 6.2), il faut comparer statistiquement les résultats des essais relatifs aux vers de terre maintenus dans ce sol aux résultats relatifs aux organismes maintenus dans le *sol témoin négatif*. Si n'importe lequel des effets mesurés dans ces deux sols témoins servant à établir la validité de l'essai (v. § 4.1.3, 4.2.3 et 4.3.3) diffère significativement, selon le *test* t *de Student*, on ne peut utiliser que le *sol témoin du solvant* comme base de comparaison et de calcul des résultats. Si les résultats que donnent les deux témoins sont identiques, on devrait combiner les données fournies par les deux témoins avant de les utiliser pour calculer les résultats ou évaluer la validité de l'essai.

6.4.1 CL 50 ou CE 50

Lorsque l'on effectue un essai à plusieurs concentrations avec des mélanges de sol enrichi (§ 6.2), il faut utiliser les données quantiques sur la mortalité pour une période donnée d'exposition pour calculer (si les données le permettent) la *concentration létale médiane (CL 50)* appropriée ainsi que ses limites de confiance à 95 %. Dans un essai de létalité aiguë employant des vers de terre, on devrait déterminer, à l'aide de plusieurs concentrations, la CL 50 après 7 jours (c'est-à-dire fondée sur les données relatives à la mortalité au milieu de l'essai) et on doit déterminer la CL 50 après 14 j (à la fin de l'essai) [v. § 4.1.7]. Dans un essai visant à mesurer les effets de l'exposition prolongée de vers de terre à de multiples concentrations de sol enrichi, il faut calculer et signaler la CL 50 après 28 j chez les adultes (de première génération) si les données le permettent[87] (v. § 4.3.7).

Dans un essai de réaction aiguë d'évitement à plusieurs concentrations employant des vers de terre, il faut calculer la *concentration efficace médiane (CE 50)* [ainsi que ses limites de confiance à 95 %), si les données le permettent. Ce calcul se fonde sur le pourcentage de réactions d'évitement à chaque concentration (§ 4.2.7). Les conseils relatif au calcul de la CL 50, ci-après, s'appliquent également au calcul de la CE 50, auquel cas on devrait remplacer le mot *mortalité* par l'expression *évitement* et le mot *mortalités* par l'expression *réactions d'évitement*. Pour estimer la CL 50, on combine les données sur la mortalité à la période spécifiée d'exposition correspondant à toutes les répétitions de chaque concentration. Si la mortalité n'est pas d'au moins 50 % à au moins une concentration, on ne peut pas estimer la CL 50. S'il n'y a aucune mortalité à la concentration spécifiée, on interprète cela comme un effet de mortalité nulle (0 %). Cependant, si les concentrations successives donnent une série de mortalités nulles, seule la concentration maximale de la série devrait servir à estimer la CL 50 (c'est-à-dire l'effet nul le plus rapproché de la médiane de la distribution des données). De même, s'il y avait une série de mortalités complètes successives aux fortes concentrations employées dans l'essai, on n'utiliserait qu'une seule valeur correspondant à ce taux d'effet de 100 % , c'est-à-dire la concentration minimale. L'emploi de seulement une donnée correspondant à un effet nul et à un effet de 100 % s'applique à toute forme d'analyse statistique et à tout report des données sur un graphique.

Environnement Canada (2004b) donne des conseils sur le choix des méthodes d'analyse statistique à appliquer aux données quantiques (la CL 50 ou la CE 50), que l'on devrait consulter lorsque l'on choisit le test statistique à appliquer à de telles données pour les essais de toxicité employant des vers de terre. Les régressions probit et/ou logit sont les régressions de prédilection (EC, 2004b), à condition que les données comprennent au moins deux concentrations auxquelles correspondent des effets partiels. L'analyse par la méthode des probits donne également la pente de la droite, que l'on devrait signaler. Si la méthode des probits ou des logits ne fonctionne pas en raison d'une seule concentration à laquelle correspond un effet partiel, on utilise la méthode de Spearman-Kärber, sans élimination des valeurs aberrantes. Si aucun effet partiel n'est manifeste, on utilise la méthode binomiale. Comme l'estimation binomiale risque de différer quelque peu des autres, on ne devrait l'utiliser qu'en dernier recours. Avec la méthode binomiale, on n'estime pas les limites formelles de confiance ; on fournit plutôt les limites extérieures d'une fourchette à l'intérieur de laquelle se situeraient la CL 50 et les véritables limites de confiance.

On peut employer divers programmes informatiques pour calculer la CL 50. Stephan (1977) a créé un

87. Selon les objectifs de l'étude et le plan d'expérience connexe, un essai d'une durée de 8 semaines visant à mesurer les effets sur la survie, la reproduction et la croissance de vers de terre (*Eisenia sp.*) pourrait se concentrer sur les effets sublétaux. Dans ce cas, il pourrait ne pas comprendre un nombre suffisant de fortes concentrations (létales) qui permettraient le calcul de la CL 50 après 28 jours.

programme pour estimer les CL 50 à l'aide de la méthode des probits, de la moyenne mobile et de la méthode binomiale et il l'a adapté à l'ordinateur personnel compatible IBM. Ce programme, modifié en 1989 pour inclure les estimations selon la méthode de Spearman-Kärber sans suppression des résultats aberrants des calculs, est disponible sur disquette auprès d'Environnement Canada [89] (v. annexe C). On peut utiliser d'autres méthodes informatiques et manuelles satisfaisantes (par ex. SAS, 1988, ou la version 3.5 de TOXSTAT, 1996 ; v. EC, 2004b pour de plus amples renseignements). Pour les ordinateurs personnels, il existe des programmes utilisant la méthode de Spearman-Kärber avec suppression des données aberrantes ; cependant, d'après EC (2004b), on devrait appliquer avec prudence cette méthode (avec suppression des données aberrantes) aux estimations de la CL 50 (ou de la CE 50 ; v. § 4.2.7), parce que, si l'on connaît mal les conséquences de la suppression des données extrêmes de la relation concentration-réponse, on risque d'obtenir des résultats incohérents. Cependant, il existe des situations où l'application de la méthode de Spearman-Kärber avec suppression des données aberrantes est légitime (v. EC, 2004b, pour des conseils à cette fin).

On devrait vérifier toute CL 50 calculée par des moyens informatiques en examinant le graphique, aux échelles log-probit, des taux de mortalité à une période donnée d'exposition aux diverses concentrations (EC, 2004b). Il faut résoudre tout écart important entre la CL 50 estimée au moyen de ce graphique et la CL 50 calculée par des moyens informatiques. Pour cette vérification, il est recommandé d'utiliser un graphique tracé à la main (EC, 2004b). On pourrait utiliser un graphique produit par des moyens informatiques (par ex. SigmaPlot[MD] ; à partir de la version 8.0.2) [90] s'il était aux échelles log-probit (ou log-probabilité). Cependant, si une erreur a été faite dans la saisie des données, le graphique obtenu par des moyens informatiques reproduira la même erreur que l'analyse mathématique, de sorte que l'on doit vérifier rigoureusement la bonne disposition des points (EC, 2004b).

La figure 3 reproduit le graphique, établi à la main, des données montrant la relation entre la mortalité et la concentration pour estimer la CL 50. Cette figure (hypothétique) se fonde sur les concentrations d'essai de 1,8, 3,2, 5,6, 10 et 18 mg de substance par kilogramme (sec) de sol causant respectivement des taux de mortalité de 0, 20, 40, 90 et 100 % chez les organismes exposés pendant une période donnée. On peut trouver la concentration censée tuer la moitié des vers de terre en suivant le tireté horizontal à la hauteur de 50 % du taux de mortalité jusqu'à l'intersection de la droite de régression, d'où on suit le tireté vertical jusqu'à l'axe horizontal sur lequel on lit la valeur estimée de la CL 50 (5,6 mg/kg, poids sec).

Pour le tracé d'une ligne comme celle de la figure 3, on devrait surveiller davantage les points se trouvant près du taux de mortalité de 50 %. On peut se procurer du papier graphique log-probabilité (ou *log-probit*, comme dans la figure 3) dans les bonnes librairies techniques, en commander par leur entremise ou en tirer des photocopies (voir le graphique vierge dans EC, 2004b).

Pour l'ensemble régulier de données de la figure 3, les programmes informatiques ont donné des estimations très semblables à l'estimation graphique. Certaines des CL 50 calculées (et leurs limites de confiance à 95 %) ont été les suivantes :

Méthode de Stephan (1977) :

• probit :	5,58 (4,24 et 7,37)
• moyenne mobile :	5,58 (4,24 et 7,33)
• méthode binomiale :	6,22 (entre 1,8 et 10)

Analyse par la méthode des probits de SAS (1988) : 5,58 (4,26 et 7,40)

Méthode TOXSTAT (1996), version 3.5 :

• probit :	5,58 (4,38 et 7,12)
• Spearman-Kärber, sans suppression des valeurs aberrantes :	5,64 (4,40 et 7,23)
• logit :	5,63 (4,39 et 7,22)

Le tableau 4.2 dans EC (2004b) donne des exemples supplémentaires de résultats d'essais de mesure d'effets quantiques aigus, calculés à l'aide de divers programmes informatiques.

89. Grâce à la courtoisie du Dr Charles E. Stephan (USEPA, Duluth, MN).

90. Que l'on peut acheter de SYSTAT Software, Inc., 501, Canal Boulevard, Suite C, Point Richmond, CA 94804-2028, USA, tél. : 1-800-797-7401; v. le site Web www.systat.com/products/SigmaPlot/.

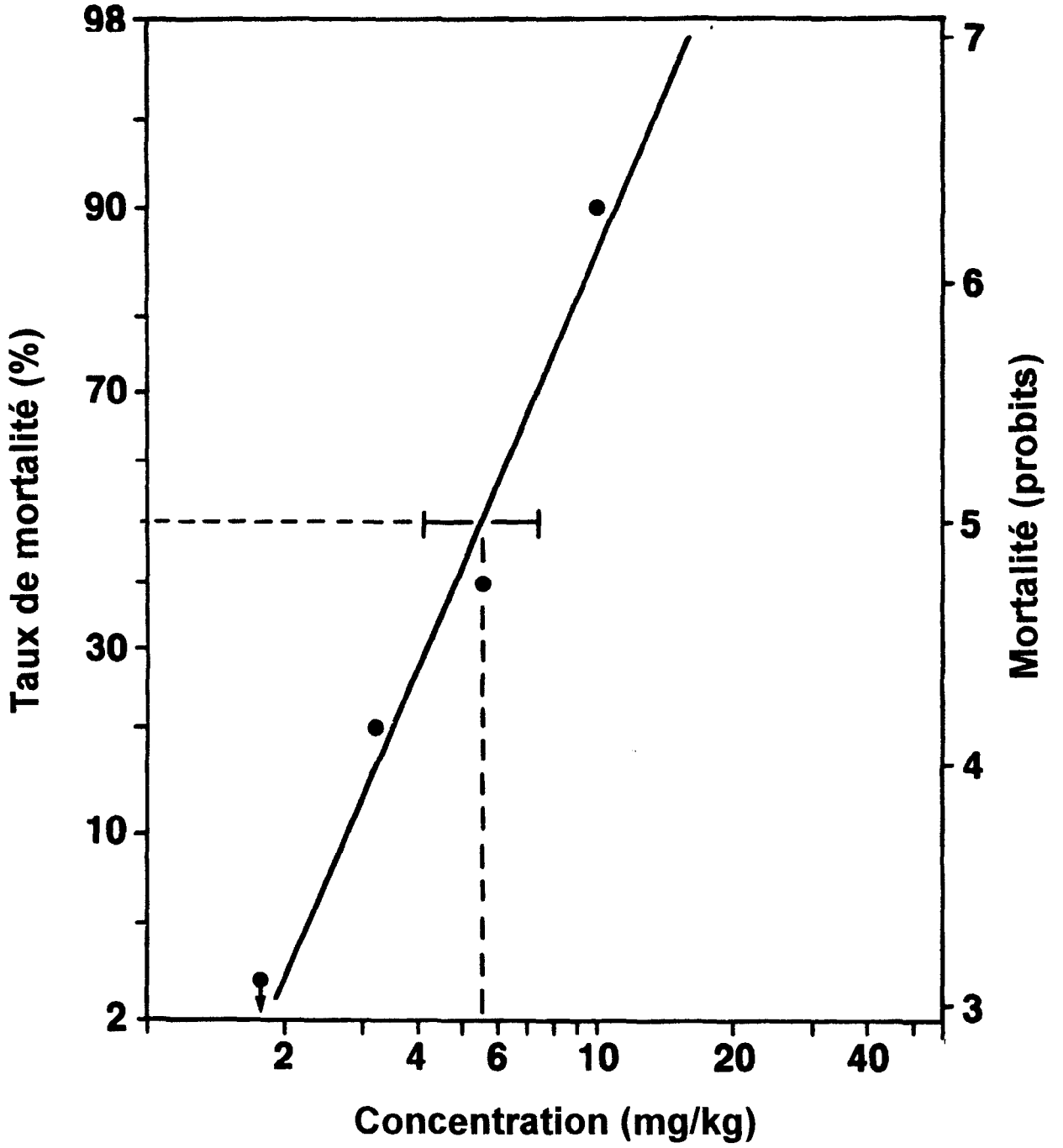


Figure 3. — Estimation de la concentration létale médiane par report des taux de mortalité sur papier graphique à échelle log-probabilité

6.4.2 Concentration inhibitrice CI p

Quand on réalise un essai à plusieurs concentrations pour mesurer les effets d'une exposition prolongée (56 jours) de vers de terre à des mélanges de sol enrichi, il faut utiliser les données *quantitatives* représentant l'inhibition de la reproduction et l'inhibition de la croissance pour calculer la *concentration inhibitrice à tel pourcentage d'effet* (*CI p*) pour chacun de ces effets mesurés, si les données le permettent (v. § 4.3.7 et 6.2). La CI p est une estimation quantitative de l'une des deux concentrations suivantes :

(1) la concentration causant un pourcentage fixe de réduction du nombre moyen de jeunes engendrés par les vers adultes pendant l'essai ;

(2) la concentration causant un pourcentage fixe de réduction du poids sec moyen des jeunes vers à la fin de l'essai.

Pour chaque effet mesuré on calcule cette concentration à un pourcentage spécifié d'inhibition (par ex. la CI 25 et/ou la CI 20, qui représentent une inhibition ou réduction de 25 et de 20 %, respectivement). La valeur *p* du pourcentage est choisie par le chercheur, et c'est le plus souvent 25 % ou 20 %. Il faut accompagner toute CI p calculée et signalée de ses limites de confiance à 95 %.

Dans les analyses de la performance reproductrice, on se sert du nombre de jeunes engendrés dans chaque enceinte (répétition) pour calculer le nombre moyen de jeunes survivants engendrés dans chaque variante expérimentale (à chaque concentration), relativement au nombre moyen engendré dans les répétitions des *témoins négatifs*. On attribue la valeur nulle (0) au nombre de jeunes dans une enceinte, si les vers adultes qui s'y trouvaient sont morts avant de se reproduire. Si l'un des vers adultes ou les deux sont morts pendant l'essai, après s'être reproduits, le nombre de jeunes engendrés continue de devoir être utilisé dans les analyses. Si, dans une enceinte, aucun jeune ne survit, la contribution de l'enceinte au calcul du nombre moyen de survivants, dans cette variante (concentration), est nulle. Si, à une concentration donnée, aucun jeune ne survit dans aucune des enceintes, cette concentration continue d'être incluse dans l'analyse, avec une valeur moyenne nulle de jeunes.

Le poids moyen d'un jeune ver dans chaque enceinte se calcule comme le poids sec total de jeunes ayant survécu dans l'enceinte divisé par le nombre de ces jeunes à la fin de l'essai (§ 4.3.7). On se sert des poids moyens de toutes les répétitions d'une variante (concentration) donnée pour calculer la moyenne correspondant à cette variante ; c'est-à-dire le poids sec moyen individuel des jeunes ayant survécu à chaque concentration. On compare cette moyenne au poids sec moyen individuel des vers du groupe *témoin négatif*, calculée selon la même méthode. Si, dans une répétition, aucun jeune n'a survécu, cette répétition ne contribue pas au calcul de la moyenne pour la variante expérimentale. Si aucun ver n'a survécu dans aucune répétition correspondant à une concentration donnée, il ne correspond, à cette concentration, aucun poids moyen des jeunes survivants qui pourrait servir à l'analyse pour la comparaison avec le poids moyen des vers du groupe témoin négatif.

Comme nous l'avons mentionné dans le § 4.3.7, il faut calculer des CI p séparés pour le nombre moyen de vers survivants engendrés dans une variante expérimentale donnée ainsi que leurs poids secs moyens et les signaler (si les données le permettent) à la fin d'un essai à plusieurs concentrations d'une durée de 56 jours avec *E. andrei*. Il faut faire ces calculs en employant les analyses de régression linéaires ou non linéaires appropriées (v. § 6.4.2.1). Si, cependant, les analyses de régression ne permettent pas de calculer de CI p significatives pour le nombre moyen de jeunes vivants engendrés et/ou leurs poids secs moyens, on devrait appliquer aux données correspondantes les analyses au moyen du programme ICPIN décrites au § 6.4.2.2.

6.4.2.1 Emploi de la régression. — À la fin d'un essai définitif à plusieurs concentrations d'une durée de 56 jours (ou, dans certains cas, de 63 jours) employant *E. andrei*, il faut calculer des CI p séparées (y compris leurs limites respectives de confiance à 95 %) pour le nombre moyen de jeunes vers survivants engendrés dans chaque variante expérimentale ainsi que la moyenne de leurs poids secs individuels, à l'aide de méthodes de régression linéaire et/ou non linéaire. On peut calculer ces valeurs à l'aide d'une série de modèles de régression linéaire et non linéaire (si les données le permettent) proposés par Stephenson *et al*. (2000b), qui ont été reparamétrés d'après les techniques appliquées par van Ewijk et Hoekstra (1993), pour produire automatiquement la CI p et ses limites de confiance à 95 % pour toute valeur de *p* (par ex. 25 ou 50 pour la CI 25 ou la CI 50). Les modèles proposés pour l'application consistent en un modèle linéaire et en les quatre modèles suivants de régression non linéaire : exponentiel, de Gompertz, logistique, hormétique (ou

hormético-logistique, c'est-à-dire logistique ajusté à l'hormèse[90]). Stephenson (2003a) ainsi que Stephenson *et al*. (2000b) donnent d'autres conseils sur l'emploi de ces modèles de régression linéaire et non linéaire pour le calcul des CI p. Nous conseillons fortement le lecteur de consulter EC (2004b) pour obtenir des conseils supplémentaires sur l'application générale de la régression linéaire et non linéaire à l'analyse des données toxicologiques quantitatives. Dans l'annexe J, on donne des instructions sur la bonne application de la régression linéaire et non linéaire à l'aide de la version 11.0 du programme statistique SYSTAT[91]. Cependant, on peut utiliser tout logiciel statistique capable d'effectuer des régressions linéaire et non linéaire pour le calcul des CI p respectives et leurs limites de confiance à 95 %. L'annexe J donne des consignes sur l'emploi des modèles de régression pour calculer les CI p les plus appropriées quand on dispose d'un effectif réduit de la progéniture survivante et d'un poids sec moyen réduit pour cette dernière.

Voici la présentation des cinq modèles dont on recommande l'application. D'autres renseignements sur ces modèles se trouvent dans l'annexe J.

Modèle exponentiel : $Y = a \times (1 - p)^{(C \div CI\ p)}$

où :

- Y = l'effectif ou la masse de la progéniture ;
- a = l'ordonnée à l'origine (c'est-à-dire la réaction des organismes témoins) ;
- p = la valeur choisie de *p* (par ex. 0,25 pour un taux d'inhibition de 25 %) ;
- C = le logarithme de la concentration d'essai ;
- CI p = la CI p pour l'ensemble de données.

M. de Gompertz : $Y = t \times \exp[\log(1 - p) \times (C \div CI\ p)^b]$

où :

- Y = l'effectif ou la masse de la progéniture ;
- t = l'ordonnée à l'origine (c'est-à-dire la réaction des organismes témoins) ;
- p = la valeur choisie de *p* (par ex. 0,25 pour un taux d'inhibition de 25 %) ;
- C = le logarithme de la concentration d'essai ;
- CI p = la CI p pour l'ensemble de données ;
- b = un paramètre d'échelle (estimé valoir entre 1 et 4) définissant la forme de l'équation.

M. hormétique : $Y = t \times [1 + h \times C] \div \{1 + [(p + h \times CI\ p) / (1 - p)] * (C/CI\ p)^b\}$

où :

- Y = l'effectif ou la masse de la progéniture ;
- t = l'ordonnée à l'origine (i.e, la réaction des organismes témoins) ;
- h = descripteur de l'effet hormétique (estimé petit, habituellement entre 0,1 et 1) ;
- C = le logarithme de la concentration d'essai ;
- p = la valeur choisie de *p* (par ex. 0,25 pour un taux d'inhibition de 25 %) ;
- CI p = la CI p pour l'ensemble de données ;
- b = un paramètre d'échelle (estimé valoir entre 1 et 4) définissant la forme de l'équation.

Modèle linéaire : $Y = [(- b \times p) \div CI\ p] \times C + b$

où :

- Y = l'effectif ou la masse de la progéniture ;
- b = l'ordonnée à l'origine (c'est-à-dire la réaction des organismes témoins) ;
- p = la valeur choisie de *p* (par ex. 0,25 pour un taux d'inhibition de 25 %) ;
- CI p = la CI p pour l'ensemble de données ;
- C = le logarithme de la concentration d'essai.

M. logistique : $Y = t \div \{1 + [p \div (1 - p)] \times (C \div CI\ p)^b\}$

où :

- Y = l'effectif ou la masse de la progéniture ;
- t = l'ordonnée à l'origine (i.e, la réaction des organismes témoins) ;
- p = la valeur choisie de *p* (par ex. 0,25 pour un

90. L'hormèse peut se manifester aux concentrations sublétales les plus faibles, les performances du groupe exposé y étant augmentées (par ex. progéniture plus nombreuse ou, encore, poids individuels supérieurs) par rapport à celles du groupe témoin négatif. Cela n'est pas un défaut de l'essai, mais un véritable phénomène biologique. Pour calculer alors la CI p, il faudrait analyser les données à l'aide du modèle d'hormèse. Les effets hormétiques, pris en compte par la régression, n'introduisent pas d'erreur systématique dans l'estimation de la CI p. La CI 25 estimée continue de traduire une réduction de 25 % des performances par rapport à celles du témoin.

91. On peut acheter la version la plus récente (11.0) de SYSTAT™ auprès de SYSTAT Software, Inc., 501, Canal Boulevard, Suite C, Point Richmond, CA 94804-2028, USA, tél. : 1-800-797-7401; voir le site Web www.systat.com/products/Systat/.

taux d'inhibition de 25 %) ;
C = le logarithme de la concentration d'essai ;
CI p = la CI p pour l'ensemble de données ;
b = un paramètre d'échelle (estimé valoir entre 1 et 4) définissant la forme de l'équation.

Dans la figure 4, on expose l'organigramme général de l'analyse statistique et du choix du modèle de régression qui convient le mieux (linéaire ou non linéaire) aux données toxicologiques quantitatives. La sélection débute par l'examen du nuage de points ou du graphique linéaire correspondant aux données expérimentales, pour déterminer l'allure de la courbe concentration-réponse. On compare ensuite l'allure de la courbe aux modèles disponibles, en retenant, pour examen approfondi, un ou plusieurs modèles appropriés, les mieux conformes aux données (v. fig. J.1, annexe J, pour la représentation des cinq modèles potentiels).

Une fois le ou les modèles appropriés retenus en vue de l'examen approfondi, on évalue les hypothèses relatives à la normalité et à l'*homoscédasticité* des *résidus.* Si, pour un ou plusieurs des modèles examinés, la régression satisfait les hypothèses, on examine les données (et la régression) pour y trouver des valeurs aberrantes. Si on en trouve, on devrait examiner la possibilité d'erreur humaine dans le procès-verbal de l'essai et les conditions expérimentales. S'il se trouve une ou plusieurs valeurs aberrantes, on devrait effectuer l'analyse avec et sans ces valeurs et comparer les résultats des analyses pour examiner l'effet des valeurs aberrantes sur la régression. Ensuite, il faut décider s'il faut soustraire la ou les valeurs aberrantes à l'analyse finale. Pour cette décision, on devrait prendre en considération la variabilité biologique naturelle et les éventuelles causes biologiques de l'anomalie apparente. Dans l'annexe J (§ J.2.4) et dans EC (2004b), on trouve des conseils supplémentaires sur la présence de valeurs aberrantes et d'observations inhabituelles. Si aucune valeur aberrante n'est présente ou si on n'en soustrait aucune à l'analyse finale, le modèle qui présente la plus petite moyenne des carrés des erreurs résiduelles est retenu comme modèle optimal. On conseille aussi de consulter un statisticien qui connaît bien la façon de traiter les données aberrantes.

On devrait évaluer la normalité à l'aide du *test de Shapiro-Wilk,* décrit dans EC (2004b). Pendant la régression, on peut également utiliser un graphique de probabilité normale des résidus, mais cela n'est pas conseillé comme test autonome de la normalité, puisque l'évaluation de la normalité ou non d'une distribution relève de la subjectivité de l'utilisateur. Si la distribution des données n'obéit pas à la loi normale, on devrait essayer un autre modèle, consulter un statisticien pour obtenir un avis supplémentaire sur le modèle à retenir ou effectuer la méthode d'analyse moins souhaitable qu'est l'interpolation linéaire (à l'aide du programme ICPIN, v. § 6.4.2.2).

On devrait évaluer l'homoscédasticité des résidus à l'aide du *test de Levene,* décrit dans EC (2004b) et par la comparaison des graphiques des résidus aux valeurs réelles et prévues (estimées). Le test de Levene donne une indication nette de l'homogénéité (par ex. comme dans la fig. J.2A de l'annexe J) ou non des données. Si (d'après le test de Levene) les données sont *hétéroscédastiques* (c'est-à-dire non homogènes), il faudrait examiner les graphiques des résidus. Si la variance subit une modification importante et si les graphiques des résidus épousent nettement la forme d'un éventail ou d'un fuseau (cf. la fig. J.2B, annexe J), il faudrait répéter l'analyse des données au moyen d'une régression pondérée. Avant de retenir la régression pondérée, on compare l'erreur-type de la CI p à celle que l'on obtient par régression non pondérée. Si la différence entre les deux erreurs-types excède 10 % [92], on retient comme choix optimal la régression pondérée. Cependant, si l'écart est inférieur à 10 %, on devrait consulter un statisticien sur l'application de modèles supplémentaires, compte tenu des données expérimentales. On pourrait également analyser de nouveau les données en utilisant la méthode d'analyse moins souhaitable qu'est l'interpolation linéaire (au moyen du programme ICPIN, v. § 6.4.2.2). On effectue cette comparaison entre la régression pondérée et la non pondérée, pour chacun des modèles retenus, pendant que l'on s'engage dans la sélection finale du modèle (c'est-à-dire du meilleur modèle et de la meilleure régression). Certaines formes non divergentes du nuage de points pourraient révéler un modèle inadapté ou erroné (cf. fig. J.2C, annexe J), et, de nouveau, il est conseillé d'obtenir l'avis d'un statisticien sur l'application de

92. La valeur de 10 % est purement empirique. Des tests permettent de juger objectivement de l'amélioration due à la pondération, mais ils dépassent notre propos. On ne devrait recourir à la pondération qu'en cas de nécessité, l'opération risquant de compliquer davantage la modélisation. Quand la pondération est nécessaire, on devrait consulter un statisticien.

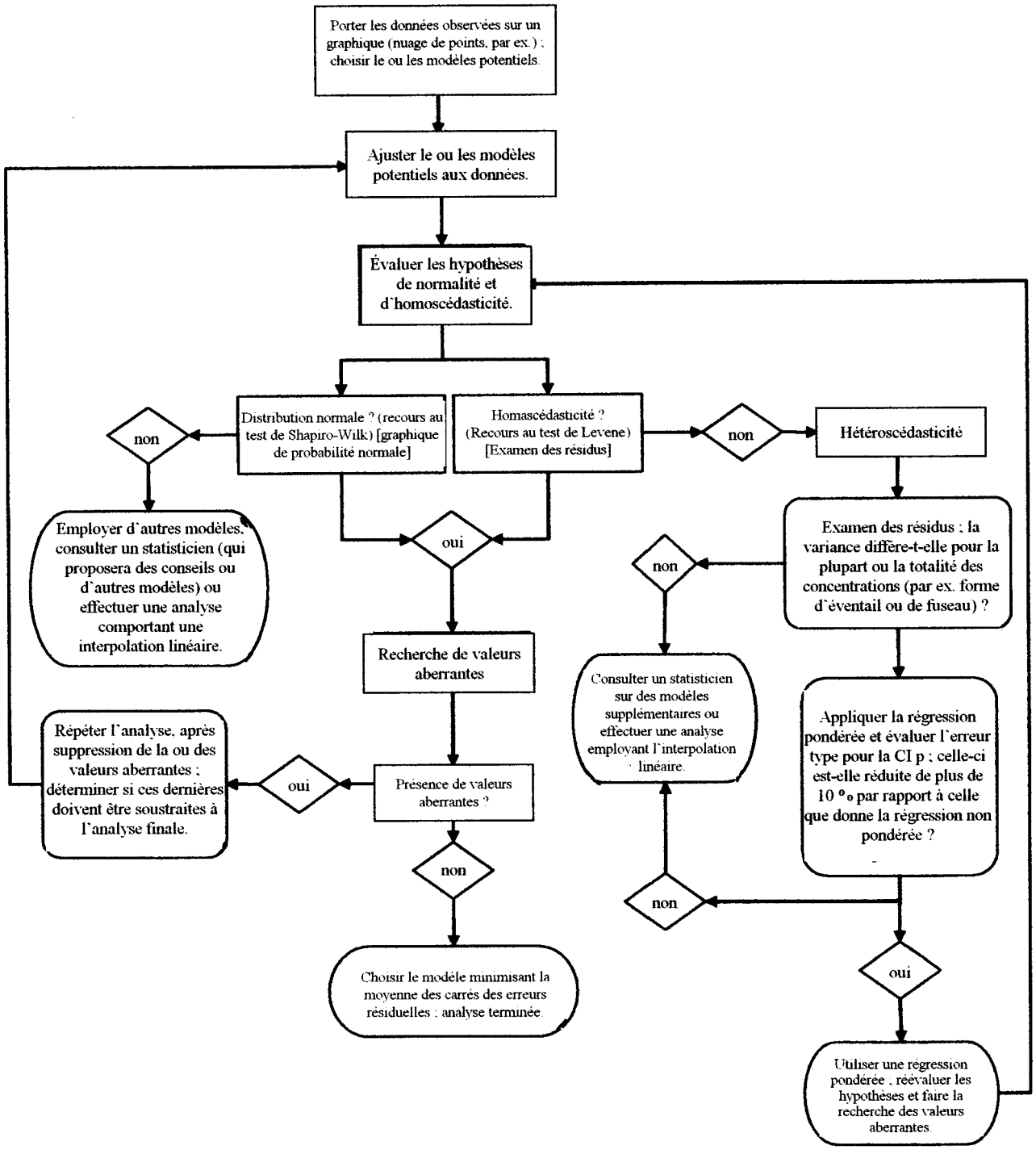


Figure 4. — Processus général de l'analyse statistique et de la sélection du modèle convenant le mieux aux données quantitatives sur la toxicité (adapté et modifié d'après Stephenson *et aL*, 2000b)

modèles supplémentaires.

