



MÉTHODE D'ESSAI BIOLOGIQUE :



Essai de mesure de la
reproduction des acariens
oribates exposés à des
contaminants dans le sol



Version PDF :
No de cat. : En83-10/1-61-2020F-PDF
ISBN : 978-0-660-35726-3

À moins d'avis contraire, il est interdit de reproduire le contenu de cette publication, en totalité ou en partie, aux fins de diffusion commerciale sans avoir obtenu au préalable la permission écrite de l'administrateur du droit d'auteur d'Environnement et Changement climatique Canada. Si vous souhaitez obtenir du gouvernement du Canada les droits de reproduction du contenu à des fins commerciales, veuillez demander l'affranchissement du droit d'auteur de la Couronne en communiquant avec :

Environnement et Changement climatique Canada
Centre de renseignements public
12^e étage, édifice Fontaine
200, boulevard Sacré-Cœur
Gatineau (Québec) K1A 0H3
Téléphone : 819-938-3860
Sans frais : 1-800-668-6767 (au Canada seulement)
Courriel : ec.enviroinfo.ec@canada.ca

Photo de la page couverture : *Oppia nitens*, Valerie Behan-Pelletier, Section d'acarologie, Direction générale de la recherche, Agriculture et Agroalimentaire Canada © Environnement et Changement climatique Canada

© Sa Majesté la Reine du chef du Canada, représentée par la ministre de l'Environnement et du Changement climatique, 2020

Also available in English

Méthode d'essai biologique : **Essai de mesure de la reproduction des acariens oribates** **exposés à des contaminants dans le sol**

Unité de l'élaboration et de l'application des méthodes
Direction générale des sciences et de la technologie
Environnement et Changement climatique Canada
Ottawa (Ontario)

DGST 1/RM/61
Septembre 2020

Commentaires

Prière d'adresser vos commentaires et observations sur la teneur du présent rapport à :

Richard Scroggins, chef
Section de l'évaluation biologique et normalisation
Direction générale des sciences et de la technologie
Environnement et Changement climatique Canada
335, chemin River
Ottawa (Ontario)
K1A 0H3

Les demandes de renseignements généraux concernant la présente méthode peuvent être adressées à :
ec.methodes-methods.ec@canada.ca

Avis de révision

Le présent document a été révisé par le personnel de la Direction générale des sciences et de la technologie d'Environnement et Changement climatique Canada, et sa publication a été autorisée. La mention d'appellations commerciales ou de produits offerts sur le marché ne constitue pas une approbation, par Environnement et Changement climatique Canada, de l'emploi de ces derniers. D'autres produits de valeur comparable peuvent être utilisés.

Résumé

Le présent document décrit en détail les modes opératoires, les conditions et les directives applicables à la préparation et à l'exécution d'un essai biologique visant à mesurer la toxicité d'un sol au moyen d'un acarien oribate, *Oppia nitens*. Il s'agit d'un essai de 28 jours visant à déterminer les effets sur la reproduction des acariens. La méthode d'essai est exécutée en conditions statiques au cours duquel on utilise un ou des échantillons de sol contaminé ou susceptible d'être contaminé, ou encore, à une ou des concentrations d'une ou de plus d'une substance chimique dont on enrichit un sol témoin négatif (ou autre). De l'eau et des aliments (levure sèche granulée) sont ajoutés aux récipients d'essai pendant l'essai.

L'essai est mené à une température moyenne de 20 ± 2 °C dans des flacons en verre de 30 mL (diamètre intérieur de ~2,6 cm), ou dans d'autres récipients appropriés, qui peuvent contenir un volume mesuré d'environ 20 mL de sol ou un volume permettant d'obtenir une épaisseur de sol de ≥ 3 cm, avec une teneur en humidité optimale. Au début de l'essai, on transfère 15 organismes expérimentaux synchrones (adultes, âgés de 8-10 jours après l'exuviation jusqu'au stade adulte) dans chaque récipient de répétition contenant un échantillon de sol d'essai ou de sol non contaminé (sol témoin négatif ou de référence). Il faut préparer au moins 5 répétitions pour chaque traitement. À la fin de l'essai, les acariens vivants (adultes et descendants) sont extraits du sol au moyen de la chaleur, et on détermine le nombre d'individus dans chaque répétition et chaque traitement. La moyenne des répétitions pour chaque traitement est calculée, et le pourcentage de la concentration entraînant un effet est estimé pour l'inhibition de la reproduction (p. ex., CIp).

Le présent document décrit les conditions et modes opératoires généraux ou universels applicables à la préparation et à l'exécution de l'essai. Il renferme aussi une description des conditions et modes opératoires supplémentaires propres à l'usage prévu des résultats de chaque essai. La méthode d'essai biologique présentée ici convient à la mesure et à l'évaluation de la toxicité d'échantillons de sol, de biosolides, de boues ou de matière particulaire semblable prélevés sur le terrain, ou encore de sol naturel ou artificiel enrichi en laboratoire avec des produits chimiques commerciaux ou des substances d'essai. Sont incluses des instructions et des exigences relatives aux éléments suivants : installations d'essai; prélèvement, manipulation et entreposage des échantillons; élevage des organismes expérimentaux; préparation du sol ou des mélanges de sol enrichi; mise en route de l'essai; conditions propres à l'essai; observations et mesures pertinentes; paramètres et méthodes de calcul; utilisation d'une répétition de sol témoin positif ou d'un essai de toxicité de référence.

Avant-propos

Le présent document fait partie d'une série de **méthodes recommandées** pour mesurer et évaluer les effets toxiques de l'exposition d'organismes terrestres ou aquatiques à des échantillons de substances ou matières toxiques ou susceptibles d'être toxiques, dans des conditions de laboratoire contrôlées et définies. Environnement et Changement climatique Canada (anciennement Environnement Canada) a évalué ces méthodes et en préconise l'emploi :

- dans ses laboratoires d'écotoxicologie;
- pour les essais qu'il donne en sous-traitance ou que demandent des organismes ou des entreprises de l'extérieur;
- en l'absence d'instructions plus précises, comme dans les règlements;
- en vue de l'élaboration d'instructions très explicites, comme celles qui pourraient être exigées dans un *protocole réglementaire* ou une *méthode de référence* normalisée.

Les différents types d'essais inclus dans cette série ont été choisis parce qu'ils répondent aux besoins des programmes de protection et de gestion de l'environnement que mène Environnement et Changement climatique Canada. Les documents de la série ont pour objet d'orienter les utilisateurs et de faciliter la mise en œuvre de modes opératoires cohérents, pertinents et intégrés en vue de recueillir des données sur la toxicité, pour des organismes terrestres ou aquatiques, d'échantillons de substances ou de matières destinées à être dispersées dans l'environnement ou présentes dans l'environnement. Selon la ou les méthodes d'essai biologique choisies et le milieu naturel visé, les substances ou matières dont la toxicité doit être mesurée pourraient comprendre des échantillons de substances chimiques, de sol ou de matière particulaire semblable, de sédiment ou de matière particulaire semblable, d'effluent, d'élutriat, de lixiviat ou d'eau réceptrice. On trouvera à l'annexe A du présent document la liste des méthodes d'essai biologique et des documents d'orientation publiés jusqu'à maintenant par Environnement et Changement climatique Canada dans cette série.

Les termes définis dans la section « Terminologie » sont en italique lorsqu'ils sont mentionnés pour la première fois dans le texte, conformément à la définition qui en est donnée ici.