6.4.2.2 Interpolation linéaire au moyen du programme ICPIN. — Si les régressions des données relatives aux effets mesurés (v. § 6.4.2.1) n'aboutissent pas à une CI p acceptable pour l'inhibition de la croissance et/ou de la reproduction, on devrait appliquer l'interpolation linéaire au moyen du programme informatique dit *ICPIN*. Ce programme (Norberg-King, 1993 ; USEPA, 1994b, 1995) est libre de droits, on peut se le procurer par le truchement de l'USEPA, et il fait partie de la plupart des logiciels employés en écotoxicologie, y compris TOXSTAT. Les instructions d'origine du programme ICPIN dues à l'USEPA sont claires et facilitent l'emploi du programme (Norberg-King, 1993) [93]. Une version antérieure du programme s'appelait BOOTSTRP.

L'analyse par le programme ICPIN n'exige pas des nombres égaux de répétitions aux différentes concentrations. On estime la CI p par lissage des données, au besoin, puis utilisation des deux données encadrant la CI p choisie (USEPA, 1994b, annexe L ; USEPA, 1995, annexe L). Pour calculer la CI p, des concentrations d'essai doivent lui être inférieure et supérieure ; ces deux concentrations devraient agir assez près de la valeur choisie de *p*, de préférence à moins de 20 % de distance. Actuellement, le programme n'emploie pas l'échelle logarithmique des concentrations, de sorte que ses utilisateurs canadiens doivent saisir les concentrations sous forme de logarithmes. Certains progiciels du commerce possèdent, comme option générale, la transformation logarithmique, mais on devrait s'assurer que les chiffres ainsi calculés sont effectivement retenus lorsque l'on applique le programme ICPIN. Ce dernier estime les limites de confiance par une technique particulière dite *« bootstrap »*, parce que les méthodes usuelles ne sont pas valides. Cette technique effectue de nombreux rééchantillonnages dans les mesures originelles. On peut spécifier le nombre de rééchantillonnages, qui peut varier de 80 à 1 000. Nous en recommandons au moins 400, et 1 000 seraient avantageux [94].

Si plusieurs concentrations élevées et contiguës n'ont permis la survie d'aucun jeune, seule la concentration minimale de cette série est utilisée dans l'analyse (c'est-à-dire la concentration la plus rapprochée de la médiane de la série de concentrations utilisées dans l'essai). Normalement, l'ajout de concentrations supplémentaires ne procure aucun avantage particulier, parce que ces concentrations n'offrent rien à l'analyse (c'est-à-dire que les données ne consistent qu'en un effectif nul de la progéniture pour laquelle on ne possède aucun poids moyen).

Outre la détermination et le signalement de CI p calculées par des moyens informatiques relativement à la reproduction et au poids des jeunes vers à la fin de l'essai, on devrait tracer le graphique du taux de réduction du nombre de jeunes engendrés qui sont vivants ou du taux de réduction du poids sec en fonction du logarithme des concentrations, pour vérifier les estimations mathématiques et procurer une estimation visuelle de la nature des données (EC, 2004b).

Si le programme ICPIN est appliqué à des données révélant un effet hormétique, un lissage inhérent des données pourrait modifier la valeur correspondant au témoin et décaler l'estimation de la CI p. En conséquence, avant d'appliquer l'analyse statistique, on devrait arbitrairement remplacer par la valeur témoin les valeurs hormétiques correspondant aux faibles concentrations. On considère cela comme un expédient temporaire, tant qu'une méthode supérieure ne sera pas établie (EC 2004b). La correction est appliquée à toute concentration d'essai dont l'effet moyen correspondant (c'est-à-dire la moyenne géométrique des moyennes des répétitions) est supérieur (« meilleur ») à la moyenne du témoin. Pour appliquer cette correction, on remplace les poids moyens observés (ou l'effectif moyen de la

93. Les instructions de Norberg-King (1993) entraînent parfois la confusion relativement à l'identité des *« replicates »*, terme employé de manière à s'appliquer à des nombres ou à des masses (poids) d'organismes individuels se trouvant dans la même enceinte expérimentale. Ce lapsus ne nuit pas au fonctionnement du programme. Certains programmes du commerce ont été moins conviviaux pour la saisie et l'analyse des données.

94. Le programme ICPIN souffre de certaines lacunes, ce qui explique pourquoi on ne le recommande que dans les cas où la régression ne donne pas une CI p acceptable. Employant les données de façon inefficace, sa méthode d'interpolation est sensible aux particularités des deux concentrations utilisées. Parce qu'il n'utilise pas le logarithme de la concentration, le programme favorise systématiquement une valeur majorée de la CI p. Malgré une modification de la méthode *« bootstrap »* qui remédie désormais au problème des limites de confiance excessivement étroites, les régressions estiment cependant mieux la CI p et ses limites de confiance à 95 % (EC, 2004b) [v. § 6.4.2.1].

progéniture) dans les répétitions correspondant à la concentration ou aux concentrations hormétiques par la moyenne des répétitions du témoin. La moyenne géométrique de cette ou de ces concentrations sera alors identique à celle du témoin.

Rapports à produire

Dans le rapport sur chaque essai, il faut préciser si on s'est écarté des exigences énoncées dans les sections 2 à 6 et, le cas échéant, fournir des détails sur ces écarts. Le lecteur doit pouvoir juger si, grâce aux conditions et aux modes opératoires s'appliquant avant et pendant l'essai, les résultats sont valides et acceptables pour l'usage qu'il entend en faire.

Dans le § 7.1, nous énumérons les points (renseignements) à intégrer dans le rapport sur chaque essai et, dans le § 7.2, les renseignements soit à intégrer dans de rapport, soit à communiquer séparément dans un rapport général, soit à archiver pour au moins cinq années. Certains programmes de surveillance, les protocoles connexes d'essai ou des règlements pourraient exiger de faire figurer dans le rapport sur l'essai certains des renseignements particuliers que l'on énumère dans le § 7.2 (par ex. des détails sur les matières étudiées ou sur les modes opératoires et les conditions explicites ayant coïncidé avec le prélèvement des échantillons, leur manipulation, leur transport ou leur entreposage) ou de les reléguer à l'*archivage.*

À l'égard de certains modes opératoires et conditions communs à une série d'essais courants (par ex. des essais de toxicité réguliers ou des essais de contrôle de la conformité aux règlements) et correspondant aux exigences énoncées dans le présent document, on peut renvoyer à un rapport général ou joindre ce dernier. Dans ce rapport, on expose dans ses grandes lignes la pratique ordinairement suivie en laboratoire.

On doit archiver, au laboratoire, pour au moins cinq ans, les détails se rapportant aux modes opératoires, aux conditions et aux constatations de l'essai, qui ne sont pas reproduits dans le rapport sur l'essai ni dans le rapport général, de sorte que l'on peut fournir l'information convenable si l'essai doit faire l'objet d'une vérification (audit). L'information archivée pourrait comprendre les renseignements suivants :

- l'enregistrement de la chaîne de transmission des échantillons prélevés sur le terrain et des autres échantillons analysés dans un dessein de surveillance ou d'application des règlements ;
- copie du dossier d'acquisition de l'échantillon ou des échantillons ;
- les résultats d'analyses chimiques de l'échantillon ou des échantillons ne figurant pas dans le rapport sur l'essai ;
- les notes d'observations et de mesures en laboratoire enregistrées pendant l'essai ;
- les notes de laboratoire et les cartes de contrôle portant sur les essais de toxicité de référence ;
- les dossiers détaillés concernant l'origine des organismes d'expérience, la confirmation de leur taxinomie et tous les renseignements utiles sur leur élevage et/ou leur entretien et leur acclimatation ainsi que leur état de santé ;
- des renseignements sur l'étalonnage de l'équipement et des appareils.

Le personnel de laboratoire effectuant les essais doit signer ou parafer l'original des feuilles de données.

7.1 Exigences minimales pour le rapport sur l'essai

Voici la liste des renseignements à intégrer dans chaque rapport.

7.1.1 Substance ou matière à l'étude

- une description succincte du type d'échantillon (par ex. boue d'épuration, sol de référence ou sol contaminé, prélevé sur le terrain, sol témoin négatif) ou le code attribué à l'échantillon par le personnel du laboratoire ;
- des renseignements sur l'étiquetage ou le codage de chaque échantillon ;
- la date du prélèvement de chaque échantillon ; la date et l'heure de sa réception au laboratoire.

7.1.2 Organismes utilisés

- l'espèce et l'origine des géniteurs et des organismes d'expérience ;
- le poids frais (moyenne ± écart-type) au début de l'essai ;

- tout aspect, comportement ou traitement inhabituel des organismes avant leur emploi dans l'essai.

7.1.3 Installations expérimentales

- les nom et adresse du laboratoire ;
- le nom de la personne ou des personnes exécutant l'essai (ou chacun de ses éléments).

7.1.4 Méthode d'essai

- la désignation de la méthode d'essai biologique utilisée (c'est-à-dire conformément au présent document) ;
- le plan d'expérience et la description du mode opératoire, s'il comporte des manipulations spéciales (par ex. préparation de mélanges de sol enrichi ; préparation et emploi de solvant et, dans ce cas, du témoin du solvant) ou modification(s) de la méthode normalisée décrite dans le présent document ;
- une courte description de la fréquence et de la nature de toutes les observations et mesures effectuées pendant l'essai ;
- le titre et la désignation des programmes et des méthodes de calcul des paramètres statistiques.

7.1.5 Conditions expérimentales et modes opératoires

- le plan et la description de tout écart par rapport aux conditions et aux modes opératoires exposés dans le présent document ou de toute exclusion de ces conditions et modes opératoires ;
- le nombre d'échantillons discrets par variante expérimentale ; le nombre d'enceintes expérimentales (répétitions) par variante expérimentale ; le nombre et la description de chaque variable expérimentale, y compris le ou les témoins ; les concentrations d'essai (s'il y a lieu) ;
- le volume de sol dans chaque enceinte expérimentale ;
- le nombre d'organismes par enceinte et par variante expérimentale ;
- les dates du début et de la fin de l'essai ;
- le régime alimentaire et la ration, dans le cas de l'essai d'une durée de 56 jours ;
- la date du retrait des adultes des enceintes, dans l'essai d'une durée de 56 jours (ou plus) ;
- à l'égard de chaque échantillon de sol, toutes les mesures de la granulométrie, de l'humidité, de la capacité de rétention en eau et du pH ;
- à l'égard de chaque échantillon composé de sous-échantillons prélevés en même temps dans toutes les répétitions de chaque variante expérimentale, toutes les mesures de la température, du pH, de l'humidité et de la capacité de rétention en eau.

7.1.6 Résultats

- *d'un essai de létalité aiguë :* la moyenne (± l'écart-type) du taux de survie dans chaque variante expérimentale, aux jours 0, 7 (le cas échéant) et 14 ;
- *d'un essai de réaction aiguë d'évitement :* le nombre moyen (± l'écart-type) de vers survivants dans les répétitions de chaque variante expérimentale représentant du sol *non contaminé* et du sol à l'étude, à 48 h, dans le cas d'*E. andrei* ou d'*E. fetida* ou à 72 h, dans le cas de *L. terrestris* ;
- *d'un essai de mesure des effets d'une exposition prolongée :* le taux moyen (± l'écart type) de survie des vers adultes dans chaque variante expérimentale, au jour 28 ; le nombre moyen (± l'écart-type) de jeunes survivants dans chaque variante expérimentale, au jour 56 ; le poids sec moyen individuel (± l'écart-type) des jeunes vers survivant dans chaque variante expérimentale, au jour 56 ; le nombre moyen (± l'écart-type) de jeunes vers survivants engendrés par chaque ver adulte, dans le *sol témoin négatif* (et dans le *sol témoin positif* et/ou le *sol témoin du solvant*, le cas échéant), au jour 56 ;
- toute CL 50 ou CE 50 (y compris leurs limites de confiance à 95 % et, si on l'a calculée, la pente) que l'on a déterminée ; toute CL x ou CE x (par ex. la CL 20 ou la CE 20) que l'on a calculée ;
- toute CI p (y compris ses limites de confiance à 95 %) que l'on a déterminée pour les données relatives à la réussite de la reproduction (c'est-à-dire le nombre de jeunes vers survivants, dans chaque variante expérimentale, à la fin de l'essai) ; toute CI p (et ses limites de confiance à 95 %) que l'on a déterminée pour les données sur la croissance (c'est-à-dire le poids sec de chaque jeune ver survivant à l'essai) ; les détails concernant toute transformation des données et l'indication des méthodes statistiques quantitatives utilisées ou des modes opératoires appliquées aux

données ;

- à l'égard d'un essai à plusieurs concentrations employant un sol additionné d'une substance, l'indication selon laquelle les résultats se fondent sur des concentrations nominales ou mesurées d'une ou de substances ou de produits chimiques ; toutes les valeurs des concentrations mesurées ;
- les résultats de toute détermination de la CL 50 après 7 jours (et ses limites de confiance à 95 %) au moyen du toxique de référence, conjointement avec l'essai définitif de toxicité du sol, employant le même lot d'organismes ; la *moyenne géométrique* (± 2 écarts-types) calculée pour le même toxique de référence et la même espèce, dans le laboratoire, à la faveur de mesures antérieures de la CL 50 après 7 jours fondées sur les modes opératoires et les conditions des essais de toxicité de référence décrits dans le présent document ;
- toute anomalie dans le déroulement de l'essai, tout problème observé et toute mesure corrective prise.

7.2 Exigences supplémentaires

Voici la liste des renseignements qu'il faut soit faire figurer dans le rapport sur l'essai ou le rapport général ou, encore, qu'il faut archiver pour au moins cinq années.

7.2.1 Substance ou matière étudiée

- le nom des préleveurs et/ou des fournisseurs de l'échantillon ;
- l'enregistrement de la chaîne de transmission de l'échantillon et les fiches d'inscription de ce dernier ;
- l'état (par ex. température, conservation à l'obscurité, dans un récipient scellé) de l'échantillon à sa réception et pendant l'entreposage.

7.2.2 Organismes employés

- le nom de la personne ou des personnes ayant identifié les organismes et les lignes directrices taxinomiques utilisées pour en confirmer l'espèce ;
- les antécédents et l'âge des reproducteurs pour tout élevage ayant fourni des organismes ;
- la description des conditions et des modes opératoires d'élevage, y compris la température, l'éclairage, le type et la quantité de substrat ainsi que les détails sur son renouvellement périodique, les mesures de sa qualité, la densité de chargement des vers, le régime alimentaire ainsi que la quantité de nourriture, les registres de santé et les indices de performance ;
- l'historique de toute population d'organismes obtenus de l'extérieur, y compris les particularités concernant la ou les périodes d'entretien ou d'acclimatation avant leur emploi dans l'essai, le type et la quantité de substrat et les détails sur son renouvellement périodique, les mesures de la qualité du substrat, la densité de chargement des vers, le régime et la quantité de nourriture, les enregistrements de santé et les indices de performance ;
- les modes opératoires des dénombrements, de la manipulation, du tri et du transfert des animaux ; ceux qui ont servi à déterminer leur mortalité, leur état, leur aspect et leur comportement ;
- l'origine et la composition de la nourriture, les méthodes utilisées pour la préparation et la conservation des aliments, les méthodes d'alimentation, la fréquence des repas et les rations données.

7.2.3 Installations et appareillage expérimentaux

- tous les résultats des essais initiaux avec le sol témoin négatif et le toxique de référence, entrepris par le laboratoire jusqu'alors inexpérimenté dans la réalisation des méthodes d'essai biologique décrites dans le présent document, préalablement à la communication de tout résultat d'essais définitifs (v. § 3.1.1).
- la description des systèmes d'éclairage et de la régulation de la température, dans le laboratoire d'essais ;
- la description des enceintes expérimentales et de pellicules les recouvrant ;
- la description des modes opératoires du nettoyage ou du rinçage de l'appareillage expérimental.

7.2.4 Sol témoin négatif ou sol de référence

- les modes opératoires de la préparation (dans le cas du sol artificiel) ou du *prétraitement* (dans le cas du sol naturel) du *sol témoin négatif ;*
- la source du sol naturel ; l'historique des utilisations et les dossiers d'analyse des pesticides ou d'autres contaminants ;
- la formulation du sol artificiel, y compris les sources

de ses constituants ainsi que les conditions et modes opératoires de son hydratation et de l'ajustement de son pH ;

- les conditions et la durée d'entreposage avant emploi.

7.2.5 Méthode d'essai

- les modes opératoires utilisés pour le mélange ou les autres manipulations des sols à l'étude, avant leur emploi ; le délai entre la préparation et l'essai ;
- le mode opératoire utilisé dans la préparation des solutions mères et/ou filles (d'essai) de substances chimiques ; la description et la ou les concentrations de tout solvant utilisé ;
- les détails concernant l'échantillonnage de parties aliquotes, leur préparation et leur entreposage avant l'analyse physicochimique ainsi que tout renseignement disponible concernant les méthodes d'analyse utilisées (avec leur désignation) ;
- l'utilisation et la description des essais préliminaires ou des essais de recherche de la gamme de concentrations à utiliser.

7.2.6 Conditions expérimentales et modes opératoires

- les mesures de l'intensité de l'éclairage à la surface du sol dans les enceintes expérimentales ;
- le mode opératoire de l'introduction des organismes dans les enceintes ;
- l'aspect de chaque échantillon (ou de chaque mélange d'échantillons) dans les enceintes ; son évolution observée pendant l'essai ;
- l'enregistrement de chaque pulvérisation d'eau d'essai à la surface du sol de chaque enceinte pendant l'essai d'une durée de 8 semaines, pour en accroître l'humidité ;
- toute autre mesure physicochimique (par ex. les analyses d'aliquotes du même *lot* pour déterminer la conductivité, l'homogénéité, la concentration de contaminant[s], les matières volatiles totales, la demande biochimique d'oxygène, la demande chimique d'oxygène, le carbone inorganique total, la capacité d'échange cationique, le potentiel d'oxydoréduction, l'azote total) effectuée avant et pendant l'essai sur la matière à l'étude (y compris le *sol témoin négatif* et le *sol de référence*) ainsi que sur le contenu des enceintes, notamment les analyses du sol entier et de l'eau de porosité ;
- toute autre observation ou analyse effectuée sur la matière à l'étude (y compris sur des échantillons de *sol témoin négatif* ou de *sol de référence*) ; par ex. les données qualitatives et/ou quantitatives concernant la faune macroscopique indigène ou les détritus ou, encore, les résultats des analyses géochimiques ;
- tout dosage de la ou des solutions mères de toxiques de référence et, le cas échéant, les concentrations d'essai.

7.2.7 Résultats de l'essai

- les résultats d'essais de recherche de la gamme de concentrations à utiliser ;
- *dans l'essai de létalité aiguë :* le taux de survie des vers dans chaque enceinte expérimentale, aux jours 0, 7 (le cas échéant) et 14 ;
- *dans l'essai de réaction aiguë d'évitement :* le nombre total de vers survivants dans le sol *non contaminé* et dans le sol à l'étude, dans chaque enceinte, à 48 h dans le cas d'*E. andrei* ou d'*E. fetida*, ou à 72 h, dans le cas de *L. terrestris* ;
- *dans l'essai d'une durée de 8 semaines :* le nombre de vers adultes survivants dans chaque enceinte, au jour 28 ; le nombre de jeunes survivants dans chaque enceinte, au jour 56 ; le poids sec collectif et le poids sec individuel moyen des jeunes vers survivants dans chaque enceinte, au jour 56 ; pour les besoins des régressions, l'archivage de renseignements sur la taille des échantillons (par ex. le nombre de répétitions dans chaque variante expérimentale), l'estimation des paramètres et de leur variance, tout tableau d'analyse de variance produit, les graphiques des valeurs ajustées et observées de tout modèle utilisé et les résultats obtenus grâce au programme statistique (par ex. SYSTAT) ;
- une carte de contrôle montrant les résultats les plus récentes et les antécédents des essais de toxicité aiguë au moyen du toxique de référence ;
- les résultats de l'essai ou des essais d'une durée de 8 semaines effectués avec un toxique de référence ;
- la présentation graphique des données ;
- les notes originales de laboratoire et les autres feuilles de données, signées et datées par le personnel de laboratoire ayant effectué l'essai et les analyses connexes.

Références

ACECSS (Agriculture Canada Expert Committee on Soil Survey = Comité d'experts sur la prospection pédologique), *Le système canadien de classification des sols*, publ. 1646, 2e édition, ISBN 0-660-12460-2, Direction générale de la recherche, Agriculture Canada, Ottawa (1987).

AESA (Alberta Environmentally Sustainable Agriculture Program), *AESA Soil Quality Benchmark Study — Soil Organic Matter*, fiche d'information FS2001-ISQ, 4 p., AESA Soil Quality Program, Conservation and Development Branch, Alberta Agriculture, Food and Rural Development, Edmonton, Alberta (2001).

Aquaterra Environmental, *Development of Earthworm Toxicity Tests for Assessment of Contaminated Soils*, rapport préparé par Aquaterra Environmental, Ltd. (Orton, Ont.) pour la Section de l'élaboration et de l'application des méthodes, Environnement Canada, Ottawa (1998a).

———, *Development of a Reproduction Toxicity Test with* Onychiurus folsomi *for Assessment of Contaminated Soils*, rapport préparé par Aquaterra Environmental, Ltd. (Orton, Ont) pour la Section de l'élaboration et de l'application des méthodes, Environnement Canada, Ottawa (1998b).

———, *Development of Plant Toxicity Tests for Assessment of Contaminated Soils*, rapport préparé par Aquaterra Environmental, Ltd. (Orton, Ont.) pour la Section de l'élaboration et de l'application des méthodes, Environnement Canada, Ottawa (1998c).

Aquaterra Environmental, données non publiées, obtenues par Aquaterra Environmental, Ltd. (Orton, Ont.) pour la Section de l'élaboration et de l'application des méthodes, Environnement Canada, Ottawa (2001).

Aquaterra Environmental et ESG (Ecological Services Group), *Assessment of the Biological Test Methods for Terrestrial Plants and Soil Invertebrates: Metals*, rapport final d'août 2000, préparé par Aquaterra Environmental, Ltd. (Orton, Ont.) et ESG International Inc. (Guelph, Ont.) pour la Section de l'élaboration et de l'application des méthodes, Environnement Canada, Ottawa (2000).

ASTM (American Society for Testing and Materials), « Standard Guide for Use of Lighting in Laboratory Testing », E-1733-95, p. 1249–1259, dans : *1999 Book of ASTM Standards, Volume 11.05 Biological Effects and Environmental Fate ; Biotechnology ; Pesticides, Vol. 11.05*, ASTM, Philadelphie, PA (1999a).

———, « Standard Guide for Conducting Laboratory Soil Toxicity or Bioaccumulation Tests with the Lumbricid Earthworm *Eisenia fetida* », E1676-97, p. 1062–1079, dans : *1999 Annual Book of ASTM Standards — Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides, Vol. 11.05*, ASTM, Philadelphie, PA (1999b).

Barber, I., J. Bembridge, P. Dohmen, P. Edwards, F. Heimbach, R. Heusel, K. Romijn et H. Rufli, « Development and Evaluation of Triggers for Earthworm Toxicity Testing with Plant Protection Products », p. 269–278, dans : *Advances in Earthworm Ecotoxicology*, S.C. Sheppard, J.D. Bembridge, M. Holmstrup et L. Posthuma (dir.), SETAC Press, Pensacola, FL (1997).

Bauer, C. et J. Römbke, « Factors Influencing the Toxicity of Two Pesticides on Three Lumbricid Species in Laboratory Tests », *Soil Biol. Biochem.*, *29*:705–708 (1997).

BBA (Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft), « Auswirkungen von Pflanzenschutzmitteln auf die Reproduktion und das Wachstum von *Eisenia fetida*/*Eisenia andrei* », *Richtlinien für die Prüfung von Pflanzenschutzmitteln im Zulassungsverfahren*, partie VI, 2-2, janvier 1994 (1994).

Becker-van Slooten, K, S. Campiche et J. Tarradellas, *Research in Support of the Environment Canada Collembolan Toxicity Test Method with* Folsomia candida *for Assessment of Contaminated Soils*, rapport préparé par le Laboratoire de chimie environnementale et écotoxicologie (CECOTOX), École polytechnique fédérale de Lausanne (EPFL) ENAC-ISTE (Suisse) pour la Section de l'élaboration et de l'application des méthodes, Environnement Canada, Ottawa (2003).

———, *Research in Support of the Environment Canada Soil Toxicity Test Methods: Consideration of Various Methods for Measuring Soil pH, Water Holding Capacity et Water Filled Pore Space*, rapport préparé par le Laboratoire de chimie environnementale et écotoxicologie (CECOTOX), École polytechnique fédérale de Lausanne (EPFL) ENAC-ISTE (Suisse)

pour la Section de l'élaboration et de l'application des méthodes, Environnement Canada, Ottawa (2004).

Bonnell Environmental Consulting, *Assessment of Soil Toxicity Test Species for Canadian Representativeness*, rapport technique TS-28, préparé pour la Section de l'élaboration et de l'application des méthodes, Environnement Canada, Ottawa (1994).

Bouché, M.B., « Earthworm Toxicological Test, Hazard Assessment and Biomonitoring — A Methodological Approach », p. 315–320, dans : *Earthworms in Waste and Environmental Management*, C.A. Edwards et E.F. Neuhauser (dir.), SPB Academic Publishing, La Haye (1988).

———, « Earthworm Species and Ecotoxicological Studies », p. 20–35, dans : *Ecotoxicology of Earthworms*, P.W. Greig-Smith, H. Becker, P.J. Edwards et F. Heimbach (dir.), Intercept, Andover, R.-U. (1992).

Brousseau, P., N. Fugere, J. Bernier, D. Coderre, D. Nadeau, G. Poirier et M. Fournier, « Evaluation of Earthworm Exposure to Contaminated Soil by Cytometric Assay of Coelomocytes Phagocytosis in *Lumbricus terrestris* (Oligocaheta) », *Soil Biol. Biochem., 29*:681–684 (1997).

Callahan, C.A., « Earthworms as Ecotoxicological Assessment Tools », p. 295–301, dans : *Earthworms in Waste and Environmental Management*, C.A. Edwards et E.F. Neuhauser (dir.), SPB Academic Publishing, La Haye (1988).

Callahan, C.A., C.A. Menzie, D.E. Burmaster, D.C. Wilborn et T. Ernst, « On-Site Methods for Assessing Chemical Impact on the Soil Environment Using Earthworms: A Case Study at the Baird and McGuire Superfund Site, Holbrook, Massachusetts », *Environ. Toxicol. Chem., 10*:817–826 (1991).

Callahan, C.A., M.A. Shirazi et E.F. Neuhauser, « Comparative Toxicity of Chemicals to Earthworms », *Environ. Toxicol. Chem., 13 (2)*:291–298 (1994).

Carter, M.R. (dir.), *Soil Sampling and Methods of Analysis* », Lewis Publishers, CRC Press Inc., Boca Raton, Floride (1993).

Chang, L.W., J.R. Meier et M.K. Smith, « Application of Plant and Earthworm Bioassays to Evaluate Remediation of a Lead-contaminated Soil », *Arch. Environ. Contam. Toxicol., 32*:166–171 (1997).

Christensen, O.M. et J.G. Mather, « Earthworms as Ecotoxicological Test-Organisms », rapport technique, Direction générale de la protection de l'environnement du Danemark, Copenhague, 99 p. (1994).

Cikutovic, M.A., L.C. Fitzpatrick, B.J. Venables et A.J. Goven, « Sperm Count in Earthworms (*Lumbricus terrestris*) as a Biomarker for Environmental Technology: Effects of Cadmium and Chlordane », *Environ. Pollut., 81*:123–125 (1993).

Conder, J.M. et R.P. Lanno, « Evaluation of Surrogate Measures of Cadmium, Lead, and Zinc Bioavailability to *Eisenia fetida*, *Chemosphere 41*: 1659–1668 (2000).

Cooke, A.S., P.W. Greig-Smith et S.A. Jones, « Consequences for Vertebrate Wildlife of Toxic Residues in Earthworm Prey », p. 139–155, dans : *Ecotoxicology of Earthworms*, P.W. Greig-Smith, H. Becker, P.J. Edwards et F. Heimbach (dir.), Intercept, Hants, R.-U. (1992).

Courchesne, F., S. Savoie et A. Dufresne, « Effects of Air-Drying on the Measurement of Soil pH in Acidic Forest Soils of Quebec, Canada », *Soil Science 160(1)*:56–68 (1995).

Crépin, J. et R.L. Johnson, « Soil Sampling for Environmental Assessment », p. 5–18, chapitre 2, dans : *Soil Sampling and Methods of Analysis*, M.R. Carter (dir.), Lewis Publishers, CRC Press Inc., Boca Raton, Floride (1993).

Curry, J.P., « The Ecology of Earthworms in Reclaimed Soils and their Influence on Soil Fertility », p. 251–261, dans : *Earthworms in Waste and Environmental Management*, C.A. Edwards et E.F. Neuhauser, dir., SPB Academic Publishing, La Haye (1988).

Deitzer G., « Spectral Comparisons of Sunlight and Different Lamps », *c74*, p. 197–199, dans : *Proceedings of International Lighting in Controlled Environments Workshop*, Tibbits, T.W. (dir.), 1er mars 1994, Madison, WI (1994).

Drewes, C.D., E.P. Vining et C.A. Callahan, « Non-Invasive Electrophysiological Monitoring: A Sensitive Method for Detecting Sublethal Neurotoxicity in Earthworms », *Environ. Toxicol. Chem., 3*:599–607 (1984).

EC (Environnement Canada), *Document d'orientation sur la mesure de la précision des essais de toxicité sur sédiment de contrôle dopé avec un produit toxique de référence*, Service de la protection de l'environnement,

Ottawa, rapport SPE 1/RM/30, 58 p. (1995).

———, *Méthode d'essai biologique : essai de survie et de croissance de l'amphipode dulcicole* Hyalella azteca *dans les sédiments,* Service de la protection de l'environnement, Ottawa, rapport SPE 1/RM/33, 122 p. (1997a).

———, *Méthode d'essai biologique : essai de survie et de croissance des larves dulcicoles de chironomes (*Chironomus tentans *ou* Chironomus riparius*)dans les sédiments,* Service de la protection de l'environnement, Ottawa, rapport SPE 1/RM/32, 133 p. (1997b).

———, *Guide des essais écotoxicologiques employant une seule espèce et de l'interprétation de leurs résultats,* Service de la protection de l'environnement, Ottawa, rapport SPE 1/RM/34, 209 p. (1999).

———, *The Procurement and Culturing of Red Wiggler Worms (*Eisenia andrei*),* mode opératoire normalisé CULTEF.SOP, 6 p., décembre 2000, Section d'écotoxicologie, Centre des sciences environnementales du Pacifique, North Vancouver, C.-B. (2000a).

———, *14-Day Acute Lethal Bioassay Using the Earthworm* Eisenia andrei, mode opératoire normalisé LC50EF1.2, 10 p., décembre 2000, Section d'écotoxicologie, Centre des sciences environnementales du Pacifique, North Vancouver, C.-B. (2000b).

———, *Méthode d'essai biologique. Essai de survie et de croissance des vers polychètes spionides (*Polydora cornuta*) dans les sédiments,* Service de la protection de l'environnement, Ottawa, rapport SPE 1/RM/41, 135 p. (2001).

———, *Inter-laboratory Validation of Environment Canada's New Test Methods for Measuring Soil Toxicity Using Earthworms,* octobre 2004, rapport de J. Princz, rédigé pour la Division des méthodes biologiques, Environnement Canada, Ottawa (2004a).

———, *Guidance Document on Statistical Methods for Environmental Toxicity Tests,* Section de l'élaboration et de l'application des méthodes, Environnement Canada, Ottawa, rapport SPE 1/RM/46, en préparation (2004b).

———, *Proceedings to the Workshop on Toxicity Test Methodologies for Assessing the Impacts of Contaminant Mixtures in Soil Using Terrestrial Species of Ecological Relevance to Canadian Soil Systems,* atelier ayant eu lieu du 19 au 21 février 2003, au Centre des sciences environnementales du Pacifique, North Vancouver, C.-B., compte rendu publié par la Section de l'élaboration et de l'application des méthodes, Environnement Canada, Ottawa (2004c).

———, *Biological Test Method: Test for Measuring Survival and Reproduction Effects in Springtails,* Section de l'élaboration et de l'application des méthodes, Environnement Canada, Ottawa, rapport SPE 1/RM/47, en préparation (2004d).

———, *Biological Test Method: Test for Measuring Emergence and Growth of Terrestrial Plants Exposed to Contaminants in Soil,* Section de l'élaboration et de l'application des méthodes, Environnement Canada, Ottawa, rapport SPE 1/RM/45, en préparation (2004e).

Edwards, C.A. et P.J. Bohlen, « The Effects of Toxic Chemicals on Earthworms », *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, 125*: 23–99 (1992).

———, *Biology and Ecology of Earthworms,* 3rd éd., Chapman and Hall, Londres (1996).

Edwards, C.A. et J.R. Lofty, *Biology of Earthworms,* Chapman and Hall, Londres (1977).

Eisenhart, C., M.W. Hastay et W.A. Wallace, *Techniques of Statistical Analysis,* chap. 15, McGraw-Hill Book Co., New York (1947).

Elshayeb, M., N.C. Feisthauer, G.L. Stephenson et R.J. Brooks, *Avoidance Response of Earthworms to Benomyl Spiked Soils,* compte rendu du Laurentian Chapter of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry, université McMaster, Hamilton, Ont., les 25 et 26 mai 2001 (2001).

ESG (Ecological Services Group), *Final Report on the Acute Screening and Definitive, Chronic Toxicity Tests with Motor Gasoline,* rapport préparé par Ecological Services Group International Inc. (Guelph, Ont.) pour Petroleum Technology Alliance Canada, Calgary, Alberta (2000).

———, *Toxicity of Petroleum Hydrocarbons to Soil Organisms and The Effects on Soil Quality: Phase 1 Fraction-Specific Toxicity of Crude Oil,* rapport préparé par Ecological Services Group International Inc. (Guelph, Ont.) pour Petroleum Technology Alliance Canada, Calgary, Alberta (2001).

———, *Impacts of Metal-Contaminated Forest Soils From the Canadian Shield on Terrestrial Organisms,* rapport préparé par Ecological Services Group International Ltd. (Guelph, ON) pour le Metals in the

Environment Research Network Canadian Network of Toxicology Centres, Guelph, et la Section de l'élaboration et de l'application des méthodes, Environnement Canada, Ottawa (2002).

ESG (Ecological Services Group) et Aquaterra Environmental, *Assessment of the Biological Test Methods for Terrestrial Plants and Soil Invertebrates: Pesticides*, rapport préparé par Ecological Services Group International Inc. (Guelph, Ont.) et Aquaterra Environmental, Ltd. (Orton, ON) pour la Section de l'élaboration et de l'application des méthodes, Environnement Canada, Ottawa (2002).

ESP (Ecological Services for Planning), *The Relative Toxicity of Four Pesticides to Two Species of Earthworm in Artificial and Natural Soils*, rapport non publié d'Ecological Services for Planning Inc. (Guelph, Ont.) pour la Division des recommandations, Environnement Canada, Ottawa (1992).

Feisthauer, N.C., G.L. Stephenson et R.P. Scroggins, « Toxicity of Pesticides (Benomyl and Diuron) to a Battery of Terrestrial Species in Different Soil Types », présentation PM066, compte rendu de la réunion de la Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Baltimore, MD, novembre 2001 (2001).

Fender, W.M., « Earthworms of the Western United States, Part 1. Lumbricidae », *Megadriologica, 4 (5)*:93–129 (1985).

Ferreiro, A., J. Dominguez et A. Velado, « The Taxonomy and Reproductive Behaviour of *Eisenia fetida* and *Eisenia andrei* (Lumbricidea) », p. 245, dans : *Proceedings from the 7th International Symposium on Earthworm Ecotoxicology*, 387 p., Cardiff, Pays de Galles, 1er–6 septembre 2002 (2002).

Fischer, E. et L. Molnar, « Growth and Reproduction of *Eisenia fetida* (Oligochaeta, Lumbricidae) in Semi-Natural Soil Containing Various Metal Chlorides », *Soil Biol. Biochem., 29*:667–670 (1997).

Fitzpatrick, L.C., R. Sassani, B.J. Venables et A.J. Goven, « Comparative Toxicity of Polychlorinated Biphenyls to Earthworms *Eisenia foetida* and *Lumbricus terrestris* », *Environ. Pollut., 77*:65–69 (1992).

Fox, C., « Frequently Asked Questions About Earthworms », FAQ (site Web) http://res2.agr.gc.ca/london/faq/earth-terre_e.htm, Dir. gén. de la recherche, Agriculture et Agroalimentaire Canada, Centre de recherches du Sud sur la phytoprotection et les aliments, London, Ont. (2000).

Gibbs, M.H., L.F. Wicker et A.J. Stewart, « A Method for Assessing Sublethal Effects of Contaminants in Soils to the Earthworm, *Eisenia foetida* », *Environ. Toxicol. Chem., 15 (3)*:360–368 (1996).

Giggleman, M.A., L.C. Fitzpatrick, A.J. Goven et B.J. Venables, « Effects of Pentachlorophenol on Survival of Earthworms (*Lumbricus terrestris*) and Phagocytosis by their Immmunoactive Coelomocytes », *Environ. Toxicol. Chem., 17 (12)*:2391–2394 (1998).

Goven, A.J., G.S. Eyambe, L.C. Fitzpatrick, B.J. Venables et E.L. Cooper, « Cellular Biomarkers for Measuring Toxicity of Xenobiotics: Effects of Polychlorinated Biphenyls on Earthworm *Lumbricus terrestris* Coelomocytes », *Environ. Toxicol. Chem., 12*:863–870 (1993).

Goven, A., J. S.C. Chen, L.C. Fitzpatrick et B.J. Venables, « Lysozyme Activity in Earthworm (*Lumbricus terrestris*) Coelomic Fluid and Coelomocytes: Enzyme Assay for Immunotoxicity of Xenobiotics, *Environ. Toxicol. Chem., 13*:607–613 (1994).

Haimi, J. et S. Paavola, « Responses of Two Earthworm Populations with Different Exposure Histories to Chlorophenol Contamination », *Environ. Toxicol. Chem., 17 (6)*:1114–1117 (1998).

Hartenstein, R., « Effect of Aromatic Compounds, Humic Acids and Lignins on Growth of the Earthworm (*Eisenia foetida*) », *Soil. Biol. Biochem. 14*:595–599 (1982).

Hausenbuiller, R.L., *Soil Science–Principles & Practices*, 3e édition, W.C. Brown Publisher, Dubuque, Iowa (1985).

Heimbach, F., « Correlations Between Three Methods for Determining the Toxicity of Chemicals to Earthworms », *Pestic. Sci., 15*:605–611 (1984).

———, « Comparison of Laboratory Methods, Using *Eisenia foetida* and *Lumbricus terrestris*, for the Assessment of the Hazard of Chemicals to Earthworms », *J. Plant Diseases and Protection, 92 (2)*:186–193 (1985).

———, « A Comparison of Laboratory Methods for Toxicity Testing with Earthworms », p. 329–335, dans : *Earthworms in Waste and Environmental Management*, C.A. Edwards et E.F. Neuhauser (dir.), SPB Academic Publishing, La Haye (1988).

———, « Use of Laboratory Toxicity Tests for the Hazard Assessment of Chemicals of Earthworms Representing the Soil Fauna », p. 299–302, dans : *Integrated Soil and Sediment Research: A Basis for Proper Protection*, H.J.P. Eijsackers et T. Hamers (dir.), Kluwer Academic Publishers, Pays-Bas (1993).

———, « Comparison of the Sensitivities of an Earthworm (*Eisenia fetida*) Reproduction Test and a Standardized Field Test on Grassland », p. 235–245, dans : *Advances in Earthworm Ecotoxicology*, S.C. Sheppard, J.D. Bembridge, M. Holmstrup et L. Posthuma (dir.), SETAC Press, Pensacola, FL (1997).

Heimbach, F. et P.J. Edwards, « The Toxicity of 2-Chloroacetamide and Benomyl to Earthworms Under Various Test Conditions in an Artificial Soil Test », *Pestic. Sci., 14*:635–636 (1983).

Hendershot W.H., H. Lalonde et M. Duquette, « Soil Reaction and Exchangeable Acidity », p. 141–145, dans : *Soil Sampling and Methods of Analysis*, M.R. Carter (dir.), Société canadienne de la science du sol, Lewis Publishers, Boca Raton, Floride (1993).

Holmstrup, M., « Field Assessment of Toxic Effects on Reproduction in the Earthworms *Aporrectodea longa* and *Aporrectodea rosea* », *Environ. Toxicol. Chem., 19*:1781–1787 (2000).

Hund, K., « Earthworm Avoidance Test for Soil Assessment: Alternative for Acute and Reproduction Test », p. 1039–1040, dans : *Contaminated Soil '98*, vol. 2, Proceedings of the Sixth International FZK/TNO Conference on Contaminated Soil, 17–21 mai 1998, Édimbourg, R.-U., Thomas Telford Publishing Ltd., Londres (1998).

Hund-Rinke, K. et H. Wiechering, « Earthworm Avoidance Test for Soil Assessments. An Alternative for Acute and Reproduction Tests », *J. Soils and Sediments, 1*:15–20 (2001).

Ingraldi, S., J. Princz et R. Scroggins, *Comparison of* E. andrei *and* E. fetida *and their Response to Contamination*, rapport technique non publié, préparé par S. Ingraldi (Faculté des sciences, Waterloo, Ont.) pour la Section de l'élaboration et de l'application des méthodes, Environnement Canada, Ottawa (2004).

ISO (International Organization for Standardization = Organisation internationale de normalisation), *Soil — Determination of the Effect of Chemical Substances on the Reproduction of Earthworms*, proposition des Pays-Bas, 9 p., avril 1991, Genève (1991).

———, « Soil Quality — Effects of Pollutants on Earthworms (*Eisenia fetida*). Part 1: Determination of Acute Toxicity Using Artificial Soil Substrate », ISO 11268-1, Genève (1993).

———, « Soil Quality — Determination of Organic and Total Carbon After Dry Combustion (Elementary Analysis) », ISO 10694, Genève (1995).

———, « Soil Quality — Effects of Pollutants on Earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of Effects on Reproduction », ISO 11268-2, Genève (1998).

———, « Soil Quality — Inhibition of Reproduction of Collembola (*Folsomia candida*) by Soil Pollutants », ISO 11267, Genève (1999).

———, « Avoidance Test for Evaluating the Quality of Soils and the Toxicity of Chemicals — Test with Earthworms (*Eisenia fetida/andrei*) », Doc ISO/TC/190/SC 4/WG 2 N1238, ébauche, 19 p., Genève (2003).

Jaenike, J., « *Eisenia foetida* is Two Biological Species », *Megadrilogica, 4*:6–8 (1982).

Karnak, R.E. et J.L. Hamelink, « A Standardized Method for Determining the Acute Toxicity of Chemicals to Earthworms », *Ecotoxicol. Environ. Safety, 6*:216–222 (1982).

Keddy, C., J.C. Greene et M.A. Bonnell, « Review of Whole-Organism Bioassays: Soil, Freshwater Sediment, and Freshwater Assessment in Canada », *Ecotoxicol. Environ. Safety, 30*:221–251 (1995).

Keith, L.H., *Environmental Sampling and Analysis: A Practical Guide*, 143 p., Lewis Publishers, Inc., Chelsea, Michigan (1992).

Klute, A. (dir.), *Methods of Soil Analysis, Part 1 – Physical and Mineralogical Methods*, 2e éd., American Society of Agronomy Inc. and Soil Science Society of America Inc., Madison, Wisconsin (1986).

Komex International, *Sampling and Shipping of Reference Soil for the Terrestrial Soil Toxicity Method Development Project*, rapport préparé pour Environnement Canada, Ottawa, 17 p. (1995).

Kula, H., « Comparison of Laboratory and Field Testing for the Assessment of Pesticide Side Effects on Earthworms », *Acta Zool. Fennica, 196*:228–341

(1995).

Kula, H. et C. Kokta, « Side Effects of Selected Pesticides on Earthworms Under Laboratory and Field Conditions », *Soil Biol. Biochem., 24*:1711–1714 (1992).

Kula, H. et O. Larink, « Tests on the Earthworms *Eisenia fetida* and *Aporrectodea caligniosa* », p. 95–112, dans : *Handbook of Soil Invertebrate Toxicity Tests*, H. Løkke et C.A.M. van Gestel (dir.), Ecological and Environmental Toxicology Series, John Wiley & Sons, Chichester, R.-U. (1997).

Lee, K.E., *Earthworms: Their Ecology and Relationship with Soils and Land Use*, Academic Press, Londres (1985).

Leon, C.D. et C.A.M. van Gestel, *Selection of a Set of Laboratory Ecotoxicity Tests for the Effects Assessment of Chemicals in Terrestrial Ecosystems — Discussion Paper*, rapport D94004, 134 p., août 1994, Département d'écologie et d'écologie, Université libre d'Amsterdam (1994).

Lofs-Holmin, A., « Measuring Growth of Earthworms as a Method of Testing Sublethal Toxicity of Pesticides—Experiments with Benomyl and Trichloroacetic Acid (TCA) », *Swed. J. Agr. Res., 10*:25–33 (1980).

Lofs-Holmin, A. et U. Bostrom, « The Use of Earthworms and Other Soil Animals in Pesticide Testing », p. 303–313, dans : *Earthworms in Waste and Environmental Management*, C.A. Edwards et E.F. Neuhauser (dir.), Academic Publishing, La Haye (1988).

Macdonald, D.W., « Predation on Earthworms by Terrestrial Vertebrates », p. 393–414, dans : J.E. Stachell (dir.), *Earthworm Ecology: From Darwin to Vermiculture*, Chapman and Hall, New York, (1983).

McCann, J., *Report on the Identification of Earthworm Test Cultures (Eisenia andrei and E. fetida) and Potential Commercial Sources of Earthworms*, rapport préparé par le Département de biologie, Waterloo, Ont.) et Aquaterra Environmental, Ltd. (Orton, Ont.) pour la Section de l'élaboration et de l'application des méthodes, Environnement Canada, Ottawa (2004).

McElroy, T.C. et W.J. Diehl, « Heterosis in Two Closely Related Species of Earthworm (*Eisenia fetida* and *E. andrei*) », *Heredity, 87*:598–608 (2001).

Mather, J.G. et O. Christensen, « Surface Migration of Earthworms in Grassland », *Pedobiologia, 36*:51–57 (1992).

Mearns, A.J., R.C. Swartz, J.M. Cummins, P.A. Dinnel, P. Plesha et P.M. Chapman, « Interlaboratory Comparison of a Sediment Toxicity Test Using the Marine Amphipod, *Rhepoxynius abronius* », *Marine Environ. Res., 19*:13–37 (1986).

Meharg, A.A., R.F. Shore et K. Broadgate, « Edaphic Factors Affecting the Toxicity and Accumulation of Arsenate in the Earthworm *Lumbricus terrestris*, *Environ. Toxicol. Chem., 17(6)*:1124–1131 (1998).

Meier, J.R., L.W. Chang, S. Jacobs, J. Torsella, M.C. Meckes et M.K. Smith, « Use of Plant and Earthworm Bioassays to Evaluate Remediation of Soil from a Site Contaminated with Polychlorinated Biphenyls », *Environ. Toxicol. Chem., 16*:928–938 (1997).

Menzie, C.A., D.E. Burmaster, J.S. Freshman et C.A. Callahan, « Assessment of Methods for Estimating Ecological Risk in the Terrestrial Component: A Case Study at the Baird & McGuire Superfund Site in Holbrook, Massachusetts », *Environ. Toxicol. Chem., 11*:245–260 (1992).

NERI (National Environmental Research Institute), « Manual of SECOFASE — Development, Improvement and Standardization of Test Systems for Assessing Sublethal Effects on Chemicals on Fauna in the Soil Ecosystem », H. Lokke et C.A.M. van Gestel (dir.), rapport d'un atelier ayant eu lieu à Silkeborg, les 18–19 janvier 1993, Silkeborg, Danemark, 41 p. (1993).

Neuhauser, E.F. et C.A. Callahan, « Growth and Reproduction of the Earthworm *Eisenia fetida fetida* Exposed to Sublethal Concentrations of Organic Chemicals, *Soil Biol. Biochem., 22 (2)*:175–179 (1990).

Neuhauser, E.F., M.R. Malecki et R.C. Loehr, « Growth and Reproduction of the Earthworm *E. fetida* after Exposure to Sublethal Concentrations of Metals », *Pedobiologia, 27*:89–97 (1984).

Neuhauser, E.F., R.C. Loehr, M.R. Malecki, D.L. Milligan et P.R. Durkin, « The Toxicity of Selected Organic Chemicals to the Earthworm *Eisenia fetida* », *J. Environ. Qual., 14* (3):383–388 (1985).

Neuhauser, E.F., P.R. Durkin, M.R. Malecki et M. Anatra, « Comparative Toxicity of Ten Organic Chemicals to Four Earthworm Species », *Comp.*

Biochem. Physiol., 83C (1):197–200 (1986).

Newman, M.C., *Quantitative Methods in Aquatic Ecotoxicology*. Lewis Publishers., Boca Raton, Floride (1995).

Norberg-King, T.J., « A Linear Interpolation Method for Sublethal Toxicity: the Inhibition Concentration (ICp) Approach (Version 2.0) », USEPA, Environ. Res. Lab.-Duluth, Duluth, MN, rapport technique 03-93 du National Effluent Toxicity Assessment Center (1993).

OCDE (voir OECD.)

OECD (Organization for Economic Cooperation and Development = OCDE, Organisation de coopération et de développement économiques), *OECD Guideline for Testing of Chemicals: Earthworm, Acute Toxicity Tests*, n° 207, Paris (1984).

———, *OECD Guideline for the Testing of Chemicals: Proposal for a New Guideline — Earthworm Reproduction Test (*Eisenia fetida/andrei*)*, ébauche, 17 p., janvier 2000 (2000).

Øien, N. et J. Stenersen, « Esterases of Earthworms– III. Electrophoresis Reveals that *Eisenia fetida* (Sav.) is Two Species », *Comp. Biochem. Physiol. 78C*:277–282 (1984).

OMAFRA (Ontario Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs = ministère de l'Agriculture, de l'Alimentation et des Affaires rurales de l'Ontario, MAAARO), *Field Crop Recommendations 1999-2000*, publication 296, 142 p., Imprimeur de la Reine, Toronto (1999).

OMEE (Ontario Ministry of Environment and Energy = ministère de l'environnement et de l'énergie de l'Ontario, MEEO), *Guidance on Sampling and Analytical Methods for Use at Contaminated Sites in Ontario — § 8.3.7 Inorganics*, version 1.1, ISBN-0-7778-4056-1, décembre 1996, Imprimeur de la Reine, Toronto (1996).

Paine, M.D. et C.A. McPherson, « Phase IV Studies of 10-Day Tests for Sediment Toxicity Using Marine ou Estuarine Infaunal Amphipods », rapport non publié, préparé pour la Division du milieu marin, Environnement Canada le Groupe intergouvernemental sur la toxicité aquatique par EVS Consultants Ltd., North Vancouver, BC (1991).

Petersen, R.G. et L.D. Calvin, « Sampling », p. 33–51, dans : *Methods of Soil Analysis, Part 1 – Physical and Mineralogical Methods* (A. Klute, dir.), 2e éd., American Society of Agronomy Inc. and Soil Science Society of America Inc., Madison, Wisconsin (1986).

Puurtinen, H.M. et E.A.T. Martikainen, « Effect of Soil Moisture on Pesticide Toxicity to an Enchytraeid Worm, *Enchytraeus* sp. », *Arch. Environ. Contam. Toxicol., 33*:34–41 (1997).

Reinecke, A.J. et S.A. Viljoen, « A Comparison of the Biology of *Eisenia fetida* and *Eisenia andrei* (Oligochaeta) », *Biol. Fert. Soils, 11*: 295-300 (1991).

Reinecke, A.J., S.A. Viljoen et R.J. Saayman, « The Suitability of *Eudrilus eugeniae, Perionyx excavatus* and *Eisenia fetida* (Oligochaeta) for Vermicomposting in Southern Africa in Terms of their Temperature Requirements », *Soil Biol. Biochem., 24*:1295–1307 (1992).

Reinecke, A.J. et S.A. Reinecke, « The Influence of Heavy Metals on the Growth and Reproduction of the Compost Worm *Eisenia fetida* (Oligocaheta) », *Pedobiologia, 40*:439–448 (1996).

Reynolds, J.W., *The Earthworms (Lumbricidae and Sparganophilidae) of Ontario*, Life Sci. Misc. Publ., Musée royal de l'Ontario, Toronto (1977).

———, « Status of Exotic Earthworm Systematics and Biogeography in North America, p. 1–28, dans : *Earthworm Ecology and Biogeography*, P.F. Hendrix (dir.), Lewis Publishers, CRC Press Inc., Boca Raton, FL (1995).

Riepert, F. et C. Kula, « Development of Laboratory Methods for Testing Effects of Chemicals and Pesticides on *Collembola* and Earthworms », *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesantalt für Land- und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem, 320*:1–82 (1996).

Robidoux, P.Y., J. Hawari, S. Thiboutot, G. Ampleman et G.I. Sunahara, « Acute Toxicity of 2,4,6-Trinitrotoluene in Earthworm (*Eisenia andrei*) », *Ecotoxicol. Environ. Safety, 44*:311–321 (1999).

Robidoux, P.Y., C. Svendsen, J. Caumartin, J. Hawari, G. Ampleman, S. Thiboutot, J.M. Weeks et G.I. Sunahara, « Chronic Toxicity of Energetic Compounds in Soil Determined Using the Earthworm (*Eisenia andrei*) Reproduction Test », *Environ. Toxicol. Chem., 19*:1764–1773 (2000).

Robidoux, P.Y., J. Hawari, S. Thiboutot, G. Ampleman et G.I. Sunahara, « Chronic Toxicity of Octahydro-1,3,5,7-Tetranitro-1,3,5,7-Tetrazocine

(HMX) in Soil Determined Using the Earthworm (*Eisenia andrei*) Reproduction Test », *Environ. Pollut.*, *111*:283–292 (2001).

Rocchini, R.J., M.J.R. Clark, A.J. Jordan, S. Horvath, D.J. McLeay, J.A. Servizi, A. Sholund, H.J. Singleton, R.G. Watts et R.H. Young, *Provincial Guidelines and Laboratory Procedures for Measuring Acute Lethal Toxicity of Liquid Effluents to Fish*, ministère de l'Environnement de la Colombie-Britannique, Victoria (1982).

Römbke, J., P. Vickus et C. Bauer, « Experiences and Problems with the OECD-Earthworm Acute Test in Routine Testing », p. 209–212, dans : *Ecotoxicology of Earthworms*, P.W. Greig-Smith, H. Becker, C.A. Edwards et F. Heimbach (dir.), Intercept Ltd., Andover, R.-U. (1992).

Römbke, J., P, T. Knacker, B. Förster et A. Marcinkowski, « Comparison of Effects of Two Pesticides on Soil Organisms in Laboratory Tests, Microcosms, and in the Field », p. 229–240, dans : *Ecotoxicology of Soil Organisms*, M.H. Donker, H. Eijsackers et F. Heimbach (dir.), Lewis Publishers, Chelsea, R.-U. (1994).

Sager J.C. et C. McFarlane, « Radiation », p. 1–30, dans : *Plant Growth Chamber Handbook*, R.W. Langhans et T.W. Tibbits (dir.), North Central Regional Research Publication No. 340, Iowa Agriculture and Home Economics Experiment Station Special Report No. 99, Iowa State University of Science and Technology, Ames, Iowa (1997).

SAH (Soil Analysis Handbook), *Reference Methods for Soil Analysis*, Soil and Plant Analysis Council Inc., Georgia University Station, Athens, Georgia, 202 p. (1992).

SAS (SAS Institute Inc.), « SAS Procedures Guide, Release 6.03, *et* Additional SAS/STAT Procedures, Release 6/03 (SAS Technical Report P-179). SAS Institute Inc., Cary, NC (1988).

Saterbak, A., R.J. Toy, D.C.L. Wong, B.J. McMain, M.P. Williams, P.B. Dorn, L.P. Brzuzy, E.Y. Chai et J.P. Salanitro, « Ecotoxicological and Analytical Assessment of Hydrocarbon-contaminated Soils and Application to Ecological Risk Assessment », *Environ. Toxicol. Chem.*, *18(7)*:1591–1607 (1999).

Saterbak, A., R.J. Toy, B.J. McMain, M.P. Williams et P.B. Dorn, « Ecotoxicological and Analytical Assessment of Effects of Bioremediation on Hydrocarbon-containing Soils », *Environ. Toxicol. Chem.*, *19*:2643–2652 (2000).

Sauvé, S., N. Cook, W.H. Hendershot et M.B. McBride, « Linking Plant Tissue Concentrations and Soil Copper Pools in Urban Contaminated Soils », *Environ. Pollution 94(2)*:153–157 (1996).

Sauvé, S., A. Dumestre, M.B. McBride et W.H. Hendershot, « Derivation of Soil Quality Criteria Using Predicted Chemical Speciation of Pb and Cu », *Environ. Toxicol. Chem.*, *17(8)*:1481–1489 (1998).

Sauvé, S., W.A. Norvell, M.B. McBride et W.H. Hendershot, « Speciation and Complexation of Cadmium in Extracted Soil Solutions », *Environ. Science & Technol.*, *34*:291–296 (2000).

Schaefer, M., « Behavioural Endpoints in Earthworm Ecotoxicology: Evaluation of Different Test Systems in Soil Toxicity Assessment », *J. Soils & Sediments*, *3 (2):*79–84 (2003).

Scott-Fordsmand, J.J., J.M. Weeks et S.P. Hopkin, « Importance of Contamination History for Understanding Toxicity of Copper to Earthworm *Eisenia fetida* (Oligochaeta: Annelida), Using Neutral-Red Retention Assay », *Environ. Toxicol. Chem.*, *19*:1774–1780 (2000).

Sheppard, P.S., « Specific Differences in Cocoon and Hatchling Production in *Eisenia fetida* and *E. andrei* », p. 83–92, dans : *Earthworms in Waste and Environmental Management*, C.A. Edwards et E.F. Neuhauser, dir., SPB Academic Publishing, La Haye (1988).

Sheppard, S.C., *Development of Bioassay Protocols for Toxicants in Soil*, rapport PIBS 2838, ISBN 0-7778-1440-X, coll. Environmental Research, Direction générale de la recherche et de la technologie, Environnement Ontario, Imprimeur de la Reine, Toronto, février 1994 (1994).

Sheppard, S.C. et W.G. Evenden, « Optimized Design for Earthworm Survival Tests in Soil », *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, *49*:648–655 (1992).

———, « An Approach to Defining a Control ou Diluent Soil for Ecotoxicity Assays », p. 215-226, dans : *Environmental Toxicology and Risk Assessment*, vol. 7, ASTM STP 1333, E.E. Little, A.J. DeLonay et B.M. Greenberg (dir.), American Society for Testing and Materials, Philadelphie, PA (1998).

Sims, R.W. et B.M. Gerard, *Earthworms — Synopses of the British Fauna (New Series)*. Rapport 31, the Linnaean Society of London and the Estuarine and Brackish-Water Sciences Association, Londres (1985).

Slimak, K.M., « Avoidance Response as a Sublethal Effect of Pesticides on *Lumbricus terrestris* (Oligochaeta) », *Soil Biol. Biochem., 29*:713–715 (1997).

Sokal, R.R. et F.J. Rohlf, *Biometry*, W.H. Freeman and Co., San Francisco, Calif. (1969).

Spurgeon, D.J. et S.P. Hopkin, « Extrapolation of the Laboratory-Based OECD Earthworm Toxicity Test to Metal-Contaminated Field Sites », *Ecotoxicology, 4*:190–205 (1995).

———, « Effects of Metal-Contaminated Soils on the Growth, Sexual Development, and Early Cocoon Production of the Earthworm *Eisenia fetida*, with Particular Reference to Zinc », *Ecotoxicol. Environ. Safety, 35*:86–95 (1996a).

———, « Effects of Variations of the Organic Matter Content and pH of Soils on the Availability and Toxicity of Zinc to the Earthworm *Eisenia fetida* », *Pedobiologia,,40*:80–96 (1996b).

Spurgeon, D.J., S.P. Hopkin et D.T. Jones, « Effects of Cadmium, Copper, Lead and Zinc on Growth, Reproduction and Survival of the Earthworm *Eisenia fetida* (Savigny): Assessing the Environmental Impact of Point-Source Metal Contamination in Terrestrial Ecosystems », *Environ. Pollut., 84*:123–130 (1994).

Stantec et Aquaterra Environmental, *Developmental Studies in Support of Environment Canada's Biological Test Methods for Measuring Soil Toxicity Using Earthworms*, rapport préparé par Stantec Consulting, Ltd. (Guelph, Ont.) et Aquaterra Environmental, Ltd. (Orton, Ont.) pour la Section de l'élaboration et de l'application des méthodes, Environnement Canada, Ottawa (2004).

Steel, R.G.D. et J.H. Torrie, *Principles and Procedures of Statistics*, McGraw-Hill Book Co., New York (1980).

Stephan, C.E., « Methods for Calculating an LC50 », p. 65–84 , dans : *Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation*, F.L. Mayer et J.L. Hamelink (dir.). ASTM STP 634, American Society For Testing and Materials, Philadelphie, PA (1977).

Stephenson, G.L. Données non publiées. ESG International Inc., Guelph, Ont. (2002).

———, *Terrestrial Test Methods for Plants and Soil Invertebrates*, 230 p., thèse de doctorat, Département de biologie environnementale, Guelph, Ont. (2003a).

———, Données non publiées. Stantec Consulting, Ltd., Guelph, Ont. (2003b).

Stephenson, G.L., C.D. Wren, I.C.J. Middelraad et J.E. Warner, « Exposure of the Earthworm, *Lumbricus terrestris*, to Diazinon, and the Relative Risk to Passerine Birds », *Soil Biol. Biochem., 29 (3/4)*:717–720 (1997).

Stephenson, G.L., A. Kaushik, N.K. Kaushik, K.R. Solomon, T. Steele et R.P. Scroggins, « Use of an Avoidance-Response Test to Assess the Toxicity of Contaminated Soils to Earthworms », p. 67–81, dans : *Advances in Earthworm Ecotoxicology*, S.C. Shepard, J.D. Bembridge, M. Holmstrup et L. Posthuma, dir., SETAC Press, Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Philadelphie, PA (1998).

Stephenson, G.L., N. Koper, J. McCann et Z. Wang, *Draft Report on the Acute Screening and Definitive, Chronic Toxicity Tests with Whole Federated Crude Oil*, rapport non publié (ébauche), octobre 1999, préparé par ESG International (Guelph, Ont.) pour Petroleum Technology Alliance Canada (Calgary) et l'Association canadienne des producteurs pétroliers (Calgary), 52 p. + ann. (1999a).

———, *Draft Report on the Acute Screening and Definitive, Chronic Toxicity Tests with Fraction 3 Derived From Federated Crude Oil*, rapport non publié (ébauche), décembre 1999, préparé par ESG International (Guelph, Ont.) pour Petroleum Technology Alliance Canada (Calgary) et l'Association canadienne des producteurs pétroliers (Calgary), 48 p. + ann. (1999b).

Stephenson, G.L., J. McCann, P. Jokuty et Z. Wang, *Draft Report on the Acute Screening and Definitive, Chronic Toxicity Tests with Fraction 2 Derived From Federated Crude Oil*, rapport non publié (ébauche), janvier 2000, préparé par ESG International (Guelph, Ont.) pour Petroleum Technology Alliance Canada (Calgary) et l'Association canadienne des producteurs pétroliers (Calgary), 32 p. + ann. (2000a).