Table des matières

Résumé	iii
Avant-propos	iv
Table des matières	v
Liste des tableaux	viii
Liste des figures	viii
Liste des sigles, acronymes, abréviations, symboles et formules chimiques.....	ix
Terminologie	x
Remerciements.....	xxii

Section 1

Introduction	1
1.1 Contexte.....	1
1.2 Identification, répartition et cycle biologique d' <i>Oppia nitens</i> (C. L. Koch)	3
1.3 Historique de l'utilisation des acariens dans les essais de toxicité.....	5

Section 2

Organismes expérimentaux	8
2.1 Espèces et stade de développement	8
2.2 Source.....	8
2.3 Élevage d' <i>Oppia nitens</i>	9
2.3.1 Généralités.....	9
2.3.2 Installations et appareils	10
2.3.3 Éclairage.....	13
2.3.4 Température.....	13
2.3.5 Substrat d'élevage	13
2.3.6 Alimentation	14
2.3.7 Manipulation des organismes et entretien des élevages	15
2.3.8 Élevages synchrones destinés aux essais.....	16
2.3.9 Indices de santé et de performance.....	17

Section 3

Système d'essai	18
3.1 Installations et appareils	18
3.2 Essais initiaux et essais définitifs	19
3.2.1 Essais initiaux.....	19
3.2.2 Essais définitifs.....	19
3.3 Sol témoin négatif.....	20
3.3.1 Sol naturel.....	20
3.3.2 Sol artificiel	21
3.4 Sol témoin positif	23
3.5 Sol de référence	23
3.6 Sol d'essai.....	24

Section 4

Modes opératoires universels	25
4.1 Préparation des sols d'essai	30
4.2 Mise en route de l'essai	32
4.3 Conditions d'essai	33

4.4	Critères de validité des essais	33
4.5	Alimentation	33
4.6	Observations et mesures	33
4.7	Fin de l'essai	35
4.8	Paramètres et calculs	37
4.8.1	CIp	39
4.8.1.1	Analyse de régression	40
4.8.1.2	Interpolation linéaire à l'aide du programme ICPIN.....	43
4.9	Essais avec un toxique de référence	44

Section 5

Modes opératoires particuliers pour la mesure de la toxicité d'un sol ou d'une matière particulière semblable prélevés sur le terrain.....

		50
5.1	Prélèvements d'échantillons	50
5.2	Étiquetage, transport, entreposage et analyse des échantillons	55
5.3	Préparation des échantillons en vue des essais	57
5.4	Éléments particuliers à prendre en considération dans la collecte, la manipulation et la préparation de sol de diverses écozones du Canada	63
5.5	Observations et mesures	64
5.6	Paramètres et calculs	64
5.6.1	Variantes du plan d'étude et des analyses	65
5.6.2	Analyse de puissance.....	66

Section 6

Modes opératoires particuliers pour la mesure de la toxicité d'un sol enrichi avec une substance chimique

		68
6.1	Propriétés, étiquetage et entreposage des échantillons	68
6.2	Préparation des mélanges d'essai	69
6.3	Observations et mesures	74
6.4	Paramètres et calculs	74

Section 7

Rapports à produire

		76
7.1	Exigences minimales pour le rapport d'essai	76
7.1.1	Substance ou matière d'essai	76
7.1.2	Organismes expérimentaux	76
7.1.3	Installations d'essai	77
7.1.4	Méthode d'essai.....	77
7.1.5	Conditions et modes opératoires.....	77
7.1.6	Résultats	77
7.2	Exigences supplémentaires.....	78
7.2.1	Substance ou matière d'essai.....	78
7.2.2	Organismes expérimentaux	78
7.2.3	Installations d'essai et appareillage	79
7.2.4	Sol témoin négatif ou sol de référence	79
7.2.5	Méthode d'essai.....	79
7.2.6	Conditions et modes opératoires.....	79
7.2.7	Résultats	80

Références	81
-------------------------	-----------

<i>Annexe A</i>	
Méthodes d’essai biologique et documents d’orientation publiés par l’Unité de l’élaboration et de l’application des méthodes d’Environnement et Changement climatique Canada.....	91
<i>Annexe B</i>	
Environnement et Changement climatique Canada, laboratoires d’essai environnemental régionaux	94
<i>Annexe C</i>	
Membres du Groupe intergouvernemental sur les essais écotoxicologiques (en juin 2019)	95
<i>Annexe D</i>	
Sols témoins négatifs artificiels et naturels utilisés pour la mise au point de la méthode et l’établissement des critères de validité des essais	98
<i>Annexe E</i>	
Photographies illustratives d’<i>Oppia nitens</i>	107
<i>Annexe F</i>	
Séries logarithmiques de concentrations convenant aux essais toxicologiques.....	108
<i>Annexe G</i>	
Méthodes d’extraction à la chaleur.....	109
<i>Annexe H</i>	
Détermination d’une concentration témoin positive et définition des limites de contrôle – Exemple fonctionnel.....	114

Liste des tableaux

- 1 Liste de contrôle des conditions et modes opératoires recommandés et exigés pour l'élevage d'*Oppia nitens* destinés à servir d'organismes expérimentaux dans des essais de toxicité des sols11
- 2 Liste de contrôle des conditions et modes opératoires recommandés et exigés pour les essais visant à mesurer les effets de l'exposition à un sol contaminé sur la reproduction d'*Oppia nitens*26

Liste des figures

- 1 Points à considérer dans la préparation et l'exécution d'essais de toxicité des sols avec des acariens et divers types de substances ou matières d'essai2
- 2 Logigramme du processus général d'analyse statistique et de sélection du modèle le plus approprié pour des données toxicologiques quantitatives42

Liste des sigles, acronymes, abréviations, symboles et formules chimiques

Al	aluminium	N	azote
ANOVA	analyse de la variance	<i>n</i>	nombre
AQ/CQ	assurance et contrôle de la qualité	Na	sodium
°C	degré Celsius	nm	nanomètre
C	carbone	OQD	objectifs de qualité des données
Ca	calcium	p	poids
CaCl ₂	chlorure de calcium	<i>P</i>	probabilité
CaCO ₃	carbonate de calcium	PIHF	plasma induit par haute fréquence
CCME	Conseil canadien des ministres de l'environnement	PM	poids moléculaire
CEC	capacité d'échange cationique	®	marque de commerce déposée
CIp	concentration inhibitrice correspondant à un pourcentage d'effet (précisé, p. ex., CI50)	s	seconde
Cl	chlore	S	soufre
CL50	concentration létale médiane	SEA	spectrophotométrie d'émission atomique
CLHP	chromatographie liquide à haute performance	sp.	espèce
cm	centimètre(s)	spp.	espèces
CMEO	concentration minimale avec effet observé	β	beta, indique une erreur de type II
COT	carbone organique total	v:p	ratio volume/poids
CRE	capacité de rétention d'eau	v:v	ratio volume/volume
CSEO	concentration sans effet observé	α	alpha, indique une erreur de type I
CV	coefficient de variation	μg	microgramme
DEL	diode électroluminescente	μm	micromètre
ET	écart type	μmho	micromho
g	gramme(s)	μmol	micromole
h	heure(s)	>	plus de
H ₂ O	eau	<	moins de
H ₃ BO ₃	acide borique	\geq	plus de ou égal à
HAP	hydrocarbures aromatiques polycycliques	\leq	moins de ou égal à
j	jour(s)	%	pourcentage ou pour cent
K	potassium	=	est égal à
kg	kilogramme	+	plus
L	litre	-	moins
m	mètre(s)	\pm	plus ou moins
<i>M</i>	mole (concentration)	\times	multiplié par
_{MC}	marque de commerce	\div	divisé par
Mg	magnésium	/	par; peut aussi signifier « ou » (p. ex., survie/reproduction)
mg	milligramme(s)	\approx	approximativement égal à
mL	millilitre(s)	\sim	environ
mm	millimètre(s)		
MO	matière organique		
mS	millisiemens		

Terminologie

Nota : Toutes les définitions ci-dessous s'inscrivent dans le contexte des procédures décrites dans le présent document; 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, etc.) expriment une recommandation ou la nécessité de respecter dans la mesure du possible la condition ou la méthode.

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

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

Termes techniques

Acclimatation – Adaptation physiologique à une valeur précise d'un ou de plusieurs facteurs environnementaux, comme la température. Ce terme désigne habituellement l'adaptation à des conditions de laboratoire contrôlées.

Adulte – Acarien ayant atteint la maturité sexuelle. (V. aussi *juvénile*.)