Stephenson, G.L., N. Koper, G.F. Atkinson, K.R. Solomon et R.P. Scroggins, « Use of Nonlinear Regression Techniques for Describing Concentration-Response Relationships of Plant

Species Exposed to Contaminated Site Soils », *Environ. Toxicol. Chem., 19*:2968–2981 (2000b).

Stephenson, G.L., J.I. Princz, N. Koper et P.G. Miasek, « Terrestrial Toxicity Testing with Volatile Substances », p. 236–252, dans : *Environmental Toxicology and Risk Assessment: Science, Policy, and Standardization – Implications for Environmental Decisions*, vol. 10., ASTM STP 1403, BM Greenberg, RN Hull, MH Roberts, Jr. et RW Gensemer (dir.), American Society for Testing and Materials, West Conshohocken, PA (2001).

Stephenson, G.L., R.G. Kuperman, G.L. Linder et S. Visser, « Toxicity Tests for Assessing Contaminated Soils and Ground Water », p. 25–43, dans : *Environmental Analysis of Contaminated Sites*, G.I. Sunahara, A.Y. Renoux, C. Thellen, C.L. Gaudet et A. Pilon (dir.), Ecological and Environmental Toxicology Series, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, R.-U. (2002).

Suzuki, M.M., E.L. Cooper, G.S. Eyambe, A.J. Goven, L.C. Fitzpatrick et B.J. Venables, « Polychlorinated Biphenyls (PCBs) Depress Allogeneic Natural Cytotoxicity by Earthworm Coelomocytes », *Environ. Toxicol. Chem., 14*:1697–1700 (1995).

Tomlin, A.D., « Behaviour as a Source of Earthworm Susceptibility to Ecotoxicants », p. 116–125, dans : *Ecotoxicology of Earthworms*, P.W. Greig-Smith, H. Becker, P.J. Edwards et F. Heimbach (dir.), Intercept, Hants, R.-U. (1995).

Tomlin, A.D., R. Protz, R.R. Martin, D.C. McCabe et R.J. Lagace, « Relationships Amongst Organic Matter Content, Heavy Metal Concentrations, Earthworm Activity, and Soil Microfabric on a Sewage Sludge Disposal Site », *Geoderma, 57*:89–103 (1993).

TOXSTAT, « Version 3.5 », Lincoln Research Associates, Inc., PO Box 4276, Bisbee, Arizona 85603, USA, tél. : 520 432-4092 ; courriel : danlra@msn.com. [Programmes sur disquette et guide imprimé de l'utilisateur.] (1996).

Tsukamoto, J. et H. Watanabe, « Influence of Temperature on Hatching and Growth of *Eisenia foetida* (Oligochaeta, Lumbricidae) », *Pedobiologia, 17(8)*:338–342 (1977).

USEPA (United States Environmental Protection Agency), *Protocols for Short-term Toxicity Screening of Hazardous Waste Sites*, rapport EPA/600/3-88/029, préparé par J.C. Greene, C.L. Bartels, W.J. Warren-Hicks, B.R. Parkhurst, G.L. Linder, S.A. Peterson et W.E. Miller, février 1989, Corvallis Environ. Research Lab., Corvallis, OR (1989).

———, *ASSESS Users Guide*, rapport EPA/600/8-91001, Environmental Monitoring Systems Laboratory, Las Vegas, Nevada (1991).

———, *Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates*, rapport EPA 600/R-94/024, 133 p., USEPA, Duluth, MN (1994a).

———, *Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Marine and Estuarine Organisms (Second Edition)*, rapport EPA/600/4-91/003, 483 p., Office of Research and Development, USEPA, Cincinnati, OH (1994b).

———, *Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to West Coast Marine and Estuarine Organisms*, rapport EPA/600/R-95/136, 661 p., Office of Research and Development, USEPA, Washington, DC (1995).

———, *Ecological Effects Test guidelines — Earthworm Subchronic Toxicity Tests*, ébauche, rapport EPA 712-C-96-167, avril 1996, Office of Prevention, Pesticides, and Toxic Substances (OPPTS) 850.6200, Washington, DC (1996).

van Ee, J.J., L.J. Blume et T.H. Starks, *A Rationale for the Assessment of Errors in the Sampling of Soils*, rapport EPA/600/4-90/013, 57 p., United States Environmental Protection Agency, Las Vegas, Nevada (1990).

van Ewijk, P.H. et H.A. Hoekstra, « Calculation of the EC50 and its Confidence Interval when Subtoxic Stimulus is Present », *Ecotoxicol. Environ. Saf., 25*: 25–32 (1993).

van Gestel, C.A.M., « Earthworms in Ecotoxicology », thèse de doctorat, 197 p., université d'Utrecht, Pays-Bas (1991).

van Gestel, C.A.M., « Validation of Earthworm Toxicity Tests by Comparison with Field Studies: A Review on Benomyl, Carbendazim, Carbofuran and Carbaryl », *J. Ecotoxicol. Environ. Safety, 23*:221–236 (1992).

van Gestel, C.A.M., « Scientific Basis for Extrapolating Results from Soil Ecotoxicity Tests to Field Conditions and the Use of Bioassays », p. 25–50, dans : *Ecological Risk Assessment of Contaminants in*

Soil, N.M. Van Straalen et H. Løkke (dir.), Chapman and Hall, Londres (1997).

van Gestel, C.A.M. et W.A. van Dis, « The Influence of Soil Characteristics on the Toxicity of Four Chemicals to the Earthworm *Eisenia fetida andrei* (Oligochaeta) », *Biol. Fertil. Soils, 6*:262–265 (1988).

van Gestel, C.A.M., W.A. van Dis, E.M. van Breemen et P.M. Sparenburg, « Comparison of Two Methods for Determining the Viability of Cocoons Produced in Earthworm Toxicity Experiments », *Pedobiologia, 32*:367–371 (1988).

van Gestel, C.A.M., W.A. van Dis, E.M. van Breemen et P.M. Sparenburg, « Development of a Standardized Reproduction Toxicity Test with the Earthworm Species *Eisenia fetida andrei* Using Copper, Pentachlorophenol, and 2,4-Dichloroaniline », *Ecotoxicol. Environ. Safety, 18*: 305–312 (1989).

van Gestel, C.A.M., E.M. Dirven-van Breemen et R. Baerselman, « Influence of Environmental Conditions on the Growth and Reproduction of the Earthworm *Eisenia andrei* in an Artificial Soil Substrate », *Pedobiologia, 36*:109–120 (1992a).

van Gestel, C.A.M., E.M. Dirven-Van Breemen, R. Baerselman, H.J.B. Emans, J.A.M. Jannsen, R. Postuma et P.J.M. Van Vliet, « Comparison of Sublethal and Lethal Criteria for Nine Different Chemicals in Standardized Toxicity Tests Using the Earthworm *Eisenia andrei*, *Ecotoxicol. Environ. Safety, 23*:206–220 (1992b).

van Gestel, C.A.M., J.J. van der Waarde, J.G.M. Derksen, E.E. van der Hoek, M.E.X.W. Veul, S. Bouwens, B. Rusch, R. Kronenburg et G.N.M. Stokman, « The Use of Acute and Chronic Bioassays to Determine the Ecological Risk and Bioremediation Efficiency of Oil-Polluted Soils », *Environ. Toxicol. Chem., 20*:1438–1449 (2001).

Venter, J.M. et A.J. Reinecke, « Sublethal Ecotoxicological Effects of Dieldrin on the Earthworm *Eisenia foetida* (Oligochaeta) », p. 337–353, dans : *Earthworms in Waste and Environmental Management* (C.A. Edwards et E.F. Neuhauser, dir.), SPB Academic Publishing, La Haye (1988).

Wallwork, J.A., *Earthworm Biology*, Studies in Biology No. 161, Camelot Press Ltd., Southampton, R.-U., 58 p. (1983).

Webster, R. et M.A. Oliver, *Statistical Methods in Soil and Land Resource Survey*, Oxford University Press, Oxford, R.-U., 315 p. (1990).

Wells, J.B. et R.P. Lanno, « Passive Sampling Devices (PSDs) as Biological Surrogates for Estimating the Bioavailability of Organic Chemicals in Soil », p. 253–270, dans : *Environmental Toxicology and Risk Assessment: Science, Policy, and Standardization - Implications for Environmental Decisions: Tenth Volume*, B.M. Greenberg, R.N. Hull, M.H. Roberts Jr. et R.W. Gensemer (dir.), ASTM STP 1403, American Society for Testing and Materials, West Conshohocken, PA (2001).

Wentsel, R.S. et M.A. Guelta, « Avoidance of Brass Powder-contaminated Soil by the Earthworm, *Lumbricus terrestris* », *Environ. Toxicol. Chem., 7*: 241–243 (1988).

Yeardley, R.B. Jr., J.M. Lazorchak et L.C. Gast, « The Potential of an Earthworm Avoidance Test for Evaluation of Hazardous Waste Sites », *Environ. Toxicol. Chem., 15(9)*:1532–1537 (1996).

Zoran, M.J., T.J. Heppner et C.D. Drewes, « Teratogenic Effects of the Fungicide Benomyl on Posterior Segmental Regeneration in the Earthworm, *Eisenia fetida* », *Pestic. Sci., 17*:641–652 (1986).

Méthodes d'essai biologique et guides à l'appui publiés par la Section de l'élaboration et de l'application des méthodes d'Environnement Canada *

Titre de la méthode ou du guide	Nº de publication	Date de publication	Date des modifications applicables
A. — Méthodes génériques (universelles)			
Essai de létalité aiguë sur la truite arc-en-ciel	SPE 1/RM/9	Juillet 1990	Mai 1996
Essai de létalité aiguë sur l'épinoche à trois épines (*Gasterosteus aculeatus)*	SPE 1/RM/10	Juillet 1990	Mars 2000
Essai de létalité aiguë sur *Daphnia* spp.	SPE 1/RM/11	Juillet 1990	Mai 1996
Essai de reproduction et de survie sur le cladocère *Ceriodaphnia dubia*	SPE 1/RM/21	Février 1992	Novembre 1997
Essai de croissance et de survie sur des larves de tête-de-boule	SPE 1/RM/22	Février 1992	Novembre 1997
Essai de toxicité sur la bactérie luminescente *Photobacterium phosphoreum*	SPE 1/RM/24	Novembre 1992	—
Essai d'inhibition de la croissance de l'algue d'eau douce *Selenastrum capricornutum*	SPE 1/RM/25	Novembre 1992	Novembre 1997
Essai de toxicité aiguë de sédiments chez les amphipodes marins ou estuariens	SPE 1/RM/26	Décembre 1992	Octobre 1998
Méthode d'essai biologique : essai sur la fécondation chez les échinides (oursins verts et oursins plats)	SPE 1/RM/27	Décembre 1992	Novembre 1997
Essais de toxicité sur des salmonidés aux premiers stades de leur cycle biologique	SPE 1/RM/28 1re édition	Décembre 1992	Janvier 1995
Méthode d'essai biologique : essais toxicologiques sur des salmonidés (truite arc-en-ciel) aux premiers stades de leur cycle biologique	SPE 1/RM/28 2e édition	Juillet 1998	—
Méthode d'essai biologique : essai de survie et de croissance des larves dulcicoles de chironomes (*Chironomus tentans* ou *Chironomus riparius*) dans les sédiments	SPE 1/RM/32	Décembre 1997	—

* On peut acheter ces documents des Publications de la protection de l'environnement, Service de la protection de l'environnement, Environnement Canada, Ottawa, K1A 0H3, Canada. Pour obtenir de plus amples renseignements ou formuler des observations, prière de s'adresser au chef de la Division des méthodes biologiques, Centre de technologie environnementale, Environnement Canada, Ottawa, K1A 0H3.

Titre de la méthode ou du guide	Nº de publication	Date de publication	Date des modifications applicables
A. — Méthodes génériques (universelles) [suite]			
Méthode d'essai biologique : essai de survie et de croissance de l'amphipode dulcicole *Hyalella azteca* dans les sédiments	SPE 1/RM/33	Décembre 1997	—
Méthode d'essai biologique : essai de mesure de l'inhibition de la croissance de la plante macroscopique dulcicole *Lemna minor*	SPE 1/RM/37	Mars 1999	—
Méthode d'essai biologique. Essai de survie et de croissance des vers polychètes spionides (*Polydora cornuta*) dans les sédiments	SPE 1/RM/41	Décembre 2001	—
Essais pour déterminer la toxicité de sols contaminés pour les vers de terre *Eisenia andrei*, *Eisenia fetida* ou *Lumbricus terrestris*	SPE 1/RM/43	Juin 2004	—
Essais de mesure de la levée et de la croissance de plantes terrestres exposées à des contaminants dans le sol	SPE 1/RM/45	Septembre 2004 (?)	—
Essai de mesure de la survie et de la reproduction de collemboles exposés à des contaminants dans le sol	SPE 1/RM/47	2005	—
B. — Méthodes de référence **			
Méthode de référence pour la détermination de la létalité aiguë d'effluents chez la truite arc-en-ciel	SPE 1/RM/13 1re édition	Juillet 1990	Mai 1996, décembre 2000
Méthode de référence pour la détermination de la létalité aiguë d'effluents chez la truite arc-en-ciel	SPE 1/RM/13 2e édition	Décembre 2000	—
Méthode de référence pour la détermination de la létalité aiguë d'effluents chez *Daphnia magna*	SPE 1/RM/14 1re édition	Juillet 1990	Mai 1996, décembre 2000
Méthode de référence pour la détermination de la létalité aiguë d'effluents chez *Daphnia magna*	SPE 1/RM/14 2e édition	Décembre 2000	—
Méthode d'essai biologique : méthode de référence pour la détermination de la létalité aiguë d'un sédiment pour des amphipodes marins ou estuariens	SPE 1/RM/35	Décembre 1998	—
Méthode de référence servant à déterminer la toxicité des sédiments à l'aide d'une bactérie luminescente dans en un essai en phase solide	SPE 1/RM/42	Avril 2002	—

** Dans cette collection, on entend par *méthode de référence* une méthode biologique particulière d'essai de la toxicité, c'est-à-dire une méthode écrite, assortie d'un ensemble explicite de consignes et de conditions décrites avec précision. Contrairement aux méthodes universelles (polyvalentes ou génériques) publiées par Environnement Canada, les *méthodes de référence* sont souvent limitées, dans leur emploi, aux essais exigés par un règlement particulier.

Titre de la méthode ou du guide	Nº de publication	Date de publication	Date des modifications applicables
C. — Documents d'orientation et guides			
Document d'orientation sur le contrôle de la précision des essais de toxicité au moyen de produits toxiques de référence	SPE 1/RM/12	Août 1990	—
Document d'orientation sur le prélèvement et la préparation de sédiments en vue de leur caractérisation physico-chimique et d'essais biologiques	SPE 1/RM/29	Décembre 1994	—
Document d'orientation sur la mesure de la précision des essais de toxicité sur sédiments dopés avec un produit toxique de référence	SPE 1/RM/30	Septembre 1995	—
Guide des essais écotoxicologiques employant une seule espèce et de l'interprétation de leurs résultats	SPE 1/RM/34	Décembre 1999	—
Guide des essais de pathogénicité et de toxicité de nouvelles substances microbiennes pour les organismes aquatiques et terrestres	SPE 1/RM/44	Mars 2004	—
Document d'orientation sur les méthodes statistiques permettant de déterminer les paramètres des essais de toxicité (titre provisoire)	SPE 1/RM/46	Octobre 2004 (?)	—

Composition du Groupe intergouvernemental sur l'écotoxicité (en décembre 2003)

Administration fédérale, Environnement Canada

C. Blaise
Centre Saint-Laurent
Montréal

M. Bombardier
Centre de technologie environnementale
Ottawa

U. Borgmann
Institut national de recherche sur les eaux
Burlington, Ontario

J. Bruno
Centre des sciences environnementales du Pacifique
North Vancouver (Colombie-Britannique)

C. Buday
Centre des sciences environnementales du Pacifique
North Vancouver

K. Doe
Centre des sciences de l'environnement de la région de l'Atlantique
Moncton

G. Elliott
Service de la protection de l'environnement
Edmonton

F. Gagné
Centre Saint-Laurent
Montréal

M. Harwood
Service de la protection de l'environnement
Montréal

D. Hughes
Centre des sciences de l'environnement de la région de l'Atlantique
Moncton

P. Jackman
Centre des sciences de l'environnement de la région de l'Atlantique
Moncton

N. Kruper
Service de la protection de l'environnement
Edmonton

M. Linssen
Centre des sciences environnementales du Pacifique
North Vancouver

D. MacGregor
Centre de technologie environnementale
Ottawa

L. Porebski
Direction du milieu marin
Gatineau (Québec)

J. Princz
Centre de technologie environnementale
Ottawa

G. Schroeder
Centre des sciences environnementales du Pacifique
North Vancouver

R. Scroggins
Centre de technologie environnementale
Ottawa

T. Steeves
Centre des sciences de l'environnement de la région de l'Atlantique
Moncton

D. Taillefer
Direction du milieu marin
Gatineau

Administration fédérale, Environnement Canada (suite)

S. Trottier
Centre Saint-Laurent
Montréal

G. van Aggelen (président)
Centre des sciences environnementales du Pacifique
North Vancouver

B. Walker
Centre Saint-Laurent
Montréal

P. Wells
Service de la conservation de l'environnement
Dartmouth (Nouvelle-Écosse)

Administration fédérale, Pêches et Océans Canada

R. Roy
Institut Maurice-Lamontagne
Mont-Joli (Québec)

Administration fédérale, Ressources naturelles Canada

J. McGeer
Laboratoire des sciences minérales, Centre canadien des minéraux et de l'énergie (CANMET)
Ottawa

B. Vigneault
Laboratoire des sciences minérales, CANMET
Ottawa

J. Beyak
Laboratoire des sciences minérales, CANMET
Ottawa

Provinces

C. Bastien
Ministère de l'Environnement du Québec
Sainte-Foy

B. Bayer
Environnement Manitoba
Winnipeg

M. Mueller
Ministère de l'Environnement de l'Ontario
Rexdale

D. Poirier
Ministère de l'Environnement de l'Ontario
Rexdale

J. Schroeder
Ministère de l'Environnement de l'Ontario
Rexdale

T. Watson-Leung
Ministère de l'Environnement de l'Ontario
Rexdale

Administration centrale et bureaux régionaux d'Environnement Canada

Administration centrale
351, boul. Saint-Joseph
Place Vincent-Massey
Gatineau (Québec)
K1A 0H3

Région de l'Ontario
4905, rue Dufferin, 2e étage
Downsview
M3H 5T4

Région de l'Atlantique
15e étage, Queen Square
45, Alderney Drive
Dartmouth, Nova Scotia
B2Y 2N6

Région des Prairies et du Nord
pièce 210, Twin Atria No. 2
4999, 98e avenue
Edmonton, Alberta
T6B 2X3

Région du Québec
8e étage,
105, rue McGill
Montréal
H2Y 2E7

Région du Pacifique et du Yukon *
401, rue Burrard
Vancouver
V6C 3S5

* En échange d'une disquette, on peut obtenir, pour le calcul de la CL 50, un programme de la Section d'écotoxicologie du Centre des sciences environnementales du Pacifique, 2645, route Dollarton, North Vancouver, BC, V7H 1B1.

Composition du Groupe consultatif scientifique (GCS)

Membres du GCS

M. Christian Bastien
Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec
Ministère de l'Environnement
2700, rue Einstein
Sainte-Foy, QC G1P 3W8
Tél. : (418) 643-8225
Téléc. : (418) 643-9023
Courriel : christian.bastien@menv.gouv.qc.ca

Dr Clive Edwards
Ohio State University
Department of Entomology
1735 Neil Avenue
Columbus, Ohio
USA 43210
Tél. : (614) 292-3786
Téléc. : (614) 688-4222
Courriel : soilecol@osu.edu

Dr Roman G. Kuperman
U.S. Army Edgewood Chemical Biological Center
AMSSB-RRT-TE E5641 DR KUPERMAN
5183 Blackhawk Road
Aberdeen Proving Ground, Maryland
USA 21010-5424
Tél. : (410) 436-4697
Téléc. : (410) 436-4846
Email: roman.kuperman@us.army.mil

Dr Roman P. Lanno
Ohio State University
Department of Entomology
1735 Neil Avenue
Columbus, Ohio
USA 43210
Tél. : (614) 292-4943
Téléc. : (614) 292-2180
Courriel : lanno.1@osu.edu

Dr Frank Riepert
Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft (BBA)
Königin-Luise-Str. 19
D-14195
Berlin, Germany
Tél. : 0049 30 8304 2406
Téléc. : 0049 30 8304 2403
Courriel : F.Riepert@bba.de

Dr Jöerg Römbke
ETC Oekotoxikologie GmbH
Boettgerstrasse 2-14
65439 Flörsheim am Main
Germany
Tél. : 49 6145 95640
Téléc. : 49 6145 95649 9
Courriel : J-Roembke@ect.de

Dr Geoffrey Sunahara
Conseil national de recherches Canada
Institut de recherche en biotechnologie
6100, avenue Royalmount
Montréal QC H4P 2R2
Tél. : (514) 496-8030
Téléc. : (514) 496-6265
Courriel : geoffrey.sunahara@nrc.ca

M. Graham van Aggelen
Environnement Canada
Centre des sciences environnementales du Pacifique
2645, route Dollarton
North Vancouver, BC V7H 1B1
Tél. : (604) 924-2513
Téléc. : (604) 924-2555
Courriel : graham.vanaggelen@ec.gc.ca

Dr Kees van Gestel
Institute of Ecological Science
Vrije Universiteit
De Boelelaan 1087
1081 HV Amsterdam
The Netherlands
Tél. : 31 20 444-7079/7004
Téléc. : 31 20 444-7123
Courriel : gestel@bio.vu.nl

Dr Suzanne Visser
Département des sciences biologiques
Université de Calgary
2500, University Drive NW
Calgary, AL T2N 1N4
Tél. : (403) 220-6375
Téléc. : (403) 289-9311
Courriel : svisser@acs.ucalgary.ca

Autorité scientifique

M. Rick Scroggins
Environnement Canada
Division des méthodes biologiques
Centre de technologie environnementale
335, River Road
Ottawa K1A 0H3
Tél. : (613) 990-8569
Téléc. : (613) 990-0173
Courriel : rick.scroggins@ec.gc.ca

Consultants

Dr Don McLeay
McLeay Environmental Ltd.
2999, Spring Bay Road
Victoria, BC V8N 5S4
Tél. : (250) 472-2608
Téléc. : (250) 472-2609
Courriel : mcleayenvir@islandnet.com

Ms. Gladys Stephenson
Aquaterra Environmental Ltd.
RR1, Site 5936
Orton, ON L0N 1N0
Tél. : (519) 836-6050
Téléc. : (519) 836-2493
Courriel : gstephenson@stantec.com

Variantes de modes opératoires pour l'élevage d'*Eisenia andrei/fetida*, décrites dans les méthodes d'essai et les guides internationaux pour la mesure de la toxicité de sols à l'aide de ces espèces de vers de terre

Les documents de base ci-dessous sont énumérés dans l'ordre chronologique, sous le sigle de l'organisme dont ils émanent plutôt que sous le nom de l'auteur.

OCDE (1984) — la ligne directrice normalisée pour l'essai de mesure de la toxicité de substances chimiques pour les vers de terre (*E. fetida*) pendant 14 jours d'exposition, publiée par l'Organisation de coopération et de développement économiques (Paris), en 1984.

USEPA (1989) — le protocole de l'essai de létalité, d'une durée de 14 jours employant le lombricidé *Eisenia fetida*, publié en février 1989 par l'Agence de protection de l'environnement des États-Unis (USEPA) [coauteurs : J.C. Greene, C.L. Bartels, W.J. Warren-Hicks, B.R. Parkhurst, G.L. Linder, S.A. Peterson et W.E. Miller] parmi plusieurs autres protocoles de dépistage de la toxicité à court terme des décharges de déchets dangereux.

ISO (1993) — méthode normalisée internationale pour la mesure de la toxicité d'un sol à l'aide d'un essai de létalité d'une durée de 14 jours employant *Eisenia fetida*, publiée en 1993 par l'Organisation internationale de normalisation, à Genève.

ISO (1998) — méthode normalisée internationale d'un essai de mesure de la toxicité d'un sol par ses effets sur la reproduction d'*Eisenia fetida*, publiée en 1998 par l'Organisation internationale de normalisation, à Genève.

ASTM (1999b) — le guide normalisée de la réalisation d'essais de mesure de la toxicité d'un sol employant le lombricidé *Eisenia fetida*, rédigé pour l'American Society for Testing and Materials (ASTM) sous la gouverne du sous-comité E47.03 de toxicologie des sédiments de l'ASTM, publié en février 1998. Les modes opératoires qui y sont décrits sont propres à la réalisation d'essais d'une durée de 14 jours pour mesurer la survie d'*E. fetida* exposé à des concentrations multiples de sol contaminé. Ces modes opératoires sont résumés dans le présent document.

EC (2000a) — le mode opératoire normalisé pour l'élevage d'*Eisenia andrei*, rédigé en décembre 2000 par D. Moul, pour le Centre des sciences environnementales du Pacifique d'Environnement Canada, à North Vancouver.

OCDE (2000) — ébauche de proposition de ligne directrice normalisée pour l'évaluation des effets de substances chimiques sur la reproduction du ver de terre *Eisenia fetida*, dont l'Organisation de coopération et de développement économiques (Paris) envisage la publication.

1 Source des géniteurs de l'élevage

Document [1]	Source initiale
OCDE (1984)	Pour obtenir des vers de poids et d'âge normalisés, le mieux est d'entreprendre l'élevage avec des cocons ; on peut s'en procurer dans le commerce ou les obtenir d'une source centrale de distribution, pour s'assurer de l'emploi de la même lignée.
USEPA (1989)	On peut obtenir des élevages de démarrage de Vittor & Associates, 8100, Cottage Hill Road, Mobile, AL, 36695.
ISO (1993)	Pour obtenir des vers de poids et d'âge normalisés, le mieux est d'entreprendre l'élevage avec des cocons.
ISO (1998)	Pour obtenir des vers de poids et d'âge normalisés, le mieux est d'entreprendre l'élevage avec des cocons.
ASTM (1999b)	On pourrait obtenir les élevages de démarrage auprès de divers laboratoires, institutions et firmes biologiques ; on peut trouver *E. fetida* dans les tas de fumier ; les élevages de vers pour la pêche pourraient renfermer des mélanges d'*E. fetida fetida* et d'*E. fetida andrei* ; il importe de s'assurer de la pureté de l'élevage ; on devrait identifier les *E. fetida* capturés sur le terrain (jusqu'à la sous-espèce) par l'examen de vers adultes [2].
EC (2000a)	On se procure des vers adultes auprès d'éleveurs de bonne réputation.
OCDE (2000)	Pour obtenir des vers de taille (poids) et d'âge normalisés, le mieux est d'entreprendre l'élevage avec des cocons.

1. V. page précédente.
2. À cette fin, la clé taxinomique de Fender (1985) est utile.

2 Enceintes d'élevage et leur capacité

Document	Type d'enceinte et dimensions	Nombre d'unités et capacité de production de substrat ou de vers
OCDE (1984)	Des boîtes de bois mesurant environ 50 × 50 × 15 cm et fermant juste sont idéales pour la production à grande échelle.	En six semaines, on peut produire plus de 1 000 vers [2].
USEPA (1989)	Récipients de verre, de polyéthylène ou de bois, de taille convenable pour la manipulation et le transport ; couvercle de verre percé d'orifices d'aération.	Maintien d'au moins 4 de ces récipients d'élevage pour assurer la production continue d'un nombre suffisant de vers
ISO (1993)	Des boîtes servant à la reproduction (en bois ou tout autre récipient de peu de profondeur) d'une capacité de 10 à 50 L conviennent.	n. i. [3]
ISO (1998)	Des boîtes servant à la reproduction d'une capacité de 10 à 50 L conviennent.	n. i.
ASTM (1999b)	Bacs de plastique mesurant environ 34 × 28 × 14 cm, recouverts (par ex. de plastique)	700 g (poids sec) de tourbe à sphaignes, hydratée avec environ 2300 mL d'eau utilisée comme réactif.
EC (2000a)	Bacs de plastique mesurant environ 53 × 38 × 30 cm, à couvercle opaque, percé d'orifices, d'autres orifices se trouvant près du rebord latéral supérieur [1].	On peut introduire 1 000 adultes dans le bac pour entreprendre un nouvel élevage.
OCDE (2000)	Des boîtes de reproduction de 10 à 50 L de capacité conviennent.	n. i.

1. Un fournisseur propose un bac à double paroi, doté d'orifices de drainage, au fond du bac intérieur, pour permettre de recueillir, dans le bac extérieur, l'excès d'humidité de la litière.
2. Une enceinte de reproduction de ces dimensions peut héberger 1 kg de vers pouvant peser chacun 1 g, dans 20 kg de déchets.
3. Non indiqué.

3 Température et éclairage pendant l'élevage

Document	Température (°C)	Conditions d'éclairage
OCDE (1984)	20	n. i. [1]
USEPA (1989)	22 ± 2	obscurité ininterrompue
ISO (1993)	20 ± 2	n. i.
ISO (1998)	20 ± 2	n. i.
ASTM (1999b)	22 ± 3	éclairage ininterrompu
EC (2000a)	20 ± 4	éclairage ininterrompu
OCDE (2000)	20 ± 2	n. i.

1. Non indiqué.

4 Substrat d'élevage

Document	Substrat d'élevage	pH	Conditions de renouvellement du substrat
OCDE (1984)	Mélange 1/1 de fumier de cheval ou de bovins et de tourbe [1]	Il devrait être d'environ 7,0.	n. i. [9]
USEPA (1989)	Litière de tourbe [2, 3]	L'ajuster à 5-8, au moyen de $CaCO_3$ [7].	Tous les 2 ou 3 mois [10]
ISO (1993)	Mélange 1/1 de fumier de cheval ou de bovins et de tourbe [1, 3]	Il devrait être d'environ 5-7 [8].	n. i.
ISO (1998)	Mélange 1/1 de fumier de cheval ou de bovins et de tourbe [1, 3]	Il devrait être d'environ 6-7 [8].	n. i.
ASTM (1999b)	Litière de tourbe à sphaignes, hydratée [4]	Il devrait être d'environ 7,0 [8].	Renouveler la litière périodiquement [11]
EC (2000a)	Mélange de sol artificiel [5], de papier journal déchiqueté et de tourbe [2, 6]	Il devrait être de 7-8 [8].	Renouveler la litière à tous les 2 ou 3 mois [10, 11].
OCDE (2000)	Mélange 1/1 de fumier de cheval ou de bovins et de tourbe [1, 3]	Il devrait être d'environ 6-7 [8].	Introduire périodiquement les vers dans un substrat frais.

1. D'autres fumiers conviennent également. Le milieu devrait posséder une faible conductivité (< 6,0 mS) et ne pas être excessivement contaminé par l'ammoniaque ou les déjections animales.
2. Il faut veiller à éviter une hydratation excessive. Éviter l'accumulation d'eau stagnante dans le fond du récipient d'élevage. Ajouter de l'eau lorsque la litière semble sèche en surface.
3. Le substrat devrait être humide, mais non trop mouillé.
4. Hydrater avec de l'eau distillée ou désionisée. On devrait vérifier hebdomadairement l'humidité. Il ne devrait pas y avoir d'eau stagnante dans le fond du bac, tandis que la surface de la litière ne devrait pas être sèche.
5. V. tableau 3 de l'annexe E.
6. À l'origine, le mélange est préconditionné (humidifié) 2 à 4 semaines avant l'introduction des vers.
7. On ajuste le pH en ajoutant jusqu'à 3 % en poids de $CaCO_3$ à la litière de tourbe.
8. On ajoute du $CaCO_3$ tant qu'on n'a pas atteint ce pH.
9. Non indiqué.
10. La tourbe tend à se gorger d'eau avec le temps, et l'anaérobiose s'installe, comme le montre l'apparition d'une mauvaise odeur et l'altération de la couleur entre le fond de la litière et la tranche supérieure 2,5-5 cm.
11. Pour renouveler la litière, préparer un bac de litière fraîche, déposer la vieille litière sur celle-ci. Laisser reposer, à découvert, dans l'enceinte d'élevage soumise à un éclairage ininterrompu, pendant 2 jours, puis se débarrasser de la vieille litière. En procédant ainsi, on ne récupère pas les cocons, et certains vers demeurent dans la vieille litière.