Assainissement – Gestion d'un *lieu contaminé* dans le but de prévenir, de réduire au minimum ou d'atténuer ses incidences sur la santé humaine ou l'environnement. L'*assainissement* peut comprendre à la fois des interventions directes (p. ex., élimination, destruction et confinement de *substances toxiques*) et des mesures institutionnelles (p. ex., zonage ou décrets).

Assurance de la qualité – Programme permettant à un laboratoire de veiller à ce que les résultats de ses travaux scientifiques et techniques soient précis et exacts. Un tel programme englobe le choix des modes opératoires pertinents, la collecte d'échantillons, l'établissement de limites, l'évaluation des données, le *contrôle de la qualité* ainsi que les compétences et la formation du personnel.

Conductivité – Expression numérique de la capacité d'une solution de conduire l'électricité. Cette capacité dépend des *concentrations* des ions en solution, de leur valence et de leur mobilité, de même que de la température de la solution. Dans le cadre de cette méthode, la *conductivité* est mesurée à 25 °C et exprimée en micromhos par centimètre ($\mu\text{mhos/cm}$) ou en millisiemens par mètre (mS/m); 1 mS/m = 10 $\mu\text{mhos/cm}$.

Conformité – Respect des règlements ou des exigences gouvernementales en matière de permis.

Contrôle de la qualité – Mesures précises prévues dans le programme d'*assurance de la qualité*, notamment la normalisation, l'étalonnage, la répétition, les échantillons *témoins* et les estimations statistiques des limites des données.

Couches LFH – Regroupement des horizons pédologiques L, F et H. Ces couches organiques, qui reposent sur un *sol* minéral, résultent habituellement de l'accumulation de feuilles, de brindilles et de *matériaux* ligneux. La plupart du temps, on peut identifier les composants de l'horizon L (litière feuillue), qui forme la première couche. La couche suivante, l'horizon F, se distingue de la première du fait que ses *composants* d'origine sont difficiles à repérer parce qu'ils sont en décomposition. La dernière, l'horizon H, est constituée de *matériaux*

organiques décomposés, impossibles à repérer. On peut y trouver des particules minérales provenant du *sol* minéral sous-jacent.

Descendants – Jeunes (descendants immédiats) produits par des acariens ayant atteint la maturité sexuelle (*adultes*).

Diode électroluminescente (DEL) – Type de source lumineuse. Il s'agit d'une diode semi-conductrice qui s'allume lorsqu'une tension est appliquée. Les DEL diffèrent des sources lumineuses fluorescentes et incandescentes par le mécanisme utilisé pour générer la lumière.

Élevage – Stock d'organismes élevés en laboratoire dans des conditions définies et contrôlées pendant une génération ou plus afin d'obtenir des sujets d'expérience synchrones en bonne santé. Ce terme désigne également l'activité visant à produire de tels sujets à partir d'une génération ou plus dans des conditions définies et contrôlées.

Évaluation du risque écologique – Processus comportant l'analyse du *risque* et l'évaluation des *effets* indésirables des milieux naturels *contaminés* (p. ex., air, *sol*, eau) sur les organismes non humains, en tenant compte de la nature et de l'étendue de ces *effets*, de même que de la probabilité de manifestation de ceux-ci (ISO, 2005).

Évaluation du risque – V. *évaluation du risque écologique*.

Exuviation – Processus de mue ou de perte d'une couche cuticulaire externe (c.-à-d. l'exosquelette). Chez les acariens oribates, la perte de l'exosquelette prend fin au dernier stade de développement (c.-à-d. à l'âge *adulte*), lorsque l'exosquelette de la forme *adulte* se durcit et se sclérose. Aux fins de la présente méthode, l'*exuviation* désigne l'émergence d'un acarien *adulte* à partir du stade de tritonymphe, marquée par la perte de son exosquelette et se distinguant par la forme et la taille de son corps, ainsi que par la couleur de son tégument (v. annexe E).

Hormèse – Dans un *essai toxicologique*, stimulation observée de la performance (p. ex., sur le plan de la reproduction) d'organismes expérimentaux exposés à de faibles *concentrations*, par comparaison avec les organismes *témoins*.

Juvenile – Acarien n'ayant pas atteint la maturité sexuelle (c.-à-d. larves, protonymphes, deutonymphes et tritonymphes) (v. aussi *adulte*).

Lux – Unité d'éclairement mesurant l'intensité lumineuse par mètre carré. Un (1) *lux* = 0,0929 pied-bougie et 1 pied-bougie = 10,76 *lux*. Pour convertir des *lux* en flux quantique [$\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$], il faut connaître la qualité spectrale de la source lumineuse. Les conditions de luminosité ou l'irradiance sont exprimées sous forme de flux quantique (débit de fluence photonique) dans la gamme de longueurs d'onde photosynthétiquement efficaces de ~400-700 nm. Le lien entre flux quantique et *lux* (ou pied-bougie) varie énormément en fonction de la source lumineuse, du photomètre utilisé, de la disposition géométrique et des réflexions possibles (v. ASTM, 2014). Les conversions approximatives entre flux quantique et *lux* sont les suivantes :

- ampoules fluorescentes blanc froid : $1 \text{ lux} \approx 0,014 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$;
- ampoules fluorescentes en spectre continu (p. ex., Vita-Lite® de Duro-Test®) : $1 \text{ lux} \approx 0,016 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$;
- ampoules incandescentes : $1 \text{ lux} \approx 0,019 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ (Deitzer, 1994; Sager et McFarlane, 1997).

Méthode de référence – *Protocole* conçu spécifiquement pour la mise en œuvre d'un *essai de toxicité*, c'est-à-dire une méthode d'essai biologique comportant un ensemble explicite de modes opératoires et de conditions d'essai exposé avec précision dans un document écrit et dont ont convenu formellement les parties en cause. Contrairement à d'autres méthodes d'essai biologique polyvalentes (génériques) publiées par Environnement

et Changement climatique Canada, les *méthodes de référence* sont souvent réservées aux essais associés à des règlements particuliers.

pH – Logarithme négatif de l'activité des ions hydrogène exprimée en équivalents-grammes par litre. La valeur du *pH* indique le degré ou l'intensité des réactions tant acides qu'alcalines sur une échelle de 0 à 14, le nombre 7 représentant la neutralité, les nombres inférieurs à 7, des réactions de plus en plus acides, et les nombres supérieurs à 7, des réactions de plus en plus alcalines.

Photopériode – Durée de l'éclairement sur 24 h.

Pollution – Ajout d'une *substance*, d'une *matière* ou d'une forme d'énergie (comme la chaleur) à un composant de l'environnement, en une quantité suffisante pour provoquer un changement discernable et nuisible chez certains organismes ou dans une utilisation anthropique de l'environnement. Il existe des définitions officielles (nationales et internationales) de la *pollution*, qu'il faudrait respecter selon le contexte.

Potentiel d'oxydoréduction – Mesure (exprimée en volts) d'affinité d'une *substance* pour les électrons par rapport à l'hydrogène.

Prétraitement – Traitement d'un échantillon ou d'un sous-échantillon de *sol* avant d'y exposer les organismes expérimentaux.

Protocole – Document exposant avec précision l'ensemble des marches à suivre pendant un essai et dont ont convenu formellement les parties en cause.

Risque – Probabilité ou vraisemblance de la manifestation d'un *effet* néfaste.

Soies – Poils ou épines fins, habituellement rigides, formant des motifs caractéristiques sur l'exocuticule et servant de récepteurs sensoriels ou à la locomotion.

Stade larvaire – Stade de développement d'un insecte ou d'une autre espèce d'arthropode, entre deux mues.

Surveillance – Vérification périodique (p. ex., quotidienne, hebdomadaire, mensuelle, trimestrielle) de la qualité, ou collecte et communication d'information. Dans le présent document, le terme désigne soit la vérification périodique et la mesure de variables biologiques ou de variables relatives à la qualité du *sol*, soit le prélèvement d'échantillons de *sol* aux fins de la mesure de leur *toxicité*.

Termes relatifs aux substances ou matières d'essai

Capacité d'échange cationique – Quantité totale de cations échangeables que le *sol* peut adsorber. Parfois appelée capacité totale d'échange, pouvoir d'échange de cations et capacité d'adsorption de cations. Elle s'exprime en milliéquivalents par 100 g de *sol* (ou de tout autre *solide* adsorbant, comme l'argile) (AAC, 1998).

Capacité de rétention d'eau – Quantité maximale d'eau qu'un *sol* peut retenir après saturation complète. En règle générale, elle est déterminée par une méthode gravimétrique et exprimée sous forme de pourcentage d'eau (en poids; eau-sol sec) que retient un échantillon de *sol* saturé avec de l'eau.

Carbone organique total – Quantité de carbone organique présente dans le *sol*, à l'exclusion du carbone provenant des résidus de plantes et d'animaux non décomposés, déterminée au moyen d'une analyse par combustion sèche (ISO, 1995). (V. aussi *matière organique*.)

Carotte – Échantillon de *sol* prélevé au moyen d'un carottier.

Concentration – Rapport entre le poids de la *substance* ou *matière* d'essai et le poids du *sol*, souvent exprimé en milligrammes de *substance* ou *matière* d'essai par kilogramme de *sol* sec (mg/kg). La *concentration* pourrait aussi être exprimée sous forme de pourcentage de la *substance* ou *matière* d'essai (p. ex., *sol* de *site contaminé*) par rapport au poids sec du *sol*.

Contaminant – *Substance* ou *matière* présente dans un système naturel ou présente à une *concentration* plus forte qu'à l'accoutumée, le plus souvent en raison, directement ou non, d'activités anthropiques. Ce terme désigne souvent les *substances* ou *matières* atteignant des *concentrations* susceptibles d'avoir des *effets* biologiques néfastes.

Contaminé (sol) – Qui renferme des *substances chimiques* ou des *matières* à des *concentrations* qui présentent une menace connue ou potentielle pour l'environnement ou la santé humaine.

Eau d'essai – Eau utilisée pour préparer les *solutions mères*, pour rincer les organismes expérimentaux ou la verrerie et autres appareils utilisés pour l'élevage des acariens ainsi que pour d'autres manipulations associées à la méthode d'essai biologique (p. ex., pour hydrater les échantillons de *sol d'essai*). L'*eau d'essai* doit être de l'*eau désionisée* ou *distillée*, à défaut d'un meilleur traitement (p. ex., eau de qualité « réactif » produite par un système d'osmose inverse, au carbone ou à cartouches d'échange d'ions). (V. aussi *eau d'hydratation*.)

Eau d'hydratation – Eau utilisée pour hydrater les *sols d'essai* afin d'obtenir une *teneur en humidité* appropriée pour les organismes expérimentaux. L'eau d'hydratation est normalement de l'*eau d'essai*, c'est-à-dire de l'*eau désionisée* ou *distillée*, de l'eau purifiée par osmose inverse ou de l'eau du robinet déchlorée. Selon le plan et le but de l'étude, une eau superficielle ou une eau souterraine provenant du *site* à l'étude peut remplacer l'*eau désionisée* ou *distillée* pour hydrater chaque *sol d'essai* (y compris le *sol témoin négatif*). (V. aussi *eau d'essai*, *eau désionisée* et *eau distillée*.)

Eau désionisée – Eau qu'on a purifiée en la faisant passer dans des colonnes de résine ou un système d'osmose inverse pour en extraire les ions en solution, comme Ca^{++} et Mg^{++} .

Eau distillée – Eau ayant été traitée dans un appareil de distillation en verre borosilicaté ou autre *matériau* pour la débarrasser de ses impuretés.

Échantillon composite – Échantillon de *sol* constitué d'échantillons *ponctuels* ou en *vrac* provenant de ≥ 2 points d'échantillonnage d'un même *site* (Crépin et Johnson, 1993).

Échantillon de sol en vrac – Échantillon *perturbé*, habituellement assez volumineux (> 1 L), constitué de ≥ 2 *fractions individuelles de sol* prélevées dans un lieu d'échantillonnage au moyen d'un échantillonneur. Il s'agit donc d'un *échantillon ponctuel* et non d'un *échantillon composite* (v. *échantillon ponctuel* et *échantillon composite*). Souvent, on prélève des échantillons de *sol en vrac* afin d'obtenir les volumes élevés dont on a besoin pour les essais biologiques.

Échantillon de sol intact – Échantillon prélevé au moyen d'une méthode n'altérant pas la structure du *sol* (ISO, 2005). Synonymes : échantillon non perturbé et échantillon non remanié. (V. aussi *échantillon de sol perturbé*.)

Échantillon de sol perturbé – Échantillon prélevé sans tenter de préserver la structure du *sol* (ISO, 2005). Synonyme : échantillon remanié. (V. aussi *échantillon de sol intact*.)

Échantillon ponctuel – Portion individuelle de *sol* (p. ex., *carotte*) prélevée sur un lieu d'échantillonnage au moyen d'un échantillonneur.

Enrichissement – Ajout d'une quantité connue d'une *substance chimique* ou plus, ou encore d'une autre *substance* ou *matière* d'essai ou plus (p. ex., un échantillon de boues d'épuration ou de boues de forage), à un *sol* naturel ou *artificiel*. La ou les *substances* ou *matières* sont habituellement ajoutées à un *sol témoin négatif*, un *sol de référence* ou à un autre *sol non contaminé*, mais elles peuvent l'être également à un *sol contaminé* ou susceptible d'être *contaminé*. Après l'ajout (« *enrichissement* »), on mélange soigneusement le *sol*. Lorsque la *matière* d'essai ajoutée est un *sol de site*, les documents d'Environnement et Changement climatique Canada ne qualifient habituellement pas cette manipulation d'*enrichissement*, mais plutôt de « dilution », d'« amendement » ou simplement d'« ajout ». (V. aussi *sol enrichi avec une substance chimique* et *sol enrichi*.)

Essai définitif (de toxicité d'un sol) – Se dit d'un essai décisif par opposition à un *essai préliminaire*. (V. aussi *essai préliminaire*.)

Essai préliminaire – *Essai de toxicité* d'un sol effectué pour obtenir une indication initiale de la *toxicité* de la *matière* d'essai dans des conditions définies et pour choisir la plage de *concentrations* qui sera utilisée dans un *essai définitif* à concentrations multiples. [V. aussi *essai définitif* (de toxicité d'un sol).]

Essai toxicologique de référence – Essai à concentrations multiples effectué à l'aide d'un *toxique de référence* parallèlement à un *essai de toxicité* d'un sol afin d'estimer la sensibilité des organismes ainsi que la *précision* et la fiabilité des résultats obtenus par le laboratoire pour cette *substance chimique* au moment de l'évaluation de la *substance* ou *matière* d'essai. Toute déviation par rapport à une plage normale préétablie indique que la sensibilité des organismes expérimentaux ainsi que le rendement et la *précision* de l'essai sont suspects, et la cause de cette déviation devrait être examinée. L'*essai toxicologique de référence* avec des acariens consiste en un essai sur un *sol enrichi* avec un étalon *chimique*.

Fertilité (d'un sol) – Capacité d'un *sol* de fournir des nutriments dans les quantités, formes et proportions requises pour permettre une croissance optimale des végétaux. La *fertilité* d'un sol est mesurée directement par dosage des ions et des composés importants pour la nutrition des végétaux. Les composantes fondamentales de la *fertilité* d'un sol sont constituées des éléments nutritifs essentiels (macro-éléments tels que C, H, O, N, P, K, Ca, Mg et S; micro-éléments tels que Fe, Mn, Mo, B, Cu, Zn et Cl). La *fertilité* d'un *sol* est mesurée indirectement par sa productivité (c.-à-d. sa capacité de produire des végétaux qui fournissent les aliments et les fibres essentiels à la vie; Hausenbuiller, 1985).