5 Alimentation pendant l'élevage

Document	Description de la nourriture distribuée	Quantité et mode d'alimentation	Fréquence des repas
OCDE (1984)	Déjections animales [1]	50 % du substrat [1]	En continu [1]
USEPA (1989)	Agglomérés de luzerne [2], saturés d'eau et ayant subi une maturation de 2 semaines avant usage	Saupoudrer à la surface du bac d'élevage.	n. i.
ISO (1993)	Déjections animales [1]	50 % du substrat [1]	En continu [1]
ISO (1998)	Déjections animales [1]	50 % du substrat [1]	En continu [1]
ASTM (1999b)	Agglomérés de luzerne [2], saturés d'eau et ayant subi une maturation de 2 semaines avant usage	Saupoudrer à la surface du bac d'élevage [5].	Une ou deux fois par semaine [7]
EC (2000a)	Cubes de luzerne [2, 4], saturés d'eau	Saupoudrer à la surface de la litière d'élevage.	Une fois par semaine [8]
OCDE (2000)	Déjections animales [1]	50 % du substrat [1]	En continu [1]

1. V. tableau 4 de la présente annexe.
2. On peut obtenir de la luzerne séchée (sous forme d'agglomérés ou de cubes) chez les fournisseurs d'aliments du bétail.
3. Le laboratoire d'Environnement Canada au Centre des sciences environnementales du Pacifique utilise dorénavant des agglomérés de luzerne (Moul, 2001).
4. On recommande un rapport d'environ 1 g d'agglomérés secs pour 2 mL d'eau d'essai.
5. On saupoudre à la surface de la litière une quantité que l'on a calculée comme devant être consommée avant le prochain repas.
6. Non indiqué.
7. La fréquence des repas dépend du nombre de vers dans le bac. À chaque repas, se débarrasser des restes du repas précédent.
8. Avant de distribuer la nourriture, on se débarrasse des restes du repas de la semaine précédente.

6 Maintien et rythme de développement de l'élevage

Document	Maintien de l'élevage	Rythme de développement
OCDE (1984)	n. i.[1]	Les vers éclosent au bout de 3 ou 4 semaines et parviennent à maturité au bout de 7 ou 8 semaines.
USEPA (1989)	Il faut éviter la surpopulation[2] ; à cette fin, on sépare la litière en deux parties, à tous les 3 ou 4 mois, avec un mélange de tourbe au pH ajusté.	Les vers parviennent à maturité en 7 ou 8 semaines[7].
ISO (1993)	Placer les vers adultes dans une boîte de reproduction avec du substrat frais, puis les en retirer après 14 à 21 jours[3] ; les vers éclos des cocons servent aux essais lorsqu'ils arrivent à maturité.	Les vers parviennent à maturité après 2 ou 3 mois.
ISO (1998)	Placer les vers adultes dans une boîte de reproduction avec du substrat frais, puis les en retirer après 14 à 28 jours[3] ; les vers éclos des cocons servent aux essais lorsqu'ils arrivent à maturité.	Les vers parviennent à maturité après 2 ou 3 mois.
ASTM (1999b)	Au moment des repas, retourner la litière à la main pour inspecter l'état général des vers et de la litière ; se débarrasser des cadavres ; le chargement (densité de peuplement)[4, 5] devrait être d'au plus 0,03 g/cm^3.	On a signalé, à 25 °C, un cycle évolutif de seulement 52 j environ ; typiquement la longévité d'*E. fetida* est d'une année ou deux.
EC (2000a)	Une fois par semaine, on inspecte le bac pour examiner la santé des vers et pour surveiller le surpeuplement[6].	Le cycle évolutif d'*E. andrei* varie de 50 à 166 j (selon la température).
OCDE (2000)	Placer les vers adultes dans une boîte de reproduction avec du substrat frais, puis les en retirer après 14 à 21 jours[3] ; les vers éclos des cocons servent aux essais lorsqu'ils arrivent à maturité.	Les vers parviennent à maturité après au moins 2 mois.

1. Non indiqué.
2. Le surpeuplement diminue la vitesse de croissance et l'efficacité de la reproduction.
3. Ces vers adultes peuvent être employés dans d'autres lots de reproducteurs.
4. Pour une reproduction optimale, les bacs renfermant 9 000 cm^3 de litière devraient héberger, au maximum, 245 g de vers (par ex. 350 adultes de 700 mg chacun), c'est-à-dire que le chargement devrait être d'au plus 0,03 g/cm^3.
5. Pour réduire la population de vers dans un bac surpeuplé, préparer un bac de litière neuve et déposer la moitié de cette dernière sur une feuille de plastique ; déposer ensuite la moitié de la litière du bac surpeuplé dans le nouveau bac et mélanger la litière à la main ; mélanger le reste de la litière neuve, se trouvant sur la feuille de plastique, avec le contenu du bac de vieille litière.
6. Si les bacs de vers présentent des signes de surpeuplement, on devrait en diviser le contenu. À cette fin, préparer un bac de litière neuve et en déposer la moitié sur une feuille de plastique. On dépose la moitié de la vieille litière, renfermant une partie des vers, dans le bac de litière neuve et on mélange la litière à la main. On ajoute ensuite au bac de vieille litière la moitié de la litière neuve se trouvant sur la feuille de plastique et on mélange.
7. *E. fetida* est très prolifique ; un seul ver produit de 2 à 5 cocons par semaine, chacun renfermant plusieurs vers.

7 Indices de santé et d'acceptabilité des élevages, âge des vers utilisés dans les essais de toxicité

Document	Indices de santé et d'acceptabilité des élevages	Âge des vers utilisés dans les essais de toxicité
OCDE (1984)	n. i. [1]	Adultes (avec clitellum) d'au moins 2 mois.
USEPA (1989)	n. i.	Adultes (avec clitellum) d'au moins 2 mois.
ISO (1993)	n. i.	Adultes (ayant atteint la maturité sexuelle) d'au moins 2 mois.
ISO (1998)	n. i.	Adultes (ayant atteint la maturité sexuelle) de 2 à 12 mois.
ASTM (1999b)	On se débarrasse des bacs d'élevage ou on les met de côté pour observation approfondie si on trouve de nombreux vers morts ou apparemment stressés pendant les périodes d'observation [2].	n. i. (employer des adultes dont le clitellum a atteint son plein développement).
EC (2000a)	On se débarrasse de tout vert mort trouvé pendant l'inspection hebdomadaire des bacs d'élevage, et on désigne le ou les bacs pour des examens plus fréquents ; on évalue les dossiers de santé des élevages par leur sensibilité à un toxique de référence.	n. i. (chaque adulte doit peser plus de 300 mg).
OCDE (2000)	On considère que les vers sont en bonne santé s'ils se déplacent dans le substrat, n'essaient pas de le fuir et s'y reproduisent sans interruption ; la très grande lenteur des vers et la coloration jaune de leur extrémité postérieure sont des signes d'épuisement du substrat [3].	Adultes (ayant atteint la maturité sexuelle) de 2 à 12 mois.

1. Non indiqué
2. V. tableau 6 de la présente annexe.
3. Dans ce cas, il est recommandé de fournir du substrat frais et/ou de diminuer le taux de chargement.

Variantes de modes opératoires des essais de létalité d'une durée de 14 jours visant à mesurer la toxicité de sols pour des vers de terre (*Eisenia andrei/fetida*), décrites dans les méthodes internationales

Les documents de base ci-dessous sont énumérés dans l'ordre chronologique, sous le sigle de l'organisme dont ils émanent plutôt que sous le nom de l'auteur.

OCDE (1984) — la ligne directrice normalisée pour l'essai de mesure de la toxicité de substances chimiques pour les vers de terre (*E. fetida*) pendant 14 jours d'exposition, publiée par l'Organisation de coopération et de développement économiques (Paris), en 1984.

USEPA (1989) — le protocole de l'essai de létalité, d'une durée de 14 jours employant le lombricidé *Eisenia fetida*, publié en février 1989 par l'Agence de protection de l'environnement des États-Unis (USEPA) [coauteurs : J.C. Greene, C.L. Bartels, W.J. Warren-Hicks, B.R. Parkhurst, G.L. Linder, S.A. Peterson et W.E. Miller] parmi plusieurs autres protocoles de dépistage de la toxicité à court terme des décharges de déchets dangereux.

ISO (1993) — méthode normalisée internationale pour la mesure de la toxicité d'un sol à l'aide d'un essai de létalité d'une durée de 14 jours employant *Eisenia fetida*, publiée en 1993 par l'Organisation internationale de normalisation, à Genève.

ASTM (1999b) — le guide normalisée de la réalisation d'essais de mesure de la toxicité d'un sol employant le lombricidé *Eisenia fetida*, rédigé pour l'American Society for Testing and Materials (ASTM) sous la gouverne du sous-comité E47.03 de toxicologie des sédiments de l'ASTM, publié en février 1998. Les modes opératoires qui y sont décrits sont propres à la réalisation d'essais d'une durée de 14 jours pour mesurer la survie d'*E. fetida* exposé à des concentrations multiples de sol contaminé. Ces modes opératoires sont résumés dans le présent document.

EC (2000b) — le mode opératoire normalisé d'essais de létalité d'une durée de 14 jours visant à mesurer la toxicité d'un sol avec le ver de terre *Eisenia andrei*, rédigé en décembre 2000 par D. Moul, pour le Centre des sciences environnementales du Pacifique d'Environnement Canada, à North Vancouver.

1 Type et durée de l'essai, particularités des organismes d'expérience, au début de l'essai

Document	Espèce	Type d'essai	Durée de l'essai (jours)	Description des organismes au début de l'essai	Poids frais des vers au début de l'essai
OCDE (1984)	*E. fetida*	En conditions statiques	141	Adultes élevés en laboratoire, d'au moins 2 mois, pourvus d'un clitellum	300-600
USEPA (1989)	*E. fetida*	En conditions statiques	14	Adultes élevés en laboratoire, d'au moins 2 mois, pourvus d'un clitellum [3]	300-500
ISO (1993)	*E. fetida*	En conditions statiques	141	Adultes d'élevage, d'au moins 2 mois, pourvus d'un clitellum	300-600
ASTM (1999b)	*E. fetida*	En conditions statiques	142	Adultes élevés en laboratoire, pourvus d'un clitellum [4, 5]	n. i.[5]
EC (2000b)	*E. andrei*	En conditions statiques	141	Adultes élevés en laboratoire, pourvus d'un clitellum [4]	> 300

1. On mesure la mortalité à 7 et à 14 jours. Après l'évaluation de 7 jours, on retourne tous les vers survivants et la matière à l'étude dans l'enceinte expérimentale et on poursuit l'essai pendant encore 7 jours.
2. L'évaluation à 7 jours est facultative.
3. Il est préférable de se procurer les vers de terre auprès d'une unité d'élevage interne ; les vers devraient provenir du même vivarium d'élevage.
4. On devrait obtenir la biomasse des vers de terre de chaque enceinte expérimentale.
5. Le laboratoire devrait utiliser des enceintes séparées, à température constante, pour l'élevage et l'essai, afin de réduire la possibilité de contamination par les matières à l'étude et d'autres substances (particulièrement des composés volatils).
6. Non indiqué.

2 Enceintes expérimentales et matériaux

Document	Enceinte expérimentale	Couvercle ou pellicule d'obturation	Type de sol à l'étude [1, 2]	Quantité de sol par enceinte (g)
OCDE (1984)	Becher ou plat de verre d'une capacité d'environ 1 L	Couvercle de verre ou pellicule de plastique perforée	SA	750, poids frais
USEPA (1989)	Bocal de conserve en verre d'une capacité d'une chopine	Rondelle et couvercle vissant percé d'un orifice d'environ 0,3 cm de diamètre	SA, DS et mélanges de ces deux derniers	200, poids sec
ISO (1993)	Récipient en verre d'une capacité de 1 à 2 L	n. i. (non serré)	SA	500, poids sec
ASTM (1999b)	Bocal de conserve en verre de 473 mL	Rondelle et couvercle vissant percé d'un orifice de 1 à 2 mm de diamètre	SA, SEE, SR, SAE, SEEE, SRE ou mélanges de ces derniers	200, poids sec
EC (2000b)	Bocal de verre de 500 mL	Couvercle de métal avec, au milieu, un orifice d'environ 4 mm de diamètre	SA, SEE, B, SR, SAE, SEEE, SRE ou mélanges de ces derniers	200, poids sec

1. V. les descriptions du tableau 3 de la présente annexe.
2. B : boue (industrielle ou domestique) ; DS : déchet solide ; SA : sol artificiel ; SAE : sol artificiel enrichi ; SEE : sol d'emplacement à l'étude ; SEEE : sol enrichi d'un emplacement à l'étude ; SR : sol de référence ; SRE : sol de référence enrichi.
3. Non indiqué.

3 Description des sols à l'étude, y compris la composition du sol artificiel

Document	Description du sol ou des sols à l'étude	Description du sol artificiel [1]
OCDE (1984)	Sol artificiel additionné de la substance à l'étude (par ex. substance chimique dans l'eau désionisée ou mélangée à du sable quartzeux fin.	10 % de tourbe à sphaignes, 20 % d'argile kaolinique avec plus de 30 % de kaolinite et 70 % de sable quartzeux avec plus de 50 % de particules de 50 à 200 µm.
USEPA (1989)	Déchet dangereux solide (sol contaminé) ou substances en solution aqueuse, mélangées à du sol artificiel.	10 % de tourbe à sphaignes tamisée (2,36 mm), 20 % d'argile kaolinitique et 70 % de sable de silice grade 70.
ISO (1993)	Sol artificiel additionné de la substance à l'étude (par ex. substance chimique dans l'eau désionisée ou dans un solvant organique ; si insoluble : mélanger à du sable quartzeux fin.	10 % de tourbe à sphaignes, 20 % d'argile kaolinique avec au moins 30 % de kaolinite et 70 % de sable quartzeux avec plus de 50 % de particules de 50 à 200 µm. Ajuster à pH 6,0 ± 0,5 au moyen de $CaCO_3$.
ASTM (1999b)	Sol de référence ou sol d'un emplacement potentiellement toxique ; sol additionné de composés ou sol dilué avec du sol de référence ou du sol artificiel.	10 % de tourbe à sphaignes tamisée (2,36 mm), 20 % d'argile kaolinique de granulométrie inférieure à 40 µm et 70 % de sable de silice grade 70.
EC (2000b)	Sol de référence ou sol d'un emplacement potentiellement toxique ; boue domestique ou industrielle ; sol additionné de substances ; sol dilué avec du sol artificiel.	10 % de tourbe à sphaignes tamisée (2,36 mm), 20 % d'argile kaolinique et kaolinitique et 70 % de sable de silice grade 70. Ajuster au pH 7,0 par ajout de $CaCO_3$.

1. Les pourcentages sont exprimés par rapport au poids sec.

4 Description du sol témoin et du sol de référence

Document	Description du sol témoin	Description du sol de référence
OCDE (1984)	Sol artificiel [1], traité avec le même solvant que celui dont on s'est servi pour le sol à l'étude.	S. o. [2]
USEPA (1989)	100 % de sol artificiel [1].	N. i. [3]
ISO (1993)	Sol artificiel [1] ; utiliser un témoin supplémentaire (témoin du solvant) si un autre solvant que l'eau a servi à dissoudre la substance à l'étude.	S. o. [2]
ASTM (1999b)	Sol artificiel [1] ou sol de référence non contaminé, provenant du terrain, aux caractéristiques semblables à celles du sol ou des sols à l'étude ; utiliser un témoin supplémentaire (témoin du solvant) si un autre solvant que l'eau a servi à dissoudre la substance.	L'essai peut également comporter un sol de référence si le témoin négatif est un sol artificiel.
EC (2000b)	Sol artificiel [1].	Le sol provenant d'un secteur qui n'a pas été cultivé ni traité aux pesticides ni aux engrais au cours des 25 dernières années, possédant des caractéristiques géochimiques semblables à celles du sol ou des sols à l'étude.

1. V. tableau 3 de la présente annexe.
2. Sans objet.
3. Non indiqué.
4. Le sol de référence devrait être séché à l'air jusqu'à l'obtention d'une humidité de 10 à 20 %, puis tamisé (4-9 mm) et, enfin, entreposé à pas plus de 8 °C.

5 Entreposage et caractérisation du sol à l'étude

Document	Conditions d'entreposage	Caractérisation du sol
OCDE (1984)	N. i. [1], s. o. [2]	L'humidité après hydratation [3] (sécher le sous-échantillon à 105 °C, puis le peser de nouveau).
USEPA (1989)	Sceller dans le plastique ; refroidir à 4 °C ; expédier sur glace ; maintenir à 4 °C ; entreprendre l'essai dans les 24 h suivant le prélèvement.	Le pH au début et à la fin de l'essai ; le COT, à chaque concentration d'essai, y compris dans le témoin.
ISO (1993)	N. i. [1], s. o. [2]	L'humidité après hydratation [3].
ASTM (1999b)	Sceller dans le plastique ; entreposer à 4 ± 2 °C pendant pas plus de 2 semaines ; ne pas congeler.	Au moins le pH, le COT, la CEC, N, les SLA, l'eau [4] ; les contaminants auxquels on s'intéresse.
EC (2000b)	Conserver à l'obscurité à 4 ± 2 °C pendant pas plus de 2 semaines.	L'humidité et le pH.

1. Non indiqué.
2. Sans objet (sol artificiel préparé, hydraté, puis utilisé).
3. V. tableaux 3 et 6 de la présente annexe.
4. CEC : capacité d'échange cationique ; COT : carbonique organique total ; N : azote total ; pH : concentration des ions hydrogène ; SLA : pourcentages de sables, de limons et d'argiles. L'eau est la teneur en humidité (%), déterminée par séchage d'un sous-échantillon pendant 24 h à 100 °C, puis nouvelle pesée.

6 Manipulations du sol avant l'essai

Document	Mélange	Hydratation	Ajustement du pH
OCDE (1984)	Réunir les constituants secs dans les bonnes proportions et mélanger à fond ; mélanger de nouveau après hydratation.	Mesurer l'humidité ; ajouter de l'eau désionisée jusqu'à ce que l'humidité représente environ 35 % du poids sec [1].	Ajuster à 6,0 ± 0,5, au moyen de $CaCO_3$.
USEPA (1989)	Homogénéiser la matière à l'étude ; mélanger dans un mélangeur avec du sol artificiel ; hydrater.	Hydrater à 75 % de la capacité de rétention en eau (CRE) au moyen d'eau désionisée.	Peut-être, si le pH est inférieur à 4 ou supérieur à 10 [2].
ISO (1993)	Réunir les constituants secs dans les bonnes proportions et mélanger à fond ; mélanger de nouveau après hydratation.	Hydrater à 40-60 % de la CRE au moyen d'eau désionisée ou distillée.	Par l'addition de $CaCO_3$, on ajuste le pH à 6,0 ± 0,5.
ASTM (1999b)	Tamiser (mailles de 6,30 mm) ; mélanger ; mesurer l'humidité ; hydrater.	Hydrater chaque sol à l'étude à 35-45 % du poids sec.	Les essais pourraient englober un sol au pH ajusté.
EC (2000b)	Tamiser au besoin, auquel cas l'humidité doit se situer entre 0 et 10-20 % ; mélanger ; hydrater.	Hydrater chaque sol à l'étude à environ 35 % du poids sec.	N. i. [3] (intervalle de pH d'essai : > 4 ; < 10).

1. Chez certaines tourbes, une humidité supérieure à 35 % pourrait convenir.
2. Si le pH se trouve à l'extérieur de la fourchette de 4 à 10, les résultats pourraient refléter une toxicité imputable au pH. La modification du pH du sol peut augmenter ou diminuer (selon leur nature) la toxicité des contaminants qui s'y trouvent.
3. Non indiqué.

7 Essai préliminaire : nombre d'organismes par enceinte, nombre de répétitions par variante expérimentale et, dans le cas d'un essai à plusieurs concentrations, nombre de concentrations par échantillon

Document	Nombre de vers par enceinte	Nombre de répétitions par variante ou concentration	Nombre de concentrations par échantillon ou matière à l'étude	Coefficient recommandé de dilution
OCDE (1984) [1]	N. i. [2]	N. i.	Environ 6 plus le témoin	Série géométrique [3]
USEPA (1989)	N. i.	N. i.	N. i.	N. i.
ISO (1993)	10	1	5 plus le témoin	Série géométrique [4]
ASTM (1999b)	N. i.	N. i.	Au moins 3 plus le témoin	Série géométrique [5]
EC (2000b)	N. i.	N. i.	N. i.	N. i.

1. Un essai préliminaire (de recherche de la gamme de concentrations à utiliser) est facultatif.
2. Non indiqué.
3. Chaque concentration devrait être le décuple de la précédente (par ex. 0,01, 0,1, 1,0, 10, 100 et 1 000 mg/kg, poids sec).
4. Chaque concentration devrait être le décuple de la précédente (par ex. 0,1, 1,0, 10, 100 et 1 000 mg/kg, poids sec).
5. Chaque concentration devrait être le décuple de la précédente.

8 Essai définitif : nombre d'organismes par enceinte, nombre de répétitions par variante expérimentale et, dans le cas d'un essai à plusieurs concentrations, nombre de concentrations par échantillon

Document	Nombre de vers par enceinte	Nombre de répétitions par variante ou concentration	Nombre de concentrations par échantillon ou matière à l'étude	Coefficient recommandé de dilution
OCDE (1984)	101	4	5 plus le témoin	Série géométrique
USEPA (1989)	10	3	Au moins 5 plus le témoin	0,5 (par ex. 100 %, 50 %, 25 %, 12,5 %, 6,25 %, 3,13 %, 1,56 %, 0,0 %)
ISO (1993)	10	4	5 plus le témoin	Série géométrique
ASTM (1999b)	10	Au moins 3	Au moins 5 plus le témoin	N. i. [2]
EC (2000b)	10	3	Au moins 5 plus le témoin	N. i.

1. On conditionne les vers pendant 24 h dans un sol artificiel, puis on les lave rapidement avant de les employer.
2. Non indiqué.

9 Température, éclairage et alimentation pendant l'essai

Document	Température (°C)	Éclairage	Alimentation ?
OCDE (1984)	20 ± 2	Éclairage ininterrompu ; intensité : 400-800 lux	N. i. [3]
USEPA (1989)	20 ± 2 [1]	Éclairage ininterrompu ; intensité : éclairage ambiant (~ 540-1 080 lux)	Ne pas nourrir les vers.
ISO (1993)	20 ± 2	Intensité : 400-800 lux, sur les enceintes ; photopériode de 12 à 16 h	N. i. [3]
ASTM (1999b)	20 ± 3 [2]	Éclairage ininterrompu ; fluorescent ou à incandescence ; 400-1 080 lux	Ne pas nourrir les vers.
EC (2000b)	20 ± 4	Éclairage ininterrompu, à spectre continu	N. i. [3]

1. Température du sol. Surveiller constamment la température dans l'enceinte témoin des conditions d'ambiance.
2. Surveiller pendant la durée de l'essai. On recommande l'emploi d'un thermographe à enregistrement continu.
3. Non indiqué. On suppose que l'on ne voulait pas nourrir les vers pendant l'essai.

10 Mesures et observations biologiques effectuées pendant l'essai

Document	Mesures [1]	Observations biologiques
OCDE (1984)	L'humidité du sol artificiel au début et à la fin de l'essai ; le pH au début.	Le poids frais moyen correspondant à chaque variante expérimentale, au début et à la fin de l'essai ; le nombre de vers vivants et morts dans chaque répétition, aux jours 7 et 14 ; les symptômes pathologiques évidents ou les modifications évidentes du comportement.
USEPA (1989)	Le pH au début et à la fin de l'essai ; le COT correspondant à chaque concentration ; la température du laboratoire en continu.	Le nombre de vers vivants et morts dans chaque répétition, aux jours 7 et 14.
ISO (1993)	L'humidité et le pH du sol artificiel au début de l'essai ; l'humidité et le pH de chaque répétition à la fin.	Le poids frais moyen par répétition, au début et à la fin de l'essai ; le nombre de vers vivants, dans chaque répétition, aux jours 7 et 14 ; les symptômes pathologiques évidents ou les modifications nettes du comportement.
ASTM (1999b)	Le pH, l'humidité et la salinité correspondant à chaque variante expérimentale au début et à la fin de l'essai ; la température du laboratoire en continu.	Le nombre de vers vivants et morts, dans chaque répétition, au jour 14 (et, facultativement, au jour 7) ; facultativement, le poids frais moyen correspondant à chaque répétition, au début et à la fin de l'essai [2] ; facultativement, les symptômes pathologiques évidents ou les modifications nettes du comportement (par ex. fouissement ou absence de fouissement à toutes les 24 h).
EC (2000b)	Le pH correspondant à chaque variante expérimentale, au début et à la fin de l'essai ; l'humidité correspondant à chaque variante expérimentale, au début et (facultativement) à la fin ; la température du laboratoire.	Les vers ayant foui ou non à 24 h ; le nombre de vers morts dans chaque répétition, aux jours 1, 7 et 14 ; le poids frais moyen, par répétition, au début de l'essai.

1. COT : carbone organique total ; pH : concentration des ions hydrogène.
2. Si la perte de poids est un effet à mesurer, on devrait s'assurer, avant de les peser, que les vers ont évacué tout le contenu de leur tube digestif. On les place dans des boîtes de Petri, sur papier filtre humide, pendant 24 h.

11 Conclusion de l'essai, effets biologiques mesurés et paramètres statistiques

Document	Conclusion de l'essai	Effets biologiques mesurés	Paramètres statistiques
OCDE (1984)	Verser le contenu de l'enceinte dans un bac ou sur un plateau de verre, trier les vers, vérifier la réaction à un stimulus mécanique exercé sur l'extrémité antérieure du ver.	Le taux (%) de mortalité, à chaque concentration, aux jours 7 et 14.	La CL 50 après 7 j et la CL 50 après 14 j [1] (mg/kg de poids sec)
USEPA (1989)	Compter les vers vivants et morts dans chaque enceinte, aux jours 7 et 14.	Le taux (%) de mortalité, à chaque concentration, aux jours 7 et 14.	La CL 50 après 7 j et la CL 50 après 14 j [1]
ISO (1993)	Compter les vers vivants dans chaque enceinte, au jour 7, ainsi que les vers vivants et morts, au jour 14.	Le taux (%) de mortalité, à chaque concentration, aux jours 7 et 14.	La CL 50 après 14 j [1] (mg/kg de poids sec) ; la CSEO, d'après les effets létaux ou sublétaux, si les données le permettent.
ASTM (1999b)	Compter les vers vivants et morts dans chaque enceinte, au jour 14.	Le taux (%) de mortalité, à chaque variante expérimentale, au jour 14.	La CL 50 après 14 j [1] ; la CSEO et la CEMO, si les données le permettent.
EC (2000b)	Compter les vers morts dans chaque enceinte, aux jours 1, 7 et 14.	Le taux (%) de mortalité, à chaque concentration, aux jours 1, 7 et 14.	La CL 50 après 14 j [1] ; le TL 50 [2].

1. Y compris les limites de confiance à 95 %.
2. Le temps estimé pour obtenir un taux de mortalité de 50 %, d'après les observations du taux de mortalité à 24 h, à 7 j et à 14 j.

12 Critères de validité de l'essai — utilisation d'un essai de toxicité de référence

Document	Critères de validité	Toxique(s) de référence [1]	Modes opératoires et conditions de l'essai de toxicité de référence
OCDE (1984)	Chez le témoin, le taux de mortalité n'excède pas 10 % à la fin de l'essai.	ClAc-amide	Déterminer la CL 50 à l'occasion.
USEPA (1989)	Chez le témoin, le taux moyen de mortalité n'excède pas 10 % à la fin de l'essai.	DSS, PCPNa ou $CdCl_2$	Au moins mensuellement ; déterminer la CL 50 après 14 j ; porter les résultats sur une carte de contrôle.
ISO (1993)	Chez le témoin, le taux de mortalité est inférieur à 10 %, et la diminution du poids du témoin n'excède pas 20 %.	ClAc-amide	Mélanger dans un sol artificiel [3] ; la CL 50 devrait se situer entre 20 et 80 mg/kg.
ASTM (1999b)	Chez le témoin, le taux moyen de mortalité n'excède pas 10 % à la fin de l'essai.	N. i. [2]	N. i.
EC (2000b)	Chez le témoin, le taux moyen de mortalité n'excède pas 10 % à la fin de l'essai ; pas plus de 10 % des témoins sont stressés.	KCl	Effectuer à tous les 30-45 jours ; déterminer la CL 50 ; porter les résultats sur une carte de contrôle.

1. $CdCl_2$: chlorure de cadmium ; ClAc-amide : chloracétamide ; DSS : dodécylsulfate de sodium ; KCl : chlorure de potassium ; PCPNa : pentachlorophénate de sodium.
2. Non indiqué.
3. V. tableaux 3 et 6 de la présente annexe.

Variantes de modes opératoires des essais visant à mesurer les effets d'un sol contaminé sur la reproduction de vers de terre (*Eisenia andrei/fetida*), décrites dans les méthodes internationales

Les documents de base ci-dessous sont énumérés dans l'ordre chronologique, sous le sigle de l'organisme dont ils émanent plutôt que sous le nom de l'auteur.

ISO, 1991 — proposition des Pays-Bas (C.A.M. van Gestel) d'une méthode normalisée internationale pour mesurer la toxicité du sol au moyen d'un essai portant sur les effets sur la reproduction d'*Eisenia fetida* ou d'*E. andrei*. L'Organisation internationale de normalisation, de Genève, l'a fait circuler en avril 1991 pour susciter des observations.

ISO (1998) — méthode normalisée internationale d'un essai de mesure de la toxicité d'un sol par ses effets sur la reproduction d'*Eisenia fetida fetida* ou d'*Eisenia fetida andrei* (désormais reconnues espèces distinctes), publiée en 1998 par l'Organisation internationale de normalisation, à Genève.

OCDE (2000) — ébauche de proposition de ligne directrice normalisée pour l'évaluation des effets de substances chimiques sur la reproduction du ver de terre *Eisenia fetida* ou *E. fetida andrei* (désormais reconnues espèces distinctes), dont l'Organisation de coopération et de développement économiques (Paris) envisage la publication.

1 Espèces d'expérience, type d'essai et durée de l'essai

Document	Espèces	Type d'essai	Durée de l'essai
ISO, 1991	*E. fetida* ou *E. andrei*	En conditions statiques avec transfert des cocons [1].	21 jours + 5 semaines [1]
ISO (1998)	*E. fetida fetida* ou *E. fetida andrei*	En conditions statiques.	4 semaines + 4 semaines [2]
OCDE (2000)	*E. fetida fetida* ou *E. fetida andrei*	En conditions statiques.	4 semaines + 4 semaines [2]

1. Après 21 jours d'exposition des vers adultes à un sol additionné d'une substance, on transfère les cocons produits par les adultes dans un substrat d'incubation non traité et on les y conserve pendant 5 semaines.
2. Après 4 semaines d'exposition des vers adultes à un sol additionné d'une substance, on retire les adultes et on poursuit l'essai avec leur progéniture (cocons ou jeunes) pendant encore 4 semaines, dans les mêmes substrats servant à l'essai.

2 Particularités des organismes d'expérience au début de l'essai

Document	Description des organismes au début de l'essai	Conditions d'acclimatation	Poids frais individuel au début de l'essai (mg)
ISO (1991)	Adultes d'élevage, de 2 mois et plus, dotés d'un clitellum.	Maintenir une semaine dans des bocaux de verre de 1 L renfermant 500 g (secs) de sol artificiel et 5 g de bouse de vache sèche [2] ; 10 vers par bocal.	250 à 600 [4]
ISO (1998)	Adultes d'élevage, de 2 à 12 mois et plus, dotés d'un clitellum.	Maintenir de 1 à 7 jours dans un sol artificiel. additionné de nourriture [3].	300 à 600 [5]
OCDE (2000)	Adultes d'élevage, de 2 à 12 mois et plus, dotés d'un clitellum [1].	Maintenir de 1 à 7 jours dans un sol artificiel, additionné de nourriture [3].	300 à 600 [5]

1. On devrait choisir les vers dans un élevage synchronisé, où la structure des âges est relativement homogène ; l'âge des vers du groupe ne devrait pas différer de plus de 4 semaines.
2. L'humidité du substrat artificiel (SA, v. tableaux 4 et 5 de la présente annexe) et de la bouse doit être de 50-55 %. On introduit la bouse dans un petit trou creusé dans le substrat du bocal, puis on la recouvre de substrat ; on ferme chaque bocal avec un couvercle de verre.
3. La nourriture devrait être la même, en quantité et en nature, que celle qui est ajouté au sol artificiel enrichi d'une ou de plusieurs substances pendant l'essai (v. tableaux 4, 5 et 7 de la présente annexe).
4. La différence de poids entre les lots de 10 vers par récipient ne devrait pas dépasser 1 g. On pèse la masse totale de vers dans chaque bocal à la fin de la période d'acclimatation.
5. On détermine la masse de chaque groupe de 10 vers à introduire dans une enceinte expérimentale.

3 Enceintes expérimentales et matière à l'étude

Document	Enceinte expérimentale	Couvercle	Type du sol à l'étude	Quantité de sol par enceinte
ISO (1991)	Bocal de verre de 1 L, pour les adultes ; boîte de Petri de verre, de 18 à 20 cm, pour la progéniture [1].	De verre pour le bocal ; matériau non précisé pour celui de la boîte de Petri.	SA, SAC	500 g (secs) par bocal ; 300 g (frais) par boîte de Petri.
ISO (1998)	Capacité de 1-2 L et section d'environ 200 cm^2.	Transparent, perforé.	SA	500-600 g (secs) par enceinte ; profondeur de 5-6 cm.
OCDE (2000)	Capacité de 1-2 L et section d'environ 200 cm^2.	Transparent, perforé.	SA	500-600 g (secs) par enceinte ; profondeur de 5-6 cm.

1. Le diamètre du bocal de verre ne devrait pas excéder 15 cm.
2. On devrait couvrir les bocaux d'un couvercle de verre ne fermant pas juste ; le matériau des couvercles des boîtes de Petri n'est pas précisé.
3. Voir la description dans le tableau 4 de la présente annexe.
4. SA : sol artificiel ; SAC : substrat artificiel pour les cocons.
5. On introduit dans chaque bocal une quantité de substrat humide équivalant à 500 g (poids sec). Dans les boîtes de Petri, on étale 150 g (poids frais) d'un substrat artificiel pour l'incubation des cocons (SAC) en couche mince ; les cocons sont étalés sur cette couche de substrat, puis recouverts d'une seconde couche (150 g, poids frais) de SAC.

4 Description des sols à l'étude, y compris la composition du sol artificiel

Document	Description du sol ou des sols à l'étude	Composition du sol artificiel [2]
ISO (1991)	Sol artificiel, additionné de la substance à l'étude (par ex. substance dans l'eau désionisée ou dans un solvant organique ; si la substance est insoluble, on la mélange à du sable quartzeux fin).	10 % de tourbe à sphaignes, 20 % d'argile kaolinique (renfermant plus de 50 % de kaolinite) et 70 % de sable industriel (renfermant plus de 50 % de particules de 50-200 µm) ; ajuster le pH à 5,5 ± 0,5, au moyen de $CaCO_3$ [3].
ISO (1998)	Sol artificiel, additionné de la substance à l'étude (par ex. substance dans l'eau désionisée ou dans un solvant organique ; si la substance est insoluble, on la mélange à du sable quartzeux fin).	10 % de tourbe à sphaignes [4], 20 % d'argile kaolinique (renfermant au moins 30 % de kaolinite) et 70 % de sable industriel (renfermant plus de 50 % de particules de 50-200 µm) ; ajuster le pH à 6,0 ± 0,5, au moyen de $CaCO_3$.
OCDE (2000)	Sol artificiel, additionné de la substance à l'étude (par ex. substance dans l'eau désionisée ou dans un solvant organique ; si la substance est insoluble, on la mélange à du sable quartzeux fin) [1].	10 % de tourbe à sphaignes [4], 20 % d'argile kaolinique (renfermant au moins 30 % de kaolinite) et 70 % de sable industriel (renfermant plus de 50 % de particules de 50-200 µm) ; ajuster le pH à 6,0 ± 0,5, au moyen de $CaCO_3$.

1. La substance à l'étude est appliquée soit par mélange dans le sol artificiel (mode opératoire recommandé pour l'essai de substances en général) ou par ajout à la surface du sol après l'introduction des vers dans les enceintes expérimentales renfermant du sol artificiel.
2. Les pourcentages sont exprimés par rapport au poids sec.
3. La préparation de sol artificiel est destinée à être ajoutée aux bocaux de verre hébergeant des adultes (v. tableau 3 de la présente annexe). La préparation de SAC est destinée au même usage, sauf qu'elle utilise de la tourbe à sphaignes finement moulue (< 0,5 mm) plutôt que de la tourbe à sphaignes « pas trop fine » ou tamisée (1,0 mm) et elle comprend 1 % de bouse de vache séchée, finement moulue (< 0,5 mm).
4. La tourbe à sphaignes est finement moulue et ne montre aucun vestige visible de végétaux.

5 Manipulations du sol artificiel avant l'essai

Document	Mélange	Hydratation	Ajustement du pH
ISO (1991)	Réunir les constituants secs dans les bonnes proportions, puis mélanger avec de l'eau désionisée ; mesurer l'humidité ; hydrater.	Hydrater jusqu'à 30-35 % de la masse sèche du substrat artificiel [1] ; teneur finale en eau du substrat à l'étude : environ 50-55 % [2].	Ajouter du $CaCO_3$ pour amener le pH à 5,5 ± 0,5.
ISO (1998)	Réunir les constituants secs dans les bonnes proportions ; puis mélanger avec la nourriture avant l'essai ; hydrater avec de l'eau désionisée ou distillée.	Hydrater jusqu'à 40-60 % de la capacité totale de rétention en eau.	Ajouter du $CaCO_3$ pour amener le pH du substrat mouillé (y compris la nourriture) à 6,0 ± 0,5.
OCDE (2000)	Réunir les constituants secs dans les bonnes proportions ; humidifier 1 ou 2 jours avant l'essai à environ 50 % de la teneur finale en eau, avec de l'eau désionisée.	Hydrater jusqu'à 40-60 % de la capacité totale de rétention en eau [3].	Ajouter du $CaCO_3$ pour amener le pH du substrat mouillé (y compris la nourriture) à 6,0 ± 0,5.

1. On devrait ajuster la teneur en eau du substrat artificiel servant à l'incubation des cocons (SAC ; v. tableaux 3 et 4 de la présente annexe) pour qu'elle équivaille à environ 35 % du poids sec du SAC.
2. On parvient à la teneur finale en eau (environ 50-55 %) de la substance à l'étude, soit par ajout de cette substance dans une quantité suffisante d'eau désionisée ou, si on ajoute la substance sous forme sèche, par ajout d'eau désionisée.
3. On obtient la teneur finale en eau (40-60 % de la capacité maximale de rétention en eau) par ajout de la substance à l'étude en solution ou par ajout d'eau distillée ou désionisée.

6 Sol témoin négatif

Document	Description du sol témoin négatif	Nombre d'enceintes témoins (répétitions)
ISO (1991)	Traiter avec le même solvant que celui qui est utilisé dans l'essai [1].	≥4
ISO (1998)	Préparer de la même façon que les sols à l'étude, mais sans la substance à laquelle on s'intéresse ; utiliser des témoins supplémentaires (témoins du solvant) si on dissout la substance en question dans un autre solvant que l'eau.	≥4
OCDE (2000)	Préparer de la même façon que les sols à l'étude, mais sans la substance à laquelle on s'intéresse [2] ; prévoir des témoins supplémentaires des solvants organiques, du sable quartzeux ou d'autres véhicules d'un titre ou de titres compatibles avec ceux qui sont utilisés dans les diverses variantes expérimentales.	8 pour CSEO ; 6 pour la CE x ; 8 pour la CSEO et la CE x [3].

1. Le document ne décrit pas en quoi consiste le sol témoin. On peut toutefois présumer qu'il serait constitué de sol artificiel (SA), pendant les 21 premiers jours de l'essai employant des vers adultes, et de substrat artificiel pour les cocons (SAC), pendant les 5 dernières semaines de l'essai portant sur les cocons et les jeunes (v. tableaux 1, 4 et 5 de la présente annexe).
2. V. tableau 4 (y compris la note 1) de la présent annexe.
3. Trois plans d'expérience sont proposés. Selon celui que l'on choisit, les effets à mesurer différeraient, tout comme le nombre recommandé de concentrations d'essai et de répétitions par variante expérimentale, y compris le ou les témoins.

7 Alimentation des organismes pendant l'essai

Document	Type de nourriture recommandée	Quantité de nourriture, modalités et fréquence des repas
ISO (1991)	Bouse de vache séchée [1]	Dans l'essai d'une durée de 21 jours employant des adultes : 5 g (poids sec), les jours 0, 7 et 14 [4] ; dans l'essai postérieur, d'une durée de 5 semaines avec la progéniture, commencer avec du substrat artificiel renfermant 1 % de bouse finement moulue [5].
ISO (1998)	À discrétion [2]	Mélanger le sol artificiel avec la nourriture avant l'essai [6] ; épandre 5 g de nourriture sèche, finement moulue dans chaque enceinte expérimentale, à la surface du sol, au jour 1, puis hebdomadairement pendant le reste de l'essai employant des adultes [7] ; au début des 4 dernières semaines de l'essai, sur la progéniture, incorporer soigneusement 5 g de nourriture sèche finement moulue, à la main, au substrat de chaque enceinte.
OCDE (2000)	À discrétion [2, 3]	Épandre environ 5 g de nourriture sèche, finement moulue, à la surface du sol de chaque enceinte expérimentale, au jour 1 et hebdomadairement, par la suite, pendant la période d'essai sur les adultes [7] ; au début des 4 dernières semaines de l'essai, sur la progéniture, incorporer soigneusement 5 g de nourriture sèche finement moulue, à la main, au substrat de chaque enceinte [8].

1. La bouse est séchée à 105 °C, puis finement moulue (< 0,5 mm).
2. On peut utiliser tout aliment d'une qualité permettant le maintien de la population de vers de terre. Le fumier de vache finement moulu s'est révélé convenir à cette fin. Chaque lot de nourriture devrait avoir été soigneusement éprouvé pour s'assurer que les vers de terre s'en nourriront.
3. Nous recommandons le fumier de vache que l'on a soi-même recueilli, puisque l'expérience a montré que le produit du commerce vendu pour la fumure des potagers pourrait avoir des effets néfastes sur les vers.
4. Avant d'introduire les vers adultes dans les enceintes, déposer 5 g (poids sec) de bouse humidifiée, finement moulue, dans une petite dépression au milieu du sol artificiel de chaque enceinte. On introduit la même quantité aux jours 7 et 14.
5. On ajoute la bouse finement moulue au substrat artificiel pour cocons (v. tableaux 3 et 4 de la présente annexe) avant de répartir ce substrat dans des boîtes de Petri.
6. Si on utilise du fumier de vache séché, on mélange 5 g de fumier sec dans 500 g (poids sec) de sol.
7. Humidifier avec de l'eau potable, en ajoutant environ 5 ou 6 ml d'eau à chaque enceinte. Si la consommation de nourriture est faible, réduire la grosseur des portions au minimum.
8. Durant les 4 dernières semaines de l'essai, on ne donne pas d'autre nourriture aux vers.

8 Essai préliminaire : nombre d'organismes par enceinte expérimentale, nombre de répétitions par variante expérimentale, nombre de concentrations par échantillon et dilution recommandée

Document	Nombre de vers par enceinte	Nombre de répétitions par variante ou concentration	Nombre de concentrations par échantillon ou par matière à l'étude	Dilution recommandée
ISO (1991) [1, 2]	N. i. [5]	1	5 plus le témoin	Série géométrique [6]
ISO (1998) [1, 3]	10	1	4 plus le témoin	Série géométrique [7]
OCDE (2000) [1, 4]	10	1	5 plus le témoin	Série géométrique [7]

1. Facultativement, on effectue un essai préliminaire de recherche de la gamme de concentrations à utiliser.
2. La limite supérieure des concentrations à utiliser dans un essai définitif peut également se fonder sur les résultats d'un essai de létalité aiguë.
3. Si un essai préliminaire est nécessaire pour déterminer la gamme de concentrations à utiliser dans l'essai définitif, effectuer un essai de létalité aiguë conformément au document ISO 11268-1 (v. annexe E, ci-dessus).
4. Si un essai préliminaire est nécessaire pour déterminer la gamme de concentrations à utiliser dans l'essai définitif, effectuer un essai de létalité aiguë d'une durée de 2 semaines.
5. Non indiqué.
6. Chaque concentration devrait être le décuple de la précédente (par ex. 0,1, 1,0, 10, 100 et 1 000 mg/kg, poids sec).
7. Par ex. 0, 1, 10, 100 et 1 000 mg/kg, poids sec.

9 Essai définitif : nombre d'organismes par enceinte expérimentale, nombre de répétitions par variante expérimentales, nombre de concentrations par échantillon et dilution recommandée

Document	Nombre de vers par enceinte	Nombre de répétitions par variante ou concentration	Nombre de concentrations par échantillon ou par matière à l'étude	Dilution recommandée
ISO (1991)	10	Au moins 4	Au moins 5, plus le témoin	Série géométrique [3]
ISO (1998)	10	Au moins 4	N. i. [2]	Série géométrique [4]
OCDE (2000) [1]	10	4, pour la CSEO	Au moins 5, plus le témoin	Série géométrique [5]
	10	Au moins 2, pour la CE x	12 plus le témoin	Série géométrique [6]
	10	4, pour la CSEO et la CE x	8 plus le témoin	Série géométrique [5]

1. Trois plans d'expérience sont proposés. Selon celui que l'on choisit, les paramètres statistiques différeraient, tout comme le nombre recommandé de concentrations d'essai et de répétitions par variante expérimentale (y compris le nombre d'enceintes témoins ; v. tableau 6 de la présente annexe).
2. Non indiqué.
3. Le coefficient de dilution ne devrait pas excéder 3,2 et, mieux encore, 1,8.
4. Le coefficient de dilution ne devrait pas excéder 2,0.
5. Le coefficient ne devrait pas excéder 1,8.
6. Le coefficient peut varier, c'est-à-dire ne pas dépasser 1,8 dans la fourchette de concentrations dans laquelle on prévoit que l'effet se manifestera et dépasser 1,8 aux concentrations inférieures et supérieures.

10 Température et éclairage pendant l'essai

Document	Température (°C)	Conditions d'éclairage
ISO (1991)	20 ± 2	Éclairage ininterrompu
ISO (1998)	20 ± 2	Photopériode de 12 ou de 16 h ; intensité : 400-800 lux au-dessus des enceintes expérimentales.
OCDE (2000)	20 ± 2	Photopériode contrôlée, de préférence de 16 h ; intensité : 400-800 lux au-dessus des enceintes.

11 Mesures et observations biologiques effectuées pendant l'essai

Document	Mesures [1]	Observations biologiques
ISO (1991)	L'humidité et le pH du sol artificiel, au début et à la fin de la période d'acclimatation [2], ainsi qu'au début et à la fin de l'essai, au moins [3].	Le nombre de vers vivants dans chaque enceinte expérimentale et leur poids frais total, au début et à la fin des 21 jours d'exposition ; le nombre de cocons par enceinte, au jour 21 ; le nombre de cocons ayant éclos, le nombre de cocons n'ayant pas donné de jeunes vivants, le nombre de cocons infertiles et le nombre total de jeunes vers par cocon ayant éclos, à la fin de l'essai.
ISO (1998)	L'humidité et le pH correspondant à chaque variante expérimentale, au début et à la fin de l'essai ; pendant l'essai, on pèse périodiquement les enceintes expérimentales [4].	Le nombre total et la masse de vers adultes vivants par enceinte, au début et à la fin des 4 semaines d'exposition ; le nombre de jeunes engendrés dans chaque enceinte ayant éclos des cocons, à la fin de l'essai ; les symptômes pathologiques évidents ou les modifications nettes du comportement (par ex. diminution de l'ingestion de nourriture) observées chez les vers de chaque enceinte.
OCDE (2000)	L'humidité et le pH correspondant à chaque variante expérimentale, au début et à la fin de l'essai ; pendant l'essai, on pèse périodiquement les enceintes expérimentales [4].	Le nombre total et le poids frais total de vers adultes vivants par enceinte, au début et à la fin des 28 jours d'exposition ; le nombre de jeunes engendrés dans chaque enceinte, à la fin de l'essai ; les symptômes pathologiques évidents (par ex. plaies) ou les modifications nettes du comportement (par ex. léthargie) observées chez les vers de chaque enceinte.

1. pH : concentration des ions hydrogène.
2. V. tableau 2 de la présente annexe.
3. On vérifie régulièrement la teneur en eau du substrat artificiel mis à la disposition des adultes ou servant à l'incubation des cocons (v. tableaux 4 et 5 de la présente annexe) ; on compense la perte d'humidité par l'ajout d'eau désionisée.
4. Maintenir la teneur en eau du substrat dans les enceintes expérimentales grâce à des pesées régulières et, au besoin, par l'ajout d'eau pour compenser les pertes. À la fin de l'essai, la teneur en eau ne doit pas différer de plus de 10 % de celle qui a été mesurée au début de l'essai.

12 Fin de l'essai, effets biologiques mesurés et paramètres statistiques

Document	Fin de l'essai	Effets biologiques mesurés	Paramètres statistiques
ISO (1991)	Au jour 21, retirer les adultes de chaque enceinte expérimentale, déterminer le nombre total d'adultes vivants ainsi que leur masse totale ; à la fin de l'essai, dénombrer : les cocons ayant éclos ; les cocons n'ayant pas éclos mais renfermant des jeunes vivants ; les cocons infertiles ; les jeunes vers dans chaque enceinte.	Le poids moyen et le nombre de vers adultes vivants correspondant à chaque concentration, au début et à la fin de l'essai ; la moyenne (et l'écart-type) du nombre de cocons, du pourcentage de cocons ayant éclos et du nombre de jeunes vers par cocon ayant éclos, à chaque concentration.	La CSEO ; si possible, la CE 50, l'intervalle de confiance et la pente de la courbe dose-réponse.
ISO (1998)	Au jour 28, retirer les adultes de chaque enceinte et consigner le nombre total d'adultes vivants et leur masse totale ; à la fin de l'essai, dénombrer les jeunes de chaque enceinte.	Le pourcentage de mortalité des adultes dans chaque enceinte et à chaque concentration, y compris le témoin ; le pourcentage de diminution ou d'augmentation de la biomasse des adultes, à chaque concentration ; le nombre de jeunes engendrés à chaque concentration.	La CSEO et la CEMO ; si c'est possible, la CE 50 [1].
OCDE (2000)	Au jour 28, retirer les adultes de chaque enceinte et consigner le nombre total d'adultes vivants et leur poids frais total ; à la fin de l'essai, dénombrer les jeunes de chaque enceinte.	Le pourcentage de mortalité des adultes dans chaque enceinte et à chaque concentration, y compris le témoin ; le pourcentage de diminution ou d'augmentation de la biomasse des adultes, dans chaque enceinte ; le nombre de jeunes engendrés dans chaque enceinte.	La CSEO et la CE x [2].

1. Noter, en mg/kg de poids sec de substrat, la concentration maximale n'ayant pas tué de vers, les modifications importantes de la biomasse des adultes, la réduction significative du nombre de jeunes engendrés (CSEO), la concentration minimale produisant un effet (CEMO) et, si possible, la CL 50 ou la CE 50.
2. Dans un avenir prévisible, les autorités exigeront probablement une CSEO. Ce qui serait l'aboutissement de considérations statistiques et écologiques, on devrait décider bientôt d'utiliser de façon plus générale la CE x. Voir les tableaux 6 et 9 de la présente annexe, pour ce qui concerne le nombre recommandé de répétitions par concentration, le nombre de concentrations et le nombre d'enceintes expérimentales, selon que l'effet à mesurer est la CSEO, la CE x ou les deux.

13 Critères de validité de l'essai — utilisation d'un essai de toxicité de référence

Document	Critères de validité	Toxique(s) de référence	Modes opératoires et conditions de l'essai de toxicité de référence
ISO (1991)	Le taux de mortalité des adultes dans les enceintes témoins ne dépasse pas 10 % ; le taux de reproduction du groupe témoin est d'au moins ... cocons par ver et par semaine, avec au moins ... jeunes par cocon [1].	N. i. [2]	Déterminer la CE 50 au moins une fois par année.
ISO (1998)	Au moins 30 jeunes par enceinte ; coefficient de variation de la reproduction chez les témoins ne dépassant pas 30 % ; taux de mortalité des adultes témoins ne dépassant pas 10 %.	Carbendazime	Déterminer les effets du composé sur la reproduction ($\alpha = 0,05$), aux concentrations situées entre 1 et 5 mg/kg de substrat (poids sec).
OCDE (2000)	Au moins 30 jeunes par enceinte ; coefficient de variation de la reproduction chez les témoins ne dépassant pas 30 % ; taux de mortalité des adultes témoins ne dépassant pas 10 %.	Carbendazime	Déterminer les effets du composé sur la reproduction ($\alpha = 0,05$), aux concentrations situées entre 1 et 5 mg/kg de substrat (poids sec) ; calculer la CSEO et/ou la CE x ; effectuer au moins deux fois par année cette détermination ou la faire en parallèle avec l'essai sur la substance à l'étude.

1. Les critères de validité se fondent sur les taux de reproduction dans les groupes témoins, qui ne sont pas encore établis (document à l'état d'ébauche).
2. Non indiqué.

Sols témoins négatifs, naturels et artificiels, utilisés pour l'élaboration des méthodes et l'établissement des critères de validité des essais

Dans chaque essai de toxicité d'un sol, il faut inclure parmi les variantes expérimentales un échantillon de sol témoin négatif. À cette fin, il faut choisir un sol essentiellement exempt de tout contaminant qui pourrait diminuer les performances des organismes en expérience (v. § 3.2). Avant d'appliquer chacune des méthodes expérimentales décrites dans le présent document en tant qu'essai normalisé à effectuer conformément aux exigences d'Environnement Canada, il a d'abord fallu évaluer les performances des organismes d'expérience dans divers types de sols témoins négatifs, représentatifs d'un ensemble de sols *non contaminés*, trouvés au Canada. Cinq types de sols témoins négatifs ont servi à élaborer chacune des méthodes d'essai biologique décrites dans le présent document et à évaluer de façon plus poussée la robustesse de chaque méthode expérimentale au moyen d'échantillons de sols qui variaient considérablement par leurs caractéristiques physicochimiques. Ces sols ont également servi à établir des critères raisonnables de validité des résultats des essais, fondés sur les performances des groupes témoins. Les cinq sols éprouvés comprennent un sol artificiel (v. § 3.2.2) et quatre sols naturels (v. § 3.2.1) [Aquaterra Environmental, 1998a ; Stephenson *et al.*, 1999a, b, 2000a, Aquaterra Environmental et ESG, 2000 ; ESG, 2001, 2002 ; ESG et Aquaterra Environmental, 2002 ; Stantec et Aquaterra Environmental, 2004]. Le sol artificiel a été préparé en laboratoire à partir d'ingrédients naturels. Les quatre sols naturels comprenaient deux sols agricoles du sud de l'Ontario, un sol de prairie de l'Alberta et un sol forestier du nord de l'Ontario. Les caractéristiques physicochimiques des cinq sols sont présentés dans le tableau de synthèse H-1.

Le sol artificiel (SA) utilisé dans cette série d'études d'évaluation des performances avec divers types de sols était le sol recommandé dans le présent document (v. § 3.2.2). Il est constitué de 70 % de sable siliceux, de 20 % d'argile kaolinique, de 10 % de tourbe à sphaignes et de carbonate de calcium (10 à 30 g dans 1 kg de tourbe). On l'a préparé par mélange poussé des ingrédients secs, puis hydratation graduelle avec de l'eau désionisée, homogénéisation jusqu'à l'obtention d'une couleur, d'une texture et d'un degré de mouillage visiblement uniformes. Le sol artificiel est très semblable à celui qu'a décrit l'OCDE (OECD, 1984, 2000) et ISO (1991, 1993, 1998), sauf que le sable siliceux y remplace le sable quartzeux.

Les quatre sols naturels employés comme témoins négatifs pendant l'élaboration des méthodes et l'établissement des critères de validité des essais exposés dans le présent document (v. § 4.1.3, 4.2.3 et 4.3.3) ne sont pas représentatifs de tous les types de sols du Canada. Cependant, ils varient énormément par leurs caractéristiques physicochimiques et ils comprennent des sols agricoles de textures diverses ainsi qu'un sol forestier (v. tableau H-1). Les sols proviennent de régions n'ayant été soumises à aucune application directe de pesticides au cours des dernières années. On les a prélevés à la pelle ordinaire ou rétro, selon le lieu et la quantité à obtenir. La profondeur du prélèvement a dépendu de la nature du sol et de l'emplacement même.

L'échantillon de loam argileux, classé chernozem noir orthique de Delacour, a été prélevé en mai 1995, dans une réserve routière située à l'est de Calgary. On a fait sécher à l'air le sol sous la plaque de gazon jusqu'à un taux d'humidité d'environ 10 à 20 %, on l'a ensuite tamisé (mailles de 4 ou 9 mm), recueilli dans des seaux de plastique de 20 L, puis expédié à l'Université de Guelph (Guelph, Ont.) où on l'a conservé au froid (4 °C) jusqu'au moment de l'employer. On a déterminé que le sol était presque exempt de tout contaminant (Komex International, 1995). Les caractéristiques physicochimiques du sol montrent qu'il s'agit d'un loam argileux de granulométrie moyenne à fine, à teneur en matière organique et d'une capacité d'échange cationique forte par rapport à celles des autres sols *non contaminés* utilisés pendant l'élaboration de ces méthodes d'essai biologique et l'établissement des critères de validité de l'essai (v. tableau H-1).

Tableau H-1 Caractéristiques physicochimiques des sols témoins négatifs artificiel et naturels employés pour l'élaboration des méthodes [1]

Paramètre	Sol artificiel	Loam argileux	Loam sableux	Loam limoneux	Sol forestier	Méthode d'analyse
Source	préparé à partir de ses constituants	prélevé sur le terrain en Alberta	prélevé sur le terrain en Ontario	prélevé sur le terraine en Ontario	prélevé sur le terrain en Ontario	—
Texture du sol	loam sableux fin	loam argileux	loam sableux fin	loam limoneux	loam	selon Hausenbuiller (1985) ; fondée sur la répartition granulométrique
Sables (%)	77,3	26,6	60,8	36,6	48,6	granulométrie : méthode gravimétrique
Limons (%)	7,8	43,3	27,8	50,1	36,9	idem
Argiles (%)	14,9	30,1	11,4	13,3	14,5	idem
Graviers (%)	— [2]	—	0	0	0	idem
Sables très grossiers (%)	—	—	1,5	1,2	0,6	idem
Sables grossiers (%)	—	—	3,2	2,3	2,2	idem
Sables moyens (%)	—	—	10,1	5,4	9	idem
Sables fins (%)	—	—	25,9	13,4	20,4	idem
Sables très fins (%)	—	—	20,2	14,3	16,4	idem
Capacité de rétention en eau (%)	71,5	80,3	44	56,5	75,6	analyse gravimétrique [3]
pH (unités)	6	5,9	7,3	7,4	4,2	méthode au $CaCl_2$ 0,01 *M* [4]
Conductivité (mS/cm)	0,3	1,52	0,092	0,373	0,39	méthode sur extrait de pâte saturée
Densité apparente (g/cm^3)	0,98	0,83	—	—	0,51	méthode de la motte
Carbone total (%)	4,46	6,83	1,88	2,57	11,9	four Leco
Carbone inorganique (%)	—	—	0,18	0,58	< 0,05	idem
Carbone organique (%)	—	—	1,7	1,99	11,9	idem
Matière organique (%)	9	12,8	2,9	3,5	19,9	oxydation au bichromate
Capacité d'échange cationique (cmol/kg)	18,5	34,5	16,1	21,9	20	méthode au chlorure de baryum
Azote (N) total (%)	0,05	0,59	0,115	0,166	0,74	de Kjeldahl
N ammoniacal (NH_4) (mg/kg)	—	—	0,53	10,25	260	idem
N nitrique (NO_3) (mg/kg)	—	—	6,94	5,44	2,26	idem
N nitreux (NO_2) (mg/kg)	—	—	0,94	< 0,1	< 0,1	idem
Phosphore (mg/kg)	23	12	6	10	35	minéralisation dans les acides nitrique et perchlorique
Potassium (mg/kg)	22	748	61	75	250	extraction à l'acétate d'ammonium et colorimétrie

Paramètre	Sol artificiel	Loam argileux	Loam sableux	Loam limoneux	Sol forestier	Méthode d'analyse
Magnésium (mg/kg)	149	553	261	256	192	idem
Calcium (mg/kg)	1 848	5 127	1 846	4 380	963	idem
Chlorures (mg/kg)	—	—	69	42	113	extraction à l'eau et colorimétrie
Sodium (mg/kg)	67	57	33	19	38	extraction à l'acétate d'ammon. et colorimétrie

1. Caractéristiques du sol artificiel et des divers sols témoins négatifs qui ont servi à l'élaboration des méthodes définitives d'essai biologique et des critères connexes de validité des essais décrits dans le présent document (Aquaterra Environmental, 1998a ; Stephenson *et al.*, 1999a, b, 2000a ; Aquaterra Environmental et ESG, 2000 ; ESG, 2001, 2002 ; ESG et Aquaterra Environmental, 2002 ; Stantec et Aquaterra Environmental, 2004).
2. Non déterminé.
3. Déterminé d'après USEPA (1989) à l'aide d'un filtre de papier crêpé Fisherbrand P8 (v. § 5.3).
4. Déterminé par Becker-van Slooten *et al.* (2004), d'après Hendershot *et al.* (1993) [v. § 4.1.5].

En juin 1999, on a prélevé un gros (~ 3 000 L) échantillon de loam sableux sur les fermes Beauchamp, à Eramosa (Ont.), dans un champ qui avait été régulièrement cultivé, mais sans être soumis à des traitements pesticides. On a fait sécher ce sol à l'air et on l'a tamisé (mailles de 2 ou 5 mm), recueilli dans des seaux de plastique de 20 L, puis conservé au froid (4 °C) jusqu'au moment de l'utiliser. On a en a dosé les contaminants organiques et minéraux communs et on en a établi les caractéristiques physicochimiques afin déterminer s'il ne possédait pas des caractéristiques inhabituelles (par ex. forte conductivité ou concentrations anormales d'éléments nutritifs). On a constaté que l'échantillon était presque exempt de contaminants et d'anomalies. Ce sol est un loam sableux fin, possédant une teneur modérée en matière organique et une capacité d'échange cationique moyenne par rapport aux autres sols *non contaminés* employés dans ces études (v. tableau H-1).