Horizon (pédologique ou de sol) – Couche de *matériau* d'un *sol* minéral ou organique, approximativement parallèle à la surface de la terre et dont les caractéristiques sont modifiées par les processus de formation du *sol*. Un horizon pédologique ou de sol se différencie des *horizons* adjacents par des propriétés comme la couleur, la structure, la *texture* et la consistance ainsi que par sa composition chimique, biologique et minéralogique.

Horizon – V. *horizon de sol*.

Lieu d'échantillonnage – Endroit précis d'un *site* où s'effectue le prélèvement d'un ou de plus d'un échantillon de sol aux fins des *essais toxicologiques* et des analyses physicochimiques connexes. Synonyme : station d'échantillonnage.

Lot – Quantité totale d'un *sol d'essai* donné (ou *concentration* précise de ce dernier) préparée pour chaque *traitement (concentration)* faisant partie d'un essai. Désigne tout *sol d'essai* hydraté prêt à être subdivisé aux fins des *répétitions*. Un *lot* peut également faire référence à un seul groupe d'*O. nitens* reçu d'un fournisseur ou d'une source extérieure au laboratoire à un moment précis.

Matière organique – Dans le *sol*, consiste principalement en résidus végétaux et animaux à différents stades de

décomposition, y compris l'humus. L'accumulation de matière organique dans le *sol* est le rapport entre le retour ou l'ajout de résidus végétaux et animaux et leur perte subséquente due à leur décomposition par les micro-organismes présents dans le sol. Pour de nombreux types de *sol*, l'équation suivante (AESAs, 2001) permet d'estimer la *teneur totale en matière organique* (MO) à partir des mesures du carbone organique total (COT) : % MO = % COT × 1,78; toutefois, comme la relation entre le COT et la matière organique varie légèrement d'un *sol* à un autre, la teneur en COT devrait être déterminée également au moyen d'analyses de laboratoire. (V. aussi *carbone organique total*.)

Matière – Substance (il peut y en avoir plus d'une) dont est faite une chose. Ses caractéristiques seraient plus ou moins uniformes. Un *sol*, un sédiment ou une eau de surface sont des *matières*. Habituellement, une *matière* renferme un nombre plus ou moins grand de *substances*.

Objectifs de qualité des données – Critères prédéfinis applicables aux données produites ou utilisées dans une étude afin de s'assurer que ces données seront d'une qualité acceptable en regard des besoins qu'elles sont censées combler.

Produit – Préparation commerciale d'une ou de plusieurs *substances chimiques*. (V. aussi *substance chimique*.)

Site – Terrain délimité utilisé ou envisagé comme zone d'étude, habituellement parce qu'il est considéré comme étant *contaminé* ou susceptible d'être *contaminé* par des activités anthropiques. Un *site de référence* est un *site* où l'influence d'une ou de plusieurs sources de contamination est inexistante, mais il se trouve dans les environs du ou des *sites* de prélèvement de l'échantillon ou des échantillons du *sol d'essai*.

Sol artificiel – *Sol* préparé en laboratoire pour simuler un *sol* naturel, avec des proportions précises de constituants naturels de sable, d'argile et de tourbe. Un *sol artificiel* peut être utilisé comme *sol témoin négatif* et comme diluant pour préparer des *concentrations* multiples d'un ou de plusieurs *sols de site* ou *sols enrichis avec une substance chimique*.

Sol d'essai – Échantillon de *sol* (p. ex., *sol de site*) prélevé sur le terrain qui est *contaminé* ou potentiellement contaminé, ou échantillon de *sol enrichi avec une substance chimique* dont on évalue la *toxicité* pour les acariens. Les *échantillons de sol* de la région boréale et de la taïga sont prélevés dans des *horizons pédologiques* distincts. Parfois, le terme désigne tout échantillon en phase solide ou tout mélange d'un tel échantillon (p. ex., *sol témoin négatif*, *sol témoin positif*, *sol de référence*, boues d'épuration, boues de forage) utilisé dans un *essai de toxicité* d'un *sol*.

Sol de référence – En règle générale, *sol non contaminé* prélevé sur le terrain ou *sol artificiel* (préparé en laboratoire) qui sera utilisé dans un *essai toxicologique* particulier sur un *sol témoin négatif* et un ou des échantillons de *sol d'essai*. Le *sol de référence* utilisé dans un *essai* présente souvent des propriétés physicochimiques (p. ex., *texture*, teneur en *matière organique*, teneur en *carbone organique total*, *pH*, *conductivité*) très comparables à celles du *sol d'essai*, sauf qu'il n'est pas touché par la source de contamination à l'étude. Aux fins des *essais* sur un *sol de site*, on recueille souvent un ou des échantillons de *sol de référence* dans les environs du lieu de prélèvement des échantillons de *sol d'essai*, de sorte que ce *sol de référence* peut avoir subi les effets d'autres sources de contamination que la ou les sources étudiées. Le *sol de référence* permet de décrire les *effets* de matrice, dans l'*essai*, et peut aussi servir de diluant dans la préparation des *concentrations* de *sol d'essai*. Dans les *essais* sur un *sol enrichi avec une substance chimique*, on peut choisir un ou des échantillons de *sol artificiel* possédant des caractéristiques physicochimiques différentes pour étudier l'influence de certaines propriétés du *sol* (p. ex., *texture*, teneur en *matière organique*) sur la *toxicité* d'une *substance chimique* mélangée à chacun de ces types de *sol*. (V. aussi *sol témoin négatif*, *sol de site*, *sol d'essai*, *sol non contaminé*, *sol artificiel* et *sol enrichi avec une substance chimique*.)

Sol de site – Échantillon de *sol* prélevé sur le terrain, à un endroit présumé *contaminé* par une ou des *substances*

chimiques, qu'on se propose d'utiliser dans les *essais toxicologiques* avec des acariens. Dans certains cas, « sol de site » désigne un *sol de référence* ou un *sol témoin négatif* d'un *site* donné.

Sol enrichi avec une substance chimique – Sol naturel ou *sol artificiel* (habituellement un *sol témoin négatif*, un *sol de référence* ou un autre *sol non contaminé*) auquel on a ajouté une ou des *substances chimiques* et qu'on a mélangé soigneusement pour répartir uniformément la ou les *substances* à une *concentration* particulière afin de constituer un *lot* qui sera utilisé dans un *essai de toxicité* d'un *sol*. (V. aussi *sol enrichi*.)

Sol enrichi – Sol naturel ou *sol artificiel* (habituellement un *sol témoin négatif*, un *sol de référence* ou un autre *sol non contaminé*) auquel on a ajouté en laboratoire une ou des *substances chimiques*, ou encore une ou des *substances* ou *matières* d'essai (p. ex., un échantillon de boues d'épuration ou de boues de forage), qu'on a mélangé soigneusement pour répartir uniformément la ou les *substances* ou *matières* dans le *sol* à une *concentration* particulière afin de constituer un *lot* qui sera utilisé dans un *essai de toxicité* d'un *sol*. (V. aussi *sol enrichi avec une substance chimique* et *enrichissement*.)

Sol non contaminé – Se dit d'un *sol* exempt de toute *substance* ou *matière* à une *concentration* provoquant des *effets toxiques* observables chez les organismes expérimentaux.

Sol témoin – V. *sol témoin négatif*.

Sol témoin négatif – *Sol* qui ne contient aucun *contaminant* à des *concentrations* susceptibles d'avoir une incidence sur la survie ou la reproduction des organismes expérimentaux. Un *sol témoin négatif* peut être soit un *sol* naturel provenant d'un *site* non contaminé, soit un *sol artificiel* (préparé en laboratoire). Il ne doit contenir aucune *substance* ou *matière* d'essai ajoutée et il doit permettre un taux de survie et une reproduction acceptables des organismes pendant l'essai. Un *sol témoin négatif* sert de base pour l'interprétation des données des *essais toxicologiques* sur un ou des *sols d'essai* et renseigne sur l'état de santé (ou la qualité) des organismes expérimentaux provenant d'un *élevage*.

Sol témoin positif – *Sol* qui contient un ou des *contaminants* à des *concentrations* ayant un effet néfaste sur la reproduction des organismes expérimentaux dans la méthode d'essai décrite dans le présent document. On peut utiliser un *sol témoin positif* comme *toxique de référence* pour estimer la sensibilité des organismes expérimentaux lorsqu'on évalue la *substance* ou *matière* d'essai, de même que pour déterminer la *précision* des résultats obtenus par le laboratoire en regard de ce *toxique de référence*.

Sol – *Matière* entière et intacte représentative du milieu terrestre à l'étude, manipulée le moins possible après son prélèvement ou sa préparation. Dans la nature, le sol est formé par l'altération physique, chimique et biologique (météorisation) des roches et par la décomposition et le recyclage des nutriments de la *matière organique* engendrée par les végétaux et les animaux. Les activités biologiques [p. ex., des micro-organismes, des invertébrés (dont les acariens) et des plantes] et les facteurs abiotiques qui s'y déroulent, de même que les activités anthropiques, influent sur ses caractéristiques physicochimiques.

Solution mère – Solution concentrée de la ou des *substances* d'essai. On ajoute et on mélange soigneusement une quantité mesurée de cette solution à un échantillon de sol naturel ou de *sol artificiel* pour préparer un *lot* de *sol enrichi avec une substance chimique*. Pour obtenir la concentration requise de la *solution mère*, on ajoute des quantités ou volumes mesurés de la ou des *substances chimiques* d'essai à de l'*eau d'essai* (*eau désionisée*, *eau distillée* ou l'équivalent), avec ou sans ajout d'un solvant organique.

Substance chimique – Dans le présent rapport, tout élément, composé, préparation, produit chimique ou mélange d'une *substance* qui pourrait être associé à un *sol* ou à l'eau, ou qui pourrait pénétrer dans l'environnement par suite d'un déversement, d'un épandage ou d'un rejet.

Substance – *Matière* particulière ayant des propriétés plus ou moins uniformes. Le terme a un sens plus restreint

que *matière* et pourrait s'employer pour désigner, par exemple, une *substance chimique*, un élément naturel ou un *produit manufacturé*.

Témoin négatif – V. *témoin*.

Témoin sol-solvant – Échantillon de *sol* (habituellement *artificiel*) inclus dans un essai sur un *sol enrichi avec une substance chimique* dans lequel il est nécessaire d'introduire un solvant organique pour solubiliser la *substance chimique* d'essai avant de la mélanger avec une quantité mesurée de *sol témoin négatif*. Le volume de solvant utilisé dans la préparation du *témoin sol-solvant* doit contenir la même *concentration* d'agent solubilisant que l'échantillon de *sol enrichi* contenant la plus forte *concentration* de la ou des *substances chimiques* d'essai. Cette concentration de solvant ne devrait pas avoir d'effet néfaste sur les acariens pendant l'essai. Tout essai dans lequel on utilise un solvant organique pour préparer une ou des *concentrations* de *sol enrichi avec une substance chimique* doit inclure un *témoin sol-solvant*. (V. aussi *sol artificiel*, *sol témoin négatif* et *sol enrichi avec une substance chimique*.)

Témoin – Dans une enquête ou une étude, variante expérimentale reproduisant toutes les conditions et tous les facteurs qui pourraient influencer sur les résultats, sauf la condition particulière étudiée. Dans un *essai toxicologique*, le *témoin* doit reproduire toutes les conditions du ou des *traitements* d'exposition, mais il ne doit pas renfermer de *substance* ou *matière* d'essai *contaminée*. Le *témoin* sert à vérifier l'absence de *toxicité* mesurable attribuable aux conditions de base de l'essai (p. ex., température, santé des organismes expérimentaux, *effets* de la manipulation de ces derniers). Le terme *témoin* est synonyme de *témoin négatif*, à moins d'indication contraire.

Teneur en humidité – Pourcentage d'eau dans un échantillon de *sol d'essai*, par rapport au poids sec ou humide de celui-ci. Pour déterminer ce pourcentage, on mesure les poids sec et humide d'un sous-échantillon de *sol*. On calcule ensuite la *teneur en humidité* du sol par rapport à son poids sec en divisant le poids de l'eau du sous-échantillon (poids humide moins poids sec) par le poids du *sol* sec et en multipliant le résultat par 100. On doit utiliser la même unité de poids (p. ex., g ou mg) dans tous les cas.

Texture – Caractéristique définie en fonction du pourcentage pondéral de sable, de limon et d'argile dans la fraction minérale du *sol*. La *texture* renseigne sur les caractéristiques et le comportement généraux des *substances* présentes dans le *sol*, plus particulièrement lorsqu'on connaît la structure du *sol* et sa teneur en *matière organique*. La présente méthode se fonde sur les descriptions des *textures* de sol du Système canadien de classification des sols (AAC, 1998) et non du système de classification unifié des sols, de la United States Soil Conservation Service Classification ou de tout autre système de classification utilisé dans la science des sols, en ingénierie ou en géologie. La *texture* d'un sol est déterminée en laboratoire par l'analyse de la granulométrie en deux étapes : les particules de sable (fragments grossiers) sont tout d'abord séparées des particules de limon et d'argile par tamisage, puis les particules de limon et d'argile sont séparées par sédimentation dans l'eau. Les systèmes de classification texturale regroupent habituellement les *sols* selon des plages de quantités relatives de sable, de limon et d'argile. Il existe trois grandes classes de texture :

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

On peut aller plus loin dans la distinction des sols en fonction de la *texture* (p. ex., argile sableuse, loam limoneux, loam) en utilisant le système canadien de classification fondé sur les proportions relatives de sable, de limon et d'argile dans le *sol* (AAC, 1998).

Toxique de référence – Étalon *chimique* permettant d'établir la fiabilité des données sur la *toxicité* d'une *substance* ou *matière* d'essai. Dans la plupart des cas, on procède à un *essai de toxicité* à *concentrations*

multiples avec un *toxique de référence* ou une *concentration* témoin positive préparée à l'aide d'un *toxique de référence* afin d'estimer la sensibilité des organismes ainsi que la *précision* et la *fiabilité* des résultats obtenus en regard de cette *substance* au moment où on évalue la *substance* ou *matière* d'essai.

Termes relatifs aux statistiques et à la toxicologie

A priori – Se dit de ce qui est indépendant de l'expérience. Dans le contexte des plans d'expérience et de la statistique, un essai planifié avant la collecte de données constitue un essai *a priori*. Les objectifs et le plan d'expérience influeraient sur les décisions quant au choix de l'essai *a priori* à exécuter.

Aigu – Qui se manifeste à l'intérieur d'une période d'exposition relativement courte (secondes, minutes, heures, quelques jours) par rapport à la durée de vie de l'organisme expérimental.

Batterie d'essais – Combinaison de plusieurs *essais toxicologiques*, normalement avec différentes espèces d'organismes (p. ex., des collemboles, des plantes ou des vers de terre), comportant différents *paramètres* biologiques (p. ex., effet *léta*l et divers *effets sublétaux*) et différentes durées d'exposition (p. ex., *aiguë* et *chronique*).

Carte de contrôle – Diagramme servant à suivre l'évolution des *effets mesurés* d'un *toxique de référence*. La date ou le numéro de l'essai se trouve sur l'axe horizontal. Pour les essais à concentrations multiples, on porte, sur l'axe logarithmique vertical, la concentration à laquelle l'effet est observé, tandis que pour les sols témoins positifs, le pourcentage *d'effet* par rapport au *témoin* est représenté sur l'échelle arithmétique verticale.

CIp ou concentration inhibitrice correspondant à un pourcentage d'effet (précisé) – Concentration estimative ponctuelle d'une *substance* ou *matière* d'essai qui inhibe, selon le pourcentage précisé (*p*), un paramètre biologique *quantitatif* (continu), comme le nombre de *descendants* par individu à la fin de l'essai, par rapport au *groupe témoin* (p. ex., CI25 ou CI50).

CL50 ou concentration *léta*le médiane – *Concentration* (exprimée en pourcentage ou en milligrammes par kilogramme, p. ex., % ou mg/kg) d'une ou de plusieurs *substances* ou *matières* dans le *sol*, qui est censée être *léta*le pour 50 % des organismes expérimentaux. La *CL50* et ses limites de confiance à 95 % sont normalement dérivées de l'analyse statistique du pourcentage des mortalités survenues à chacune des cinq *concentrations* expérimentales ou plus, après une période d'exposition donnée. La durée de l'exposition doit être précisée (p. ex., *CL50* 28 jours). Selon les objectifs de l'étude, une concentration *léta*le autre qu'une *CL50* (p. ex., *CL₂₅*) pourrait être calculée en remplacement ou en plus de la *CL50*.

CMEO ou *concentration minimale avec effet observé*. *Concentration* la plus basse d'une *substance* ou *matière* d'essai causant, chez les organismes qui y sont exposés, un *effet* statistiquement significatif par rapport au *groupe témoin*.

Coefficient de variation – Écart type (ET) d'un ensemble de données divisé par la moyenne de l'ensemble de données, exprimé sous forme de pourcentage. Le coefficient de variation (CV) est calculé à l'aide de la formule suivante : $CV (\%) = 100 \times (ET \div \text{moyenne})$.

CSEO ou *concentration sans effet observé*. *Concentration* la plus élevée de la *substance* ou *matière* d'essai ne causant, chez les organismes qui y sont exposés, aucun *effet* statistiquement significatif par rapport au *groupe témoin*.

Écotoxicologie – Subdivision de la *toxicologie* ayant la même définition générale; toutefois, elle s'intéresse avant tout aux écosystèmes, aux communautés naturelles et aux espèces sauvages, sans exclure les humains des écosystèmes.

Effet subléta – Effet néfaste sur un organisme résultant de l'exposition à une *concentration* ou à un niveau de contamination inférieur à celui qui cause directement la mort pendant la période d'essai.

Effet – En *toxicologie*, signifie un changement biologique mesurable. Le changement pourrait être structurel, physiologique, comportemental, etc. Dans un *essai toxicologique*, le changement biologique devrait être évalué par rapport à des mesures effectuées sur des organismes dans des conditions *témoins*. L'analyse statistique tient généralement compte des degrés d'*effet* qui dépassent les mesures de *contrôle* et qui devraient découler de l'exposition aux composants *toxiques* de la *matière* testée.

En conditions statiques – Se dit d'un *essai toxicologique* au cours duquel le *sol d'essai* (ou la *substance chimique* qu'il contient) n'est pas renouvelé ou remplacé. Synonyme : sans renouvellement.

Erreur de type I – Se produit lorsqu'un expérimentateur rejette une hypothèse nulle qui est vraie. Elle est couramment désignée par α (*alpha*). En d'autres termes, l'expérimentateur conclut qu'il y a une différence importante, alors qu'il n'y en a pas.

Erreur de type II – Se produit lorsqu'un expérimentateur ne rejette pas une hypothèse nulle lorsque cette dernière est fautive (il conclut qu'il n'y a pas de différence importante, alors qu'il y a une). Elle est couramment désignée par β (*beta*).

Essai toxicologique (ou essai de toxicité) – Essai permettant de déterminer l'*effet* ou les *effets* d'une *substance* ou *matière* par suite de l'exposition d'un groupe d'organismes choisis d'une espèce particulière (p. ex., *Oppia nitens*), dans des conditions définies. Au cours d'un *essai toxicologique* sur un ou des échantillons de *sol d'essai*, on mesure habituellement la proportion d'organismes touchés (*effet quantique*) ou le degré de l'*effet* observé (*effet quantitatif* ou gradué), après exposition des organismes expérimentaux à un échantillon entier (p. ex., *sol de site* non dilué) ou dilué à une *concentration* donnée.

Hétéroscédasticité – Propriété des données dont le diagramme de dispersion se caractérise par une hétérogénéité des *résidus* (v. EC, 2005b). Ce terme s'applique lorsque la variance des *résidus* est passablement différente de celle des variables indépendantes (c.-à-d. les *concentrations* d'essai ou de *traitement*). Lorsqu'on effectue des analyses statistiques et qu'on évalue les *résidus* (p. ex., à l'aide du test de Levene), dans le cas de données dénotant une *hétéroscédasticité* (ou hétérogénéité des *résidus*), on observe une différence importante dans la variance des *résidus* pour toutes les *concentrations* d'essai ou de *traitement*. (V. aussi *homoscédasticité* et *résidus*.)

Homoscédasticité – Propriété des données dont le diagramme de dispersion se caractérise par une homogénéité des *résidus* (v. EC, 2005b). Ce terme s'applique lorsque la variance des *résidus* n'est pratiquement pas différente de celle des variables indépendantes (c.-à-d. les *concentrations* d'essai ou de *traitement*). Lorsqu'on effectue des analyses statistiques et qu'on évalue les *résidus* (p. ex., à l'aide du test de Levene), dans le cas de données dénotant une *homoscédasticité* (ou homogénéité des *résidus*), on n'observe aucune différence importante dans la variance des *résidus* pour toutes les *concentrations* d'essai ou de *traitement*. (V. aussi *hétéroscédasticité* et *résidus*.)

Léta – Qui cause directement la mort. La mort des organismes expérimentaux est définie par l'interruption de tous les signes visibles de mouvement ou d'activité.

Limite de contrôle de 95 % – Limite située à plus ou moins deux écarts types (± 2 ET) de la moyenne découlant d'essais effectués avec un *toxique de référence*. Pour les essais à concentrations multiples, une *limite de contrôle* est calculée logarithmiquement de part et d'autre d'une *moyenne géométrique* historique des *paramètres de mesure* (c.-à-d. CI50), tandis que pour les sols témoins positifs, une *limite de contrôle* est calculée de façon arithmétique de part et d'autre d'une moyenne historique des *paramètres de mesure*

(pourcentage d'*effet* par rapport au *témoin*).

Moyenne géométrique – Moyenne des mesures répétées, calculée logarithmiquement. La moyenne géométrique a pour avantage d'atténuer l'influence qu'exercent les valeurs extrêmes sur la moyenne, comme lorsqu'une moyenne arithmétique est établie. On peut calculer la *moyenne géométrique* comme étant la racine n ème du produit de « n » valeurs et, aussi, comme l'antilogarithme de la moyenne des logarithmes de « n » valeurs.

Normalité (ou *distribution normale*) – Désigne une série de données d'observation décrivant une courbe symétrique en forme de cloche. Cette série met en lien la fréquence d'occurrence et l'ampleur du phénomène mesuré. Dans une *distribution normale*, la plupart des données d'observation se regroupent près de la valeur moyenne et deviennent progressivement moins nombreuses à mesure qu'on se rapproche des extrêmes de la plage de valeurs. La distribution normale joue un rôle central dans la théorie statistique en raison de ses propriétés mathématiques. Elle revêt également une grande importance dans les sciences biologiques du fait que beaucoup de phénomènes biologiques suivent la même courbe. Dans un bon nombre de tests statistiques, on présume que les données suivent une courbe de distribution normale, de sorte qu'il peut être nécessaire de déterminer si c'est le cas d'un ensemble de données en particulier.

Paramètre – Réaction (il peut y en avoir plus d'une) mesurée des organismes expérimentaux (p. ex., adultes morts, nombre de *descendants*) ou valeur (il peut y en avoir plus d'une) caractérisant les résultats d'un essai (*CL50*, *CI25*, etc.).

Précision – Degré de rapprochement des données recueillies au cours de mesures répétées de la même quantité. La précision décrit le degré de certitude entourant un résultat ou le rapprochement des valeurs d'un *paramètre* dérivées d'une analyse statistique, comme la *Clp*.

Puissance – Se dit, sommairement, de la probabilité de conclure correctement qu'une différence existe entre les variables étudiées. Par définition, c'est « la probabilité de rejeter l'hypothèse nulle quand elle est fautive et qu'elle devrait être rejetée ». Il s'agit en fait du contraire d'une *erreur de type II*, lorsqu'un expérimentateur accepte l'hypothèse nulle alors qu'il y a effectivement une différence. La probabilité de faire cette *erreur de type II* est appelée β , et la *puissance* est représentée par la formule $(1 - \beta)$. L'expérimentateur ne peut établir directement et avec précision la *puissance* qu'après avoir effectué un *essai toxicologique*. Il est toutefois possible d'accroître la *puissance* en renforçant l'*essai de toxicité* (plus d'organismes, plus de *répétitions*, etc.). Le calcul de la *puissance* à la fin d'un essai est assez complexe, mais la *puissance* est liée à la *différence significative minimale*, qui peut être estimée par l'intermédiaire de procédures standard dans le cadre de nombreux essais statistiques utilisant des données *quantitatives*.

Quantique – Dans un *essai toxicologique*, qualifie un effet binaire, c'est-à-dire un effet qui se manifeste ou non chez les organismes expérimentaux. Par exemple, la réaction d'un animal exposé à un *sol d'essai contaminé* peut être la mort ou un comportement d'évitement. Un *effet quantique* est généralement exprimé sous forme de nombre ou de pourcentage. (V. aussi *quantitatif*.)

Quantitatif – Dans un *essai toxicologique*, qualifie un *effet* dont la valeur mesurée varie continuellement sur une échelle numérique, par exemple, le nombre de *descendants* produits entre le début et la fin de l'essai. En règle générale, les *effets quantitatifs* sont déterminés et exprimés par des mesures. (V. aussi *quantique*.)

Répétition (traitement, récipient d'essai ou enceinte expérimentale) – Récipient d'essai individuel renfermant un nombre prescrit d'organismes ainsi qu'une *concentration* de la *substance* ou *matière* d'essai identique à celle du ou des *traitements témoins* ou des *traitements de référence*. Comme il s'agit d'une unité expérimentale indépendante, tout transfert d'organisme ou de *matière* d'essai d'un récipient à un autre invaliderait l'analyse statistique fondée sur la répétition (v. 5.1 et 5.6.1 plus loin, et 2.5 dans EC, 2005b).

Réplicat – Échantillon de *sol* prélevé indépendamment dans un même *lieu d'échantillonnage* afin d'obtenir une estimation de l'erreur d'échantillonnage ou d'améliorer la *justesse* de l'estimation. Lorsqu'un seul échantillon de *sol* est prélevé, il est traité comme un *réplicat*. Les échantillons additionnels sont considérés comme des *réplicats* supplémentaires s'ils sont traités de la même façon (peu importe qu'il s'agisse d'*échantillons ponctuels* ou d'*échantillons composites* provenant du même lieu), mais entreposés dans des récipients à échantillon distincts (en d'autres termes, échantillons non regroupés ou, dans le cas d'*échantillons composites*, sans autre regroupement).

Résidu – Dans le contexte de la sous-section 4.8.1.1, écart entre la valeur estimative prévue (selon le modèle) et la valeur réelle observée. On établit cet écart en soustrayant la première valeur de la seconde. (V. aussi *hétéroscédasticité* et *homoscédasticité*.)

Subléta – Se dit d'un effet nuisible se manifestant en deçà de la *concentration* ou du niveau de contamination causant directement la mort d'un organisme au cours d'un essai.

Substance toxique – Synonyme de *toxique* ou *matière toxique*.

Test biologique – Test mesurant la concentration ou l'activité d'une *substance* par la réaction qu'elle provoque chez des organismes vivants. En pharmacologie, un *test biologique* permet d'évaluer l'activité inconnue d'une préparation donnée d'un médicament par rapport à l'activité connue d'une préparation étalon. Dans le domaine de l'environnement, on utilise plutôt les termes *essai de toxicité* ou *essai toxicologique*, qui sont plus précis.

Toxicité aiguë – Manifestation chez l'organisme expérimental d'un *effet* néfaste (*léta* ou *subléta*) discernable après une courte période d'exposition (habituellement quelques jours; aux fins du présent document, dans les 7 ou 14 jours suivant le début de l'exposition à un ou des *sols d'essai*).

Toxicité chronique – *Effets* néfastes discernables qui se manifestent pendant ou après une exposition relativement longue à un ou des *contaminants*. Ces effets sont associés à des modifications sur les plans de la reproduction, de la croissance, du métabolisme, de l'aptitude à la survie ou d'autres variables biologiques à l'étude (p. ex., le comportement).

Toxicité – Capacité d'une *substance* ou *matière* de provoquer un ou des *effets* néfastes chez des organismes vivants. Ces *effets* pourraient résulter d'une exposition à des *concentrations létales* ou *sublétales* de *contaminants* dans le *sol*.

Toxicologie – Science qui étudie la *toxicité* des *substances*, des *matières* ou des conditions d'un milieu. Cette science fait appel à une gamme illimitée de disciplines scientifiques, d'outils de laboratoire/de terrain ou d'études à divers niveaux d'organisation allant de la molécule à une espèce individuelle, à une population ou à une communauté. La *toxicologie* appliquée se propose normalement de définir la marge de sécurité de l'emploi d'une *substance chimique* ou d'autres agents. (V. aussi *écotoxicologie*.)

Toxique – Désigne ou qualifie une *substance* ou une *matière* ayant des *effets* néfastes sur des organismes si elle se trouve en quantité suffisante, au bon endroit. *Toxique* est un adjectif et, dans certains cas, un nom.

Traitement – Désigne un *sol d'essai* précis (p. ex., *sol de site*, *sol de référence* ou *sol témoin négatif*) provenant d'un *lieu d'échantillonnage* donné, ou une *concentration* de *sol enrichi avec une substance chimique* (ou un mélange de *sol d'essai* dilué avec un *sol non contaminé*) préparé en laboratoire. Le *sol d'essai* en question est généralement subdivisé aux fins d'un *essai toxicologique*. (V. aussi *répétition* et *réplicat*.)

Remerciements

Le présent document a été préparé par Ryan Hennessy (Environnement et Changement climatique Canada [ECCC], Ottawa, Ontario) et Jennifer Miller (Miller Environmental Sciences Inc.). Le texte d'introduction a été rédigé et fourni en grande partie par Juliska Princz (ECCC, Ottawa, Ontario). Rick Scroggins et Juliska Princz (ECCC, Ottawa, Ontario) ont fourni une orientation stratégique et des commentaires d'examen détaillés. Nous remercions également Leana Van der Vliet (ECCC, Ottawa, Ontario), qui a formulé des commentaires sur la conception d'essais et les analyses statistiques. Cette méthode s'appuie sur les recherches menées par le laboratoire de toxicologie des sols d'ECCC et n'aurait pas été possible sans les efforts considérables déployés par le personnel du laboratoire : Juliska Princz, Heather Lemieux, Muriel Jatar, Myriam Malette, Ellyn Ritchie, Christopher Fraser et Patrick Boyd. Les travaux effectués au laboratoire de toxicologie des sols étaient, quant à eux, fondés sur les conseils de Valerie Behan-Pelletier (Ph. D.) d'Agriculture et Agroalimentaire Canada, et de Steven Siciliano (Ph. D.) de l'Université de la Saskatchewan.

Les essais interlaboratoires ayant permis de valider la méthode d'essai biologique ont été coordonnés par Heather Lemieux et réalisés par les laboratoires suivants : Eurofins Agroscience Services EcoTox GmbH (Niefern-Öschelbronn, Allemagne), ECT Oekotoxikologie GmbH (Flörsheim am Main, Allemagne), Nautilus Environmental (Calgary, Canada), Exova (Edmonton, Canada), Université de Coimbra (Coimbra, Portugal), CREAM – Universitat Autònoma de Barcelona (Barcelone, Espagne), Vrije Universiteit Amsterdam (Amsterdam, Pays-Bas), Université de la Saskatchewan (Saskatoon, Canada), AGAT Laboratories (Ville de Québec, Canada) et ECCC