En juin 1999, on a prélevé l'échantillon de loam limoneux à la station de recherches d'Elora de l'Université de Guelph, dans le canton de Nichol, en Ontario. Le sol de surface avait été enlevé, plusieurs années auparavant, au moment de la construction du centre de recherches, et on l'avait entassé à côté d'un champ. Le sol prélevé pour les études de mise au point de méthodes provient de l'intérieur du tas (on ne voulait pas prélever de sol qui aurait été accidentellement contaminé par la dérive de pesticides ou d'engrais pulvérisés depuis le champ contigu). On l'a fait sécher à l'air et on l'a tamisé (mailles de 2 ou 5 mm), puis recueilli dans des seaux de plastique de 20 L et conservé au froid (4 °C) jusqu'au moment de l'utilisation. L'analyse a révélé qu'il était exempt de contaminants minéraux et organiques ainsi que d'anomalies. Les caractéristiques physicochimiques mesurées de ce loam limoneux révèlent qu'il possède une teneur en matière organique et une capacité d'échange cationique moyennes par rapport aux quatre autres sols englobés dans ces études d'élaboration de méthodes (v. tableau H-1).

En juin 2001, on a prélevé un échantillon de 400 L de sol forestier, classé dans les podzols humo-ferriques orthiques, dans une forêt du Bouclier canadien, à Sudbury (Ontario). On a doucement enlevé la litière de feuilles au râteau et, au moyen d'un transplantoir, on a enlevé une tranche de sol de 5 à 10 cm d'épaisseur. On a recueilli ce sol, sans le tamiser, dans des seaux de 20 L, doublés de plastique à l'intérieur, puis on l'a envoyé à ESG International, à Guelph. On l'a fait sécher à l'air pendant 48 heures, jusqu'à pas moins d'environ 10 % d'humidité, on l'a homogénéisé puis tamisé (mailles de 6 mm). Après le tamisage, on a complètement homogénéisé l'échantillon et on l'a entreposé dans les mêmes seaux de plastique de 20 L jusqu'au moment de l'emploi. On l'a entreposé à la température ambiante (20 °C) jusqu'au moment de l'emploi. Les caractéristiques physicochimiques du sol forestier montrent que c'est un loam à capacité d'échange cationique modérée, possédant les pourcentages maximaux de carbone organique total (11,9 %) et de matière organique (19,9 %) parmi les cinq sols utilisés dans les études de mise au point des méthodes (v. tableau H-1).

Annexe I

Séries logarithmiques de concentrations convenant aux essais de toxicité *

Colonne (nombre de concentrations entre 10,0 et 1,00 ou entre 1,00 et 0,10)**

1	2	3	4	5	6	7
10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
3,2	4,6	5,6	6,3	6,8	7,2	7,5
1,00	2,2	3,2	4,0	4,6	5,2	5,6
0,32	1,00	1,8	2,5	3,2	3,7	4,2
0,10	0,46	1,00	1,6	2,2	2,7	3,2
	0,22	0,56	1,00	1,5	1,9	2,4
	0,10	0,32	0,63	1,00	1,4	1,8
		0,18	0,40	0,68	1,00	1,3
		0,10	0,25	0,46	0,72	1,00
			0,16	0,32	0,52	0,75
			0,10	0,22	0,37	0,56
				0,15	0,27	0,42
				0,10	0,19	0,32
					0,14	0,24
					0,10	0,18
						0,13
						0,10

* Adapté de Rocchini *et al.* (1982).

** Dans une colonne, on devrait choisir une série de cinq (au moins) concentrations consécutives. Les points médians entre les concentrations de la colonne x se trouvent dans la colonne $2x + 1$. Les valeurs peuvent représenter des concentrations exprimées en unités de masse relativement à une unité de masse (par ex. mg/kg) ou à une unité de volume (par ex. mg/L). Au besoin, on peut les multiplier ou les diviser par toute puissance de 10. On pourrait utiliser la colonne 1 si le degré de toxicité est entaché de beaucoup d'incertitude. On ne devrait pas utiliser de concentrations plus largement espacées, car cela diminue le degré de résolution des limites de confiance de toute valeur seuil calculée.

Annexe J

Initiation au calcul de concentrations inhibitrices d'un pourcentage donné (CI p) par régression linéaire et non linéaire

J.1 Introduction

La présente annexe renferme des conseils sur l'emploi de la régression linéaire et de la régression non linéaire pour le calcul des CI p les plus appropriées, d'après les relations concentration-réponse révélées par les effets mesurés (en l'occurrence : le nombre de vers survivants de la progéniture et leur poids sec, à la fin d'un essai d'une durée de 8 semaines employant *Eisenia andrei* ; v. § 4.3). Elle reprend, en l'adaptant, l'approche décrite par Stephenson *et al.* (2000b). Les marches à suivre proviennent de la version 11.0 de SYSTAT * ; cependant, on peut utiliser tout logiciel convenable. Les techniques de régression décrites dans la présente annexe s'appliquent le mieux à des données continues, obtenues grâce à des essais conçus pour employer au moins 10 concentrations ou variantes expérimentales (y compris le témoin négatif). Le plan d'expérience pour la mesure des effets de l'exposition prolongée (8 semaines) d'*E. andrei* est résumé dans le tableau J.1.

Nous présentons dans la figure 4 (v. § 6.4.2.1) une vue d'ensemble du processus général utilisé pour retenir le modèle de régression qui convient le mieux à chaque ensemble de données à analyser.

Nous encourageons le lecteur à consulter les sections appropriées de l'une des présentes méthodes d'essai biologique, de même que les sections portant sur les méthodes de régression dans le *Document d'orientation sur les méthodes statistiques applicables aux essais d'écotoxicité* (EC, 2004b) avant d'analyser les données. Le même document (EC, 2004b) renvoie à plusieurs titres supplémentaires sur la question de l'analyse statistique des données expérimentales quantitatives par régression linéaire et non linéaire. Certains des conseils que l'on trouve dans ces documents figurent dans la présente annexe, lorsque cela est approprié.

J.2 Régressions linéaires et non linéaires

J.2.1 Création de tableaux de données

Nota : L'analyse statistique doit englober la transformation logarithmique des concentrations (par ex. $\log_{10}$ ou $\log_e$ [ce dernier pouvant également être noté Log ou ln]). Si les concentrations sont inférieures à l'unité (1) [par ex. 0,25], on peut transformer les données par modification des unités de grandeur (par ex. les mg/kg en µg/g) par un multiplicateur (par ex. 1 000) ; on transforme ensuite les données modifiées en logarithmes. La transformation peut se faire soit dans la feuille de calcul électronique d'origine, soit lors du transfert des données d'origine dans le fichier de données de SYSTAT.

(1) Ouvrir le fichier renfermant l'ensemble de données dans une feuille de calcul électronique.

(2) Ouvrir le programme SYSTAT. Dans la fenêtre principale, cliquer sur **File** (Fichier), **New** (Nouveau) et **Data** (Données). On ouvre ainsi un tableau vide. Insérer le nom des variables dans l'en-tête de la colonne en cliquant deux fois sur le nom d'une variable, ce qui ouvre la fenêtre '**Variable Properties**' (« Propriétés des variables »). Insérer un nom approprié pour la variable recherchée dans la zone '**Variable Name**' (« Nom de la variable ») et choisir le

---

* On peut acheter la version la plus récente (version 11.0) de SYSTAT™ auprès de SYSTAT Software, Inc., 501, Canal blvd, Suite C, Point Richmond, CA 94804-2028, USA ; tél. : 1-800-797-7401 ; site Web : www.systat.com/products/Systat/.

Tableau J.1 Sommaire du plan d'expérience de l'essai d'Environnement Canada, d'une durée de 8 semaines, pour la mesure des effets de l'exposition prolongée d'*E. andrei* sur sa survie, sa reproduction et sa croissance (v. § 4.3)

Paramètre	Description
Type d'essai	— Essai de toxicité d'un échantillon de sol entier, sans renouvellement du milieu (en conditions statiques)
Durée de l'essai	— 56 jours (8 semaines)
Espèce utilisée	— *Eisenia andrei* ; adultes, doté du clitellum (parvenus à la maturité sexuelle), dont le poids frais individuel varie de 250 à 600 mg.
Nombre de répétitions	— 10 par variante expérimentale.
Nombre de variantes expérimentales	— Le sol témoin négatif et au moins 7 concentrations ; cependant on recommande fortement, outre le témoin négatif, au moins 10 concentrations.
Paramètres statistiques (effets mesurés)	<u>Paramètres quantiques</u> • Le pourcentage moyen de survie des adultes dans chaque variante expérimentale, au jour 28 ; • La CL 50 après 28 j, calculée si on observe une relation entre la dose et la réponse (en usant des méthodes statistiques appropriées pour les données quantiques ; les modes opératoires exposés dans la présente annexe ne conviennent pas aux données quantiques). <u>Paramètres quantitatifs</u> • Le nombre moyen de jeunes vers survivants, dans chaque variante expérimentale, au jour 56, et leur poids sec moyen. • La CI p (par ex. la CI 50 et/ou la CI 25) concernant le nombre et le poids sec des jeunes vivants engendrés.

type de la variable ; on peut insérer des observations supplémentaires dans la zone '**Comments:**' (« Observations »). Par exemple, on pourrait utiliser les noms suivants de variables :

conc	=	concentration ou variante expérimentale ;
logconc	=	transformation en $\log_{10}$ de la concentration ou de la variante ;
rep	=	répétition d'une concentration ou variante donnée ;
juveniles	=	nombre de jeunes engendrés ;
jdrywt	=	poids sec des jeunes engendrés.

(3) On peut maintenant transférer les données. À cette fin, copier et coller chaque colonne de la feuille de calcul renfermant les concentrations, les répétitions et les valeurs moyennes connexes dans le tableau de données de SYSTAT.*

(4) Enregistrer les données en cliquant sur **File** (Fichier), puis sur **Save As** (Enregistrer sous), ce qui ouvre une fenêtre intitulée **'Save As**' (« Enregistrer sous »). Employer le codage approprié pour enregistrer le fichier de données. Sélectionner **Save** (Enregistrer) après avoir saisi le nom du fichier.

(5) Enregistrer le nom du fichier de données de SYSTAT dans la feuille de calcul électronique renfermant les données d'origine.

(6) Si les données (c'est-à-dire les concentrations d'essai) nécessitent une transformation, on peut le faire en cliquant sur **Data** (Données), **Transform** (Transformer), puis **Let...** (Soit...). Une fois dans la fonction **Let...** (Soit...), choisir l'en-tête approprié de colonne pour les données transformées (par ex. logconc), puis choisir **Variable** (Variable) dans la zone '**Add to**' (« Ajouter à ») pour insérer la variable dans la zone intitulée '**Variable:**' (« Variable »). Choisir la transformation appropriée (par ex. L10 pour la transformation en $\log_{10}$ ou LOG pour la transformation en logarithme naturel) dans la zone '**Functions:**' (« Fonctions ») [la zone '**Function Type:**' (« Type de fonction ») devrait être **Mathematical** (Mathématique)], puis cliquer sur **Add** (Ajouter) pour insérer la fonction dans la zone '**Expression:**' (« Expression »). Choisir l'en-tête renfermant les données d'origine non transformées (c'est-à-dire 'conc' pour la concentration ou la variante expérimentale), puis **Expression** (Expression) dans la zone '**Add to**' (« Ajouter à ») pour insérer la variable dans la zone '**Expression:**' (« Expression »). S'il faut un facteur de multiplication pour ajuster la concentration avant sa transformation logarithmique, on peut réaliser cette étape dans la zone '**Expression:**' (« Expression ») [par ex. L10(conc. × 1 000)]. Cliquer sur **OK** quand on a effectué toutes les transformations voulues. Les données transformées apparaîtront dans la colonne appropriée. *Enregistrer les données* (c'est-à-dire cliquer sur **File** [Fichier], puis sur **Save** [Enregistrer]).

Nota : Le $\log_{10}$ de la concentration du témoin négatif ne peut pas être déterminé (c'est-à-dire que le $\log_{10}$ de 0 est indéfini) ; il faut donc affecter au témoin négatif une valeur très faible (par ex. 0,001) que l'on sait ou que l'on pose être une concentration n'exerçant aucun effet, afin d'intégrer cette valeur dans l'analyse et la différencier des autres concentrations ayant subi une transformation.

(7) À partir du tableau de données, calculer et consigner la moyenne des témoins négatifs pour la variable à l'étude ; chaque paramètre de mesure (effet mesuré) est l'objet d'une analyse statistique indépendante. La valeur moyenne de ces données témoins sera nécessaire à l'estimation des paramètres du modèle. En outre, déterminer la valeur maximale de l'ensemble de données correspondant à cette variable particulière et l'arrondir au nombre entier le plus près. Ce nombre sert de valeur maximale à l'axe des *y* (c'est-à-dire « y_{max} ») lors de la création d'un graphique des données soumises à la régression.

J.2.2 Création d'un nuage de points ou d'un graphique linéaire

Les diagrammes de dispersions (nuages de points) et les graphiques linéaires donnent une idée de l'allure de la courbe concentration-réponse correspondant à l'ensemble de données. On peut ensuite comparer la forme de la courbe à chaque modèle (fig. J.1) de façon à retenir le ou les modèles qui sont susceptibles de mieux correspondre aux données. On devrait ensuite utiliser chacun des modèles retenus pour analyser les données. On revoit ensuite chaque modèle et on retient celui qui fournit le meilleur ajustement aux données.

(1) Cliquer successivement sur **Graph** (Graphique), **Summary Charts** (Graphiques sommaires), **Line...** (...Linéaires). Choisir la variable indépendante (par ex. logconc), puis sur **Add** (Ajouter) pour insérer la variable dans la zone '**X-variable(s):**' (« Variable[s] x »). Choisir la variable dépendante en examen, puis cliquer sur **Add** (Ajouter) pour insérer la variable dans la zone '**Y-variable(s):**' (« Variable[s] y »). Cliquer sur **OK**. Un graphique apparaîtra dans l''**Output Pane**' (Sous-fenêtre des résultats) de l'écran principal de SYSTAT renfermant les valeurs moyennes correspondant à chaque variante expérimentale ; pour visualiser une version plus grande du graphique, cliquer

simplement sur l'onglet '**Graph Editor**' (« Éditeur de graphiques ») situé sous la fenêtre centrale. On peut également visualiser le nuage de points correspondant aux données en cliquant sur **Graph** (Graphique), **Plots** (Tracés), puis **Scatterplot...** (Nuages de points...), puis en suivant les même instructions pour l'insertion des variables *x* et *y*. Les graphiques donneront une idée de l'allure générale de la courbe concentration-réponse, qui permettra de retenir le ou les modèles susceptibles de fournir le meilleur ajustement aux données, outre une estimation de la CI p à laquelle on s'intéresse.

Nota : L'écran principal de SYSTAT est divisé en trois parties. Dans la sous-fenêtre de gauche (c'est-à-dire l''**Output Organizer**' [Organisateur des résultats]) on trouve l'énumération de toutes les fonctions appliquées (par ex. les graphiques) — chaque fonction peut être visualisée simplement par la sélection de l'icône voulue. La sous-fenêtre de droite constitue la fenêtre centrale dans laquelle on peut visualiser la restitution générale de toutes les fonctions appliquées (par ex. la régression, les graphiques). Les onglets sous la fenêtre centrale permettent de commuter entre le fichier de données (c'est-à-dire le '**Data Editor**' [« Éditeur de données »]), les graphiques individuels (c'est-à-dire le '**Graph Editor**' [« Éditeur de graphiques »]) et les résultats (c'est-à-dire '**Output Pane**' [sous-fenêtre des résultats]). On peut visualiser individuellement les divers graphiques produits dans le '**Graph Editor**' (« Éditeur de graphiques ») en sélectionnant le graphique voulu dans la partie gauche de l'écran (c'est-à-dire l''**Output Organizer**' [« Organisateur des résultats »]). La partie inférieure de la fenêtre affiche les codes de commande utilisés pour obtenir les fonctions voulues (par ex. pour la régression et la construction de graphiques). L'onglet '**Log**' (« Journal ») de cet écran de commandes permet l'affichage de l'historique de toutes les fonctions ayant été appliquées.

(2) Estimer visuellement et consigner une estimation de la CI p à laquelle on s'intéresse (par ex. la CI 50) pour l'ensemble de données. Par exemple, pour la CI 50, diviser la moyenne des témoins par 2 et trouver cette valeur sur l'axe des ordonnées (*y*). Estimer une ligne horizontale partant de cet axe jusqu'à ce qu'elle coupe le nuage de points. Depuis ce point d'intersection, descendre une ligne verticale vers l'axe des abscisses et consigner la concentration ainsi trouvée comme l'estimation de la CI 50.

(3) À l'aide des nuages de points ou des graphiques linéaires, retenir le ou les modèles susceptibles de mieux décrire la tendance de la relation concentration-réponse (cf. fig. J.1, pour un exemple de chaque modèle).

J.2.3 Estimation des paramètres du modèle

(1) Cliquer sur **File** (Fichier), **Open** (Ouvrir), puis **Command** (Commandes).

(2) Ouvrir le fichier renfermant les codes de commande du modèle retenu au § J.2.2 (c'est-à-dire choisir le fichier approprié, puis cliquer sur **Open** [Ouvrir]):

nonline.syc	=	modèle exponentiel ;
nonling.syc	=	modèle de Gompertz ;
nonlinh.syc	=	modèle hormético-logistique ;
linear.syc	=	modèle linéaire ;
nonlinl.syc	=	modèle logistique.

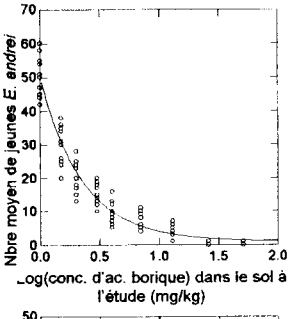
Le fichier fournit les codes de commande du modèle choisi en vertu de l'onglet approprié de la zone de l'éditeur de commandes au bas de l'écran principal. Tous les codes de commande permettant le calcul des CI 50 et des CI 25 figurent dans le tableau J.2 ; cependant, on peut formater les équations permettant le calcul de toute CI p. Par exemple, les codes de commande de la CI 50 par le modèle logistique seraient les suivants :

```
nonlin
```

Modèle exponentiel

CI 50 : jeunes = a*exp(log((a - a*0,5 - b*0,5)/a)*(logconc/x)) + b
CI 25 : jeunes = a*exp(log((a - a*0,25 - b*0,75)/a)*(logconc/x)) + b

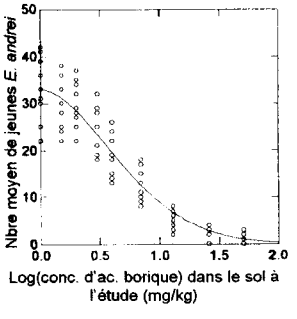
Où :
a = l'ordonnée à l'origine (la réaction des organismes témoins) ;
x = la CI p pour l'ensemble de données ;
logconc = la valeur logarithmique de la concentration d'exposition ;
b = un paramètre d'échelle (estimé entre 1 et 4).



Modèle de Gompertz

CI 50 : jeunes = g*exp((log(0,5))*(logconc/x)^b)
CI 25 : jeunes = g*exp([(log(0,75))*(logconc/x)^b)

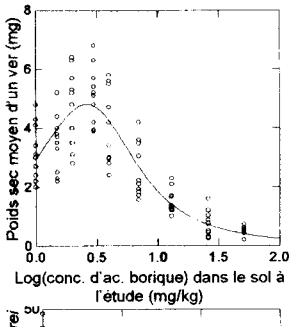
Où :
g = l'ordonnée à l'origine (la réaction des organismes témoins) ;
x = la CI p pour l'ensemble de données ;
logconc = la valeur logarithmique de la concentration d'exposition ;
b = un paramètre d'échelle (estimé entre 1 et 4).



Modèle hormétique

CI 50 : jdrywt = (t*(1 + h*logconc))/(1 + ((0,5 + h*logconc)/0,5)*(logconc/x)^b)
CI 25 : jdrywt = (t*(1+ h*logconc))/(1+ ((0,25+h*logconc)/0,75)*(logconc/x)^b)

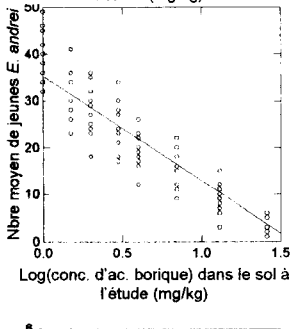
Où :
t = l'ordonnée à l'origine (la réaction des organismes témoins) ;
h = l'effet hormétique (estimé entre 0,1 et 1) ;
x = la CI p pour l'ensemble de données ;
logconc = la valeur logarithmique de la concentration d'exposition ;
b = un paramètre d'échelle (estimé entre 1 et 4).



Modèle linéaire

CI 50 : jeunes = ((-b*0,5)/x)*logconc+b
CI 25 : jeunes = ((-b*0,25)/x)*logconc+b

Où :
b = l'ordonnée à l'origine (la réaction des organismes témoins) ;
x = la CI p pour l'ensemble de données ;
logconc = la valeur logarithmique de la concentration d'exposition.



Modèle logistique

CI 50 : jdrywt = t/(1 + (logconc/x)^b)
CI 25 : jdrywt = t/(1 + (0,25/0,75)*(logconc/x)^b)

Où :
t = l'ordonnée à l'origine (la réaction des organismes témoins) ;
x = la CI p pour l'ensemble de données ;
logconc = la valeur logarithmique de la concentration d'exposition ;
b = un paramètre d'échelle (estimé entre 1 et 4).

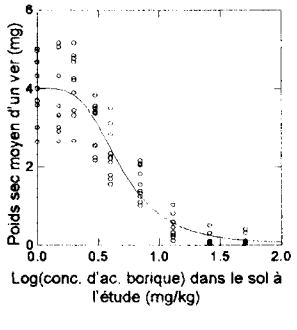


Figure J.1. — Équations des modèles de régression linéaire et non linéaire et exemples de graphiques des tendances observées pour chaque modèle dans la version 11 de SYSTAT

Tableau J.2. — Codes de commande de SYSTAT pour les modèles de régression linéaire et non linéaire

Modèle	Codes de commande	
exponentiel	nonlin print = long model juveniles = a*exp(log((a – a*0,5 – b*0,5)/a)*(logconc/x)) + b save resid1/ resid estimate/start = 50[a], 1[b], 0,3[c] iter = 200 use resid1 pplot residual plot residual*logconc plot residual*estimate	**notes :** [a] l'estimation de l'ordonnée à l'origine (c'est-à-dire *a*) [la réaction des organismes témoins] ; [b] le paramètre d'échelle (c'est-à-dire *b*) [valeur estimée entre 1 et 4) ; [c] l'estimation de CI p pour l'ensemble de données (c'est-à-dire *x*).
de Gompertz	nonlin print = long model juveniles = g*exp((log(0,5))*(logconc/x)^b) save resid2/ resid estimate/start = 32[a], 0,4[b], 1[c] iter = 200 use resid2 pplot residual plot residual*logconc plot residual*estimate	**notes :** [a] l'estimation de l'ordonnée à l'origine (c'est-à-dire *g*) [la réaction des organismes témoins] ; [b] l'estimation de CI p pour l'ensemble de données (c'est-à-dire *x*) ; [c] le paramètre d'échelle (c'est-à-dire *b*) [valeur estimée entre 1 et 4).
hormétique	nonlin print = long model jdrywt = (t*(1 + h*logconc))/(1 + ((0,5 + h*logconc)/0,5)*(logconc/x)^b) save resid3/ resid estimate/ start = 3[a], 0,1[b], 0,7[c], 1[d] iter = 200 use resid3 pplot residual plot residual*logconc plot residual*estimate	**notes :** [a] l'estimation de l'ordonnée à l'origine (c'est-à-dire *t*) [la réaction des organismes témoins] ; [b] l'effet hormétique (c'est-à-dire *h*) [estimé entre 0,1 et 1] ; [c] l'estimation de CI p pour l'ensemble de données (c'est-à-dire *x*). [b] le paramètre d'échelle (c'est-à-dire *b*) [valeur estimée entre 1 et 4) ;
linéaire	nonlin print = long model juveniles =((– b*0,5)/x)*logconc + b save resid4/ resid estimate/ start = 36[a], 0,7[b] iter = 200 use resid4 pplot residual plot residual*logconc plot residual*estimate	**notes :** [a] l'estimation de l'ordonnée à l'origine (c'est-à-dire *b*) [la réaction des organismes témoins] ; [b] l'estimation de CI p pour l'ensemble de données (c'est-à-dire *x*).
logistique	nonlin print = long model juveniles=t/(1 + (logconc/x)^b) save resid5/ resid estimate/ start = 4[a], 0,7[b], 2[c] iter = 200 use resid5 pplot residual plot residual*logconc plot residual*estimate	**notes :** [a] l'estimation de l'ordonnée à l'origine (c'est-à-dire *t*) [la réaction des organismes témoins] ; [b] l'estimation de CI p pour l'ensemble de données (c'est-à-dire *x*) ; [c] le paramètre d'échelle (c'est-à-dire *b*) [valeur estimée entre 1 et 4).

```
print=long
model jdrywt = t/(1+logconc/x)^b)
save resid1/ resid
estimate/ start = 0,5, 0,6, 2 iter=200
use resid1
pplot residual
plot residual*logconc
plot residual*estimate
```

(3) Saisir l'en-tête de la colonne du tableau de données renfermant la variable à analyser dans la ligne intitulée : « model y= » (où *y* est la variable indépendante, par ex *jdrywt*).

(4) La 4e ligne du texte devrait se lire : « save resida/ resid », où *a* est le numéro auquel on affecte le fichier des résidus. Saisir ce même numéro à la 6e ligne (c'est-à-dire « use resida ») pour que le même fichier serve à produire un tracé de probabilité normale et des graphiques des résidus. Les lignes de commandes ci-après donnent des instructions pour la production d'un tracé de probabilité (c'est-à-dire « pplot residual »), la production d'un graphique des résidus en fonction de la valeur de la concentration ou de la variante expérimentale (c'est-à-dire « plot residual*logconc ») et un graphique des résidus en fonction des valeurs prédites et ajustées (c'est-à-dire « plot residual*estimate »). Ces graphiques aident à évaluer les hypothèses de la normalité (par ex. tracé de probabilité) et d'homogénéité des résidus (par ex. graphiques des résidus) lorsqu'on évalue le modèle le mieux ajusté aux données (§ J.2.4).

(5) Dans la 5e ligne intitulée « estimate/start = », remplacer la moyenne des témoins et la CI p estimée (par ex. la CI 50 et/ou la CI 25) [cf. tableau J.2 pour connaître les détails sur cette opération de remplacement relative à chaque modèle]. Ces valeurs ont d'abord été obtenues par examen du nuage de points ou du graphique linéaire. Le modèle, dès qu'il converge, donnera un ensemble de paramètres à partir desquels on signale la CI p et ses limites de confiance à 95 % (c'est-à-dire le paramètre *x*). Il est essentiel de fournir des estimations exactes de chaque paramètre avant d'exécuter le modèle, sinon les itérations servant à calculer les paramètres signaler pourraient ne pas converger. Le paramètre d'échelle (tableau J.2) est typiquement estimé de façon à varier entre 1 et 4. On peut modifier le nombre d'itérations, mais, dans l'exemple qui nous occupe, il a été réglé à 200 (c'est-à-dire « iter = 200 »). Typiquement, 200 itérations suffisent à un modèle pour le faire converger ; s'il en faut davantage, c'est probablement que l'on n'a pas retenu le modèle qui convient le mieux.

(6) Cliquer sur **File** (Fichier), puis **Submit Window** (Appliquer fenêtre) pour exécuter les commande ; on peut également cliquer avec le bouton droit de la souris et choisir **Submit Window** (Appliquer fenêtre). On produit ainsi un imprimé des itérations, les paramètres estimés et une liste des données ponctuelles effectives avec les valeurs et résidus prévus correspondants. On se fait également présenter un graphique préliminaire de la droite estimée de régression : on devrait supprimer ce graphique, ce que l'on peut faire en sélectionnant le graphique se trouvant dans la fenêtre de gauche de l'écran principal. Sont également affichés des graphiques des résidus et un tracé de probabilité normale.

J.2.4 Examen des résidus et test d'hypothèses

L'examen des résidus de chaque modèle éprouvé aide à déterminer si les hypothèses de la normalité de la distribution et de l'homoscédasticité sont vérifiées. Si l'on ne peut vérifier aucune des hypothèses, quel que soit le modèle examiné, on devrait consulter un statisticien pour obtenir des conseils sur l'évaluation de modèles supplémentaires ou on devrait réanalyser les données par la méthode moins souhaitable qu'est l'interpolation linéaire (au moyen du programme ICPIN ; v. § 6.4.2.2).

J.2.4.1 Hypothèses de normalité. — On devrait évaluer la normalité au moyen du *test de Shapiro-Wilk* décrit dans EC (2004b) ; le § J.2.4.3 donne des conseils sur la réalisation de ce test. Le tracé de probabilité normale, présenté dans

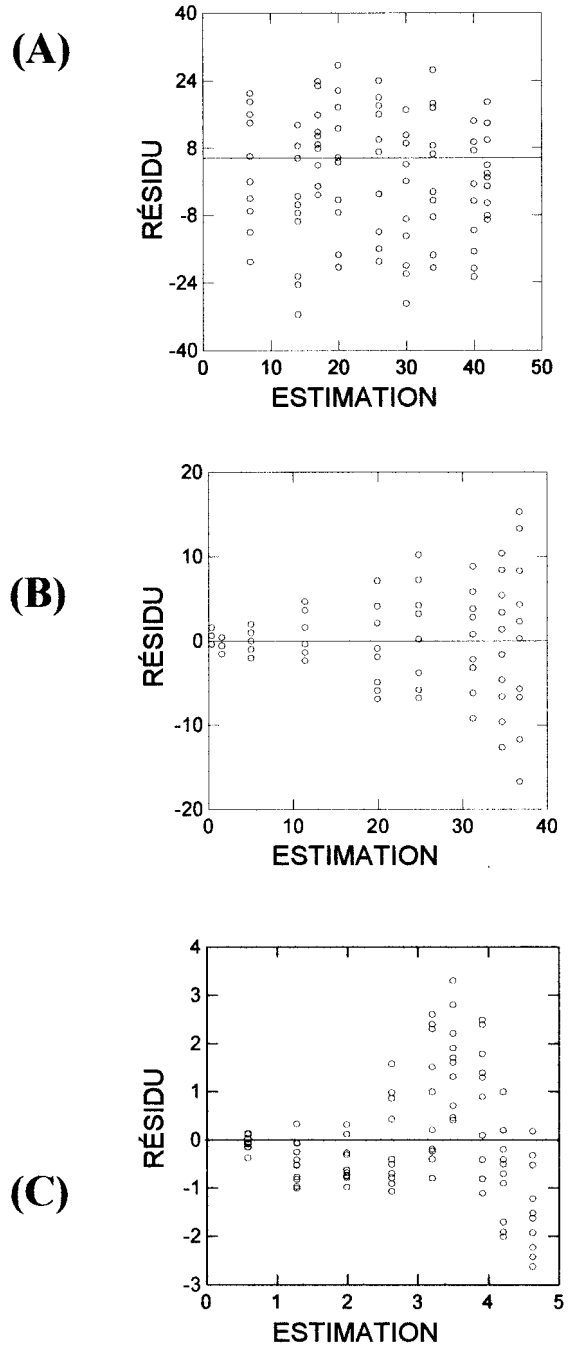


Figure J.2. — Graphique des résidus en fonction des valeurs estimées prédites (c'est-à-dire *residuals*estimate)* montrant le phénomène d'homoscédasticité (A) et deux types d'hétéroscédasticité : le premier révélé par la disposition en éventail ou fuseau (B), qui exige de poursuivre l'examen à l'aide de la régression pondérée ; l'autre montrant un manque systématique d'ajustement (C), du fait de la sélection d'un modèle inadapté.

l'**Output Pane** (Sous-fenêtre des résultats), peut également servir à déterminer si l'hypothèse de normalité est vérifiée. Les résidus devraient dessiner une ligne assez droite, traversant le graphique en diagonale ; la présence d'une courbe traduit un écart par rapport à la normalité. Le tracé de probabilité normale ne devrait cependant pas être le seul test de la normalité, puisque la perception d'une ligne « normale » (par ex. droite) ou « non normale » (par ex. courbe) est subjective. Si les données n'obéissent pas à la loi normale, on devrait essayer un autre modèle, consulter un statisticien pour obtenir d'autres conseils ou analyser les données à l'aide de la méthode moins souhaitable qu'est l'interpolation linéaire.

J.2.4.2 Homogénéité des résidus. — On devrait évaluer l'homoscédasticité (ou l'homogénéité) des résidus à l'aide du *test de Levene* décrit dans EC (2004b) [le § J.2.4.3 donne des conseils sur la réalisation de cet essai], et par comparaison des graphiques des résidus aux valeurs réelles et prévues (estimées). L'homogénéité des résidus se caractérise par une distribution égale de la variance des résidus à toutes les valeurs de la variable indépendante (c'est-à-dire de la concentration ou de la variante expérimentale) [(Figure J.2A]. S'il est significatif, le test de Levene montrera que les données ne sont pas homogènes. Si (d'après le test de Levene) les données sont hétéroscédastiques (c'est-à-dire non homogènes), on devrait examiner les graphiques des résidus. Si la variance varie de façon significative et que les graphiques des résidus ont nettement la forme d'un éventail ou d'un fuseau (cf. fig. J.2B montrant un tracé du « residual*estmate » ; un fuseau de direction opposée est également présenté dans le tracé du « residual*logconc »), on devrait répéter l'analyse des données au moyen de la régression pondérée. D'autre part, une divergence portant à croire à un manque systématique d'ajustement (fig. J.2C) signifie que l'on a retenu un modèle inadapté ou erroné.

J.2.4.3 Évaluation des hypothèses de la normalité et de l'homogénéité des résidus. — La version 11.0 de SYSTAT peut appliquer les tests de Shapiro-Wilk et de Levene à l'évaluation des hypothèses de la normalité et de l'homogénéité des résidus. On ne peut effectuer le test de Levene que si on effectue une analyse de variance sur les valeurs absolues des résidus calculés au § J.2.3.

(1) Cliquer sur **File** (Fichier), **Open** (Ouvrir), puis **Data** (Données), pour ouvrir le fichier de données renfermant les résidus créés au § J.2.3 (par ex. *resid1.syd*).

(2) Insérer un nouveau nom de variable dans une colonne vide, en cliquant deux fois sur le nom de la variable, ce qui fait apparaître la fenêtre '**Variable Properties**' (« Propriétés des variables »). Dans cette fenêtre, insérer le nom convenant aux résidus transformés (par ex. *absresiduals*) dans la zone intitulée '**Variable name:**' (« Nom de la variable »). Transformer les résidus en cliquant sur **Data** (Données), **Transform** (Transformer), puis **Let...** (Soit...). Ayant accédé à la fonction **Let...** (Soit...), choisir l'en-tête de colonne convenant aux données transformées (par ex. *absresiduals*), puis choisir **Variable** (Variable) dans la zone '**Add to**' (« Ajouter ») pour insérer la variable dans cette zone. Choisir la transformation appropriée (par ex. ABS pour la transformation des données en leur valeur absolue) dans la zone '**Functions:**' (« Fonctions ») [la zone '**Function Type:**' (« Type de fonction » devrait indiquer **Mathematical** [Mathématique]), puis choisir **Add** (Ajouter) pour insérer la fonction dans la zone '**Expression:**' (« Expression ». Choisir l'en-tête de colonne renfermant les données d'origine non transformées (c'est-à-dire les résidus), puis **Expression** (Expression), dans la zone '**Add to**' (« Ajouter à »), pour insérer la variable dans la zone '**Expression:**' (« Expression »). Cliquer sur **OK** ; les données transformées apparaîtront dans la colonne appropriée. Enregistrer les données.

(3) Pour effectuer le test de Shapiro-Wilk, cliquer sur **Analysis** (Analyse), **Descriptive Statistics** (Statistiques descriptives), puis **Basic Statistics...** (Statistiques de base...). La fenêtre '**Column Statistics**' (« Statistiques de colonne ») apparaît. Choisir les résidus de la zone '**Available variable(s):**' [« Variable(s) disponible(s) »], puis **Add** (Ajouter) pour insérer cette variable dans la zone '**Selected variable(s):**' [« Variable(s) sélectionnée(s) »]. Dans la zone '**Options**' (« Options »), choisir **Shapiro-Wilk normality test** (le test de normalité de Shapiro-Wilk), puis cliquer sur **OK**. Dans la fenêtre Outpout Organizer (organisateur des résultats) apparaîtra un petit tableau, où la valeur critique de Shapiro-Wilk (c'est-à-dire la 'SW Statistic' [statistique de S.-W.]) et sa probabilité (c'est-à-dire

la ‘SW P-Value’ [valeur *p* de S.-W.]) s’afficheront. Une valeur de probabilité supérieure au critère habituel de *p* > 0,05 dénote une distribution normale des données.

(4) Pour effectuer le test de Levene, cliquer sur **Analysis** (Analyse), **Analysis of Variance (ANOVA)** [Analyse de variance], puis **Estimate Model...** (Estimer le modèle...), ce qui fait apparaître la fenêtre ‘**Analysis of Variance: Estimate Model**’ (« Analyse de variance : estimation du modèle ».

(5) Choisir la variable sous laquelle on veut grouper les données (par ex. *logconc*) et placer cette variable dans la zone ‘**Factor(s):**’ [« Facteur(s) »] en cliquant sur **Add** (Ajouter).

(6) Choisir les résidus transformés (c’est-à-dire *absresiduals*), puis **Add** (Ajouter), pour insérer la variable dans la zone ‘**Dependent(s):**’ [« Variable(s) dépendante(s) »]. Cliquer sur **OK**. Dans la sous-fenêtre ‘**Output Pane**’ (« Sous-fenêtre des résultats ») apparaît un graphique des données et une visualisation des résultats. Une valeur de probabilité supérieure au critère habituel de *p* > 0,05 signifie que les données sont homogènes.

J.2.5 Pondération des données

Si les données sont hétéroscédastiques, d’après le test de Levene et que, d’une variante expérimentale à l’autre, la variance varie de façon significative (c’est-à-dire disposition nettement en éventail ou en fuseau ; v. fig. J.2B), il faudrait réanalyser les données par régression pondérée. Celle-ci emploie l’inverse de la variance des observations correspondant à chaque concentration ou variante expérimentale comme facteur de pondération. Dans la régression pondérée, on compare l’erreur type de la CI p (présentée dans SYSTAT comme l’erreur type asymptotique [‘A.S.E.’ (pour *asymptotic standard error*) ; cf. fig. J.3]) à l’erreur calculée par régression non pondérée. Si les deux erreurs types diffèrent de plus de 10 %, on retient la régression pondérée. Cependant, si la variance correspondant à toutes les variantes expérimentales varie de façon significative et si les deux erreurs types diffèrent de moins de 10 % **, on devrait consulter un statisticien pour obtenir des conseils supplémentaires et appliquer des modèles supplémentaires et on pourrait analyser à nouveau les données par la méthode moins souhaitable qu’est l’interpolation linéaire. Pour chacun des modèles retenus, on compare la régression pondérée et la non pondérée, tout en réalisant le processus de sélection finale du modèle (c’est-à-dire du modèle et de la régression constituant le meilleur choix). Par ailleurs, si le test de Levene montre que les données ne sont pas homogènes et que les graphiques des résidus montrent leur non-divergence (par ex. fig. J.2C), il se peut que l’on ait retenu un modèle inadapté ou erroné. Il est alors conseillé de consulter un statisticien pour obtenir d’autres conseils sur l’emploi et l’application de modèles de rechange.

(1) Cliquer sur **File** (Fichier), **Open** (Ouvrir), puis **Data** (Données). Choisir le fichier renfermant l’ensemble de données à pondérer. Insérer les deux nouveaux noms de variables dans l’en-tête de colonne, en cliquant deux fois sur le nom d’une variable, ce qui ouvre la fenêtre ‘**Variable Properties**’ (« Propriétés des variables »). Dans cette fenêtre, insérer le nom qui convient de la variable à laquelle on s’intéresse, choisir le type de variable et, si on le désire, ajouter des commentaires. Les deux nouveaux en-têtes de colonnes devraient indiquer la variance d’une variable particulière (par ex. *varjdrywt*) et l’inverse de la variance de cette variable (par ex. *varinvsjdrywt*). Enregistrer le fichier de données en cliquant sur **File** (Fichier), puis **Save** (Enregistrer).

(2) Cliquer sur **Data** (Données), puis sur **By Groups...** (Par groupe...). Cliquer sur la variable indépendante (c’est-à-dire *logconc*), puis sur **Add** (Ajouter), pour insérer la variable dans la zone ‘**Selected variable(s):**’ [« Variable(s) choisie(s) »] ; cela permettra la détermination de la variance de chaque concentration ou variante expérimentale (c’est-à-dire par « groupe »). Cliquer sur **OK**.

** La valeur de 10 % est purement empirique. Des tests permettent de juger objectivement de l’amélioration due à la pondération, mais ils dépassent notre propos. On ne devrait recourir à la pondération qu’en cas de nécessité, l’opération risquant de compliquer davantage la modélisation. On devrait consulter un statisticien lorsque la pondération est nécessaire, mais que les estimations des paramètres sont absurdes.

```
SYSTAT Rectangular file C:\SYSTAT\STATAPP.SYS, (Fichier rectangulaire SYSTAT C:\SYSTAT\STAPAPP.SYS)
created Tue May 25, 2004 at 13:46:14, contains variables: (créé le mardi 25 mai 2005 à 13:46:14)
                    CONC       REP        LOGCONC    JUVENILES    JDRYWT

 Iteration (itération)
 No. Loss (perte)    G            X            B
   0 .452080D+04  .340000D+02  .400000D+00  .100000D+01
   1 .184579D+04  .328003D+02  .708478D+00  .157121D+01
   2 .157417D+04  .331384D+02  .696189D+00  .197718D+01
   3 .156445D+04  .329695D+02  .702780D+00  .211068D+01
   4 .156432D+04  .329461D+02  .703292D+00  .212794D+01
   5 .156432D+04  .329427D+02  .703387D+00  .212931D+01
   6 .156432D+04  .329424D+02  .703394D+00  .212941D+01

Dependent variable is JUVENILES (variable dépendante : juveniles [jeunes])

Source (source)                      Sum-of-Squares df     Mean-Square
                                     (somme des carrés) (diff.)  (moy. des carrés)
Regression (régression)                   41208.68     3    13736.228
Residual (résidu)                          1564.32    87       17.981

Total (total)                             42773.00    90
Mean corrected (moyenne corrigée)         15140.46    89

        Raw R-square (1-Residual/Total)          =    0.963     (R² brut [1 − résidu/total])
 Mean corrected R-square (1-Residual/Corrected)  =    0.897     (R² moy. corrigé [1− résidu/corrigé])
        R(observed vs predicted) square          =    0.897     (R[observé vs prédit]²)

                              Wald Confidence Interval (intervalle de confiance de Wald)
Parameter       Estimate    A.S.E.  Param/ASE       Lower  < 95 % >    Upper
(paramètre)   (valeur estimée)  (ETA)  (param./ETA)    (inf.)              (sup.)
G                 32.942     1.031     31.952      30.893             34.992
X                  0.703     0.031     22.898       0.642              0.764
B                  2.129     0.229      9.299       1.674              2.585

         JUVENILES  JUVENILES                 (Jeunes)  (Jeunes)
 Case     Observed  Predicted  Residual   (cas) (observé)  (prédit)  (résidu)
     1      36.000     32.942      3.058
     2      31.000     32.942     -1.942
     3      22.000     32.942    -10.942
     4      25.000     32.942     -7.942
     5      39.000     32.942      6.058
     6      42.000     32.942      9.058
     7      39.000     32.942      6.058
    [...]       [...]      [...]      [...]
    86       2.000      0.337      1.663
    87       0.000      0.337     -0.337
    88       0.000      0.337     -0.337
    89       1.000      0.337      0.663
    90       0.000      0.337     -0.337

Asymptotic Correlation Matrix of Parameters (matrice de corrélation asymptotique des paramètres)
```

	G	X	B
G	1.000		
X	-0.696	1.000	
B	-0.611	0.566	1

moyenne des carrés des erreurs résiduelles

CI p, erreur type asymptotique (ETA) et limites inférieure et supérieure de confiance à 95 %

Figure J.3. — Exemple des résultats initiaux donnés par le modèle de Gompertz dans la version 11 de SYSTAT. On y trouve la moyenne des carrés des erreurs résiduelles utilisée pour trouver le modèle à retenir, de même que les CI p, l'erreur type de l'estimation ainsi que les limites supérieure et inférieure de confiance à 95 %. Dans un souci de concision, nous avons délibérément écourté l'affichage du nombre de cas ; cependant les résultats présentés par SYSTAT exposent tous les cas ayant donné lieu à une mesure effective de la variable ainsi que l'estimation prédite et le résidu qui lui correspondent.

(3) Cliquer sur **Analysis** (Analyse), **Descriptive Statistics** (Statistiques descriptives), puis **Basic Statistics...** (Statistiques de base...). Choisir la variable à pondérer (par ex. *jdrywt*), puis cliquer sur **Add** (Ajouter) pour insérer cette variable dans la zone '**Selected variable(s):**' [« Variable(s) choisie(s) »]. Cliquer sur **Variance** dans la zone '**Options**' [« Options »], puis sur **OK**. Cette fonction affiche la variance de la variable à laquelle on s'intéresse, groupée par concentration ou variante expérimentale dans la sous-fenêtre '**Output Pane**' (« Sous-fenêtre des résultats ») de l'écran principal.

(4) Cliquer sur **Data** (Données), **By Groups...** (Par groupes...), puis dans la boîte à côté de **Turn off** (Fermer), puis sur **OK** pour que toute analyse subséquente ne porte pas sur chaque concentration ou variante expérimentale individuelle ; l'analyse devrait porter sur toutes les données prises globalement.

(5) Revenir au fichier de données en cliquant sur l'onglet '**Data Editor**' (« Éditeur de données ») de l'écran principal. Transférer les variances correspondant à chaque concentration ou variante expérimentale vis-à-vis la concentration correspondante de la colonne des variances (par ex. *varjdrywt*). À noter que la variance est la même entre les répétitions d'une même variante expérimentale.

(6) Cliquer sur **Data** (Données), **Transform** (Transformer), puis **Let...** (Soit...), puis, enfin, sur l'en-tête de colonne renfermant l'inverse de la variance (par ex. *varinvsjdrywt*) de la variable à laquelle on s'intéresse, puis sur **Variable** (Variable), dans la zone **'Add to'** (« Ajouter à ») pour insérer la variable dans la zone **'Variable:'** (« Variable »). Sélectionner la zone '**Expression:**' (« Expression »), puis l'en-tête de la colonne des variances (par ex. *varjdrywt*) de la variable à laquelle on s'intéresse, pour chaque répétition et concentration, puis cliquer sur **Expression** dans la zone '**Add to**' (« Ajouter à ») pour insérer la variable dans la zone '**Expression:**' (« Expression »). Cliquer sur **OK**. L'inverse de la variance de chaque répétition et concentration s'affichera dans la colonne appropriée. Enregistrer les données en cliquant sur **File** (Fichier), puis **Save** (Enregistrer).

(7) Cliquer sur **File** (Fichier), **Open** (Ouvrir), puis **Command** (Commandes) ; ouvrir le fichier des codes de commande pour l'estimation des paramètres d'équation (par ex. § J.2.3, étape 2) du modèle retenu pour l'analyse *sans pondération.*

(8) Insérer une rangée supplémentaire après la 3e ligne en tapant : « weight=varinvsy » où *y* est la variable dépendante à pondérer (par ex. weight=varinvsjdrywt), conformément à la zone en grisé ci-après :

```
nonlin
print=long
model jdrywt = t/(1+(logconc/x)^b)
weight=varinvsjdrywt
save resid2/ resid
estimate/ start = 0,5, 0,6, 2 iter=200
use resid2
pplot residual
plot residual*logconc
plot residual*estimate
```

(9) Attribuer un nouveau nombre aux résidus dans la ligne intitulée « save resida » (où *a* représente ce nombre).

(10) Insérer la moyenne des témoins et la CI p estimée dans la ligne intitulée « estimate/ start... » (cf. tableau J.2 pour connaître les détails de l'opération relatifs à chaque modèle). Ces estimations seront les mêmes que celles que l'on a utilisées pour l'analyse sans pondération.

(11) Cliquer sur **File** (Fichier), puis sur **Submit Window** (Appliquer fenêtre) pour exécuter les commandes. Cela produira le résultat des itérations, les paramètres estimés et une liste des données ponctuelles avec les résidus et les données ponctuelles prédites qui leur correspondent, dans la sous-fenêtre '**Output Pane**' (« Sous-fenêtre des résultats ») de l'écran principal. Un graphique préliminaire de la droite de régression estimée s'affichera également : il faudrait le supprimer. S'afficheront également un tracé de probabilité normale et des graphiques des résidus.

(12) Procéder à l'analyse décrite dans le § J.2.4 pour s'assurer de la confirmation de toutes les hypothèses du modèle.

(13) Comparer l'analyse de régression pondérée à la non pondérée. Choisir la pondérée si la pondération a réduit l'erreur type de la CI p de 10 % par rapport à la non pondérée.

J.2.6 Valeurs aberrantes et observations inhabituelles

Les valeurs aberrantes dénotent une mesure qui ne semble pas s'accorder aux autres valeurs obtenues à la faveur de l'essai. On peut les reconnaître ainsi que les observations inhabituelles à l'examen de l'ajustement de la courbe concentration-réponse à toutes les données ponctuelles et à l'examen des graphiques des résidus. Si on a observé une valeur aberrante, on devrait chercher dans l'enregistrement de l'essai (par ex. données inscrites à la main et données électroniques ainsi que les conditions dans lesquelles l'expérience s'est déroulée) pour y déceler une erreur humaine. Si la valeur aberrante est une erreur unique, résultant d'une transcription et irréparable ou si elle résulte d'un mode opératoire défectueux (par ex. un adulte d'*E. andrei* d'une enceinte expérimentale y a été laissé accidentellement et y est resté pendant 8 semaines à se reproduire), il faudrait soustraire à l'analyse la donnée ponctuelle en question. Si on a trouvé une valeur aberrante, il faudrait réaliser l'analyse en tenant compte et en ne tenant pas compte de cette valeur. La décision de supprimer et de ne pas supprimer la valeur aberrante devrait également tenir compte des écarts biologiques naturels ainsi que des raisons biologiques qui pourraient avoir causé l'anomalie apparente. Que la valeur aberrante soit supprimée ou non, l'analyse finale doit s'accompagner d'une description des données, des valeurs aberrantes, des analyses effectuées avec et sans la valeur aberrante et des conclusions interprétatives. S'il semble y avoir plus d'une valeur aberrante, on devrait réévaluer le modèle retenu, qui semblait convenir, et envisager des modèles de rechange. On trouve des conseils supplémentaires sur la présence de valeurs aberrantes et d'observations inhabituelles dans EC (2004b), qu'on devrait consulter pour obtenir de plus amples détails.

On peut exécuter la fonction d'analyse de variance (ANOVA) de SYSTAT pour déterminer si des valeurs aberrantes se trouvent parmi les données. Cependant, l'analyse de variance repose sur l'hypothèse selon laquelle les résidus obéissent à la loi normale et que, en conséquence, il faut accepter les hypothèses de la normalité des données avant d'employer la fonction ANOVA pour déceler les valeurs aberrantes. On peut également déceler les valeurs aberrantes à la lecture des graphiques des résidus.

(1) Effectuer une analyse de variance de la façon décrite dans le § J.4 de la présente annexe, afin de déterminer s'il se trouve des valeurs aberrantes parmi les données. Toute valeur aberrante sera identifiée par un numéro de cas correspondant au numéro de rang dans le fichier de données de SYSTAT. Ce programme utilise les résidus « studentisés » comme indicateurs de valeurs aberrantes ; les valeurs supérieures à 3 dénotent une valeur qui pourrait être aberrante. Cela devrait être confirmé par les graphiques des résidus.

(2) Si on décide de supprimer les valeurs aberrantes, il faut les supprimer du tableau (fichier) initial de données, puis enregistrer le fichier sous un *nouveau* nom (c'est-à-dire cliquer sur **File** [Fichier], puis **Save As...** [Enregistrer sous]).

Par exemple, le nouveau nom du fichier pourrait contenir la lettre *o* (pour outlier[s] removed [valeurs aberrantes supprimées]) à la fin du nom original du fichier.

(3) Répéter la régression avec les données débarrassées des valeurs aberrantes, en utilisant le même modèle et les mêmes paramètres estimés que ceux qui ont servi avant la suppression des valeurs aberrantes. On pourrait également utiliser des modèles supplémentaires pour l'analyse si le modèle de rechange se traduit par un ajustement meilleur et une plus petite moyenne des carrés des erreurs résiduelles. Si la suppression des valeurs aberrantes ne modifie pas sensiblement la moyenne des carrés des erreurs résiduelles et la CI p (y compris ses intervalles correspondants de confiance), il faut que l'analyste prenne une décision subjective (c'est-à-dire use de son jugement professionnel) pour inclure ou ne pas inclure les valeurs aberrantes. Cette décision doit être motivée et consignée avec l'analyse finale.

J.2.7 Sélection du modèle le plus approprié

Une fois que tous les modèles parmi lesquels il faut choisir ont été ajustés, il faudrait évaluer chacun d'eux relativement à la normalité, à l'homogénéité des résidus et à la moyenne des carrés des erreurs résiduelles. On devrait retenir comme le plus approprié le modèle qui satisfait à toutes les hypothèses et auquel correspond la plus petite moyenne des carrés des erreurs résiduelles (cf. fig. J.3). Cependant, dans le cas où plus d'un modèle aboutit à la même moyenne des carrés des erreurs résiduelles et où tous les autres facteurs sont équivalents, il faudrait retenir le plus simple. Si on a effectué une régression pondérée, il faudrait comparer les analyses pondéré et non pondérée et rejeter la pondérée si la pondération a diminué l'erreur type de la CI p de plus de 10 %. La moyenne des carrés des erreurs résiduelles est présentée dans la sous-fenêtre '**Output Pane**' (« Sous-fenêtre des résultats ») immédiatement après les itérations et avant les estimations des paramètres. Cependant, si aucun des modèles n'est bien ajusté aux données, il est conseillé de consulter un statisticien pour l'application de modèles supplémentaires ou d'analyser à nouveau les données à l'aide de la méthode moins désirable d'analyse qu'est l'interpolation linéaire (v. § 6.4.2.2).

Nota : Comme, dans les calculs, on a transformé les concentrations ou variantes expérimentales en logarithmes, on devrait transformer les CI p et leurs limites de confiance en valeurs arithmétiques pour leur présentation.

J.2.8 Tracé de la courbe concentration-réponse

Une fois le modèle approprié retenu, il faut tracer la courbe concentration-réponse pour ce modèle particulier.

(1) Dans l'écran de l'éditeur de commandes au bas de l'écran, copier l'équation du modèle (c'est-à-dire l'équation à droite du signe =, à la 3e ligne des codes de commandes énumérés dans le tableau J.2), prise parmi les codes de commandes servant au calcul des estimations pour le modèle retenu ; l'équation devrait comprendre les caractères alphabétiques originels (par ex. *t, b, h,* etc.). On peut copier l'équation en la mettant en surbrillance et en cliquant sur **Edit** (Édition), puis **Copy** (Copier) [ou en actionnant le bouton droit de la souris, puis en cliquant sur **Copy** (Copier)].

(2) Cliquer sur **File** (Fichier), **Open** (Ouvrir), puis **Command** (Commandes) et ouvrir un fichier existant de commande graphique (c'est-à-dire tout fichier ayant l'extension *.cmd) semblable à l'exemple ci-après (ou, au besoin, en créer un), à l'aide du modèle logistique. Le premier tracé (c'est-à-dire *plot*) est un nuage de points de la variable indépendante en fonction de la série de logarithmes de concentrations (log concentration). Le second tracé (c'est-à-dire *fplot*) est l'équation de régression, superposée au nuage de points.

```
graph
begin
plot jdrywt*logconc/ title = 'Poids sec des jeunes E. andrei', xlab = 'Log(ug d'acide borique/kg de poids
sec de sol)', ylab='Poids (mg)',
xmax = 2, xmin = 0, ymax = 6, ymin = 0
```

```
fplot y=4,01241/(1+(logconc/0,68263)^3,72182) ; xmin = 0,
xmax =2, xlab =’‘ ymin = 0, ylab =’‘, ymax = 6
end
```

(3) Coller l’équation copiée à la place de l’équation préexistante (figurant dans la zone grisée qui précède), en mettant l’équation précédente en surbrillance, puis en cliquant sur **Edit** (Édition), puis **Paste** (Coller) [ou en actionnant le bouton droit de la souris, puis en cliquant sur **Paste** (Coller)]. Remplacer tous les caractères alphabétiques (par ex. *t, b, h, x, a*, etc.) ainsi que les estimations respectives fournies dans la sous-fenêtre ‘**Output Pane**’ (« Sous-fenêtre des résultats ») produite par l’application du modèle retenu.

(4) Saisir l’information convenable dans la ligne intitulée : « plot y*logconc... », où *y* est la variable dépendante à l’étude (par ex. *jdrywt*). Ajuster les valeurs numériques de « xmax » (c’est-à-dire la concentration logarithmique maximale utilisée) et « ymax » (cf. § J.2.1, étape 7) en conséquence. S’assurer que toutes les entrées de « xlab » et « ylab » (c’est-à-dire les étiquettes des axes) sont justes. Sinon les corriger en conséquence. S’assurer que tous les guillemets et toutes les virgules sont placés dans le programme de commande de la façon montrée dans l’exemple précédent ; SYSTAT est indifférent à la casse et à l’espacement.

Nota :	*title*	s’applique au titre du graphique ;
	xlab	s’applique au libellé de l’axe des abscisses (*x*) ;
	xmin	s’applique à la valeur minimale demandée pour cet axe ;
	xmax	s’applique à la valeur maximale demandée pour cet axe ;
	ylab	s’applique au libellé de l’axe des ordonnées (*y*) ;
	ymax	s’applique à la valeur maximale demandée pour cet axe ;
	ymin	s’applique à la valeur minimale demandée pour cet axe.

Les valeurs de *xmin*, *xmax*, *ymin* et *ymax* doivent être les mêmes dans les deux tracés, pour que la superposition de la droite de régression sur le nuage de points soit parfaite. Un exemple du graphique final de régression est reproduit dans la fig. J.1, pour chacun des cinq modèles proposés.

(5) Cliquer sur **File** (Fichier), puis **Save As** (Enregistrer sous) afin d’enregistrer les codes de commande graphique dans le dossier approprié de travail utilisant le même codage que celui qui a servi à produire le fichier de données, avec indication du modèle auquel correspond la régression. Cliquer sur **Save** (Enregistrer) pour enregistrer le fichier.

(6) Cliquer sur **File** (Fichier), puis **Submit Window** (Appliquer fenêtre) pour traiter les codes de commande. Apparaîtra un graphique de la régression utilisant les paramètres d’estimation du modèle retenu.

J.3 Détermination de CI p supplémentaires

Dans certains cas, il pourrait être souhaitable d’estimer une autre valeur de *p* (à la place de la CI 50 ou en sus). Les modèles proposés par Stephenson *et al.* (2000b) permettent la sélection et la détermination de toute CI p. Le paragraphe ci-après de même que la fig. J.1 renferment des conseils sur la détermination de la CI 25. Toutefois, on peut adapter les modèles à toute valeur de *p* (par ex. la CI 20).

(1) Cliquer sur **File** (Fichier), **Open** (Ouvrir), puis **Command** (Commandes) et ouvrir le fichier correspondant aux codes de commande employés pour produire les paramètres d’estimation (cf. tableau J.2 pour un aperçu des codes de commande de chaque modèle). Modifier l’équation du modèle en vue du calcul de la CI p recherchée (par ex. la CI 25) ; la fig. J.1 renferme des conseils sur la modification des modèles pour permettre le calcul de la CI 25. Toutefois, on peut déterminer toute CI p en modifiant les fractions utilisées dans chaque modèle. Par exemple, pour

calculer la CI 20 au moyen du modèle logistique, il faudrait remplacer l'équation servant au calcul de la CI 50 ('t/[1 + (logconc/x)^b]) par la suivante : t/[1(0,20/0,80)*(logconc/x)^b.

(2) Une fois l'équation ajustée pour la CI p à laquelle on s'intéresse, suivre chaque étape exposée dans le § J.2.3. Toutefois, remplacer la CI p estimée (par ex. la CI 25) dans 5e ligne, intitulée « estimate/ start= » (cf. fig. J.1 pour connaître les détails du remplacement dans chaque modèle). Ces valeurs proviennent, à l'origine, d'un examen du nuage de points ou d'un graphique linéaire. Le modèle, dès qu'il converge, donne un ensemble de paramètres parmi lesquels sont exposées la CI p et ses limites correspondantes de confiance à 95 % (c'est-à-dire le paramètre *x*).

(3) Passer à l'analyse décrite dans les § J.2.4 à J.2.8 ci-dessus.

J.4 Analyse de variance (ANOVA)

(1) Cliquer sur **File** (Fichier), **Open** (Ouvrir), puis **Data** (Données) pour ouvrir le fichier de données renfermant toutes les observations concernant l'ensemble de données à l'examen.

(2) Cliquer sur **Analysis** (Analyse), **Analysis of Variance (ANOVA)** [Analyse de variance], puis **Estimate Model...** (Estimer le modèle...).

(3) Sélectionner la variable sous laquelle il faut grouper les données (par ex. logconc) et placer cette variable dans la zone '**Factor(s):**' [« Facteur(s) »] en cliquent sur **Add** (Ajouter).

(4) Choisir la variable à laquelle on s'intéresse (par ex. jdrywt), puis cliquer sur **Add** (Ajouter), afin d'insérer la variable dans la zone '**Dependent(s):**' [« Variable(s) dépendante(s) »].

(5) Sélectionner la zone à côté de '**Save**' (« Enregistrer ») [à l'angle inférieur gauche de la fenêtre 'Analysis of Variance: Estimate Model' (« Analyse de variance : estimer le modèle ») puis la faire défiler vers le bas jusqu'aux sélections d'accompagnement pour choisir **Residuals/Data** (Résidus/données). Saisir un nom convenable de fichier dans la zone vide adjacente pour sauvegarder (enregistrer) les résidus (par ex. anova1). Cliquer sur **OK**. Apparaît un graphique des données et les résultats produits, dans la sous-fenêtre '**Output Pane**' (« Sous-fenêtre des résultats »). Toute valeur aberrante, d'après les résidus « studentisés », est alors identifiée (cf. § J.2.6 pour obtenir des conseils sur l'évaluation de la ou des valeurs aberrantes.

(6) Évaluer les hypothèses de normalité et d'homogénéité des résidus, conformément au § J.2.4, à l'aide du fichier de données créé pour enregistrer les résidus ou les données avant la réalisation de l'analyse de variance (c'est-à-dire anova1). Après avoir évalué la normalité et l'homogénéité des résidus à l'aide des tests de Shapiro-Wilk et de Levene, respectivement, on utilise le codage ci-dessous pour examiner les graphiques des résidus :

```
graph
use anova1
plot residual*logconc
plot residual*estimate.
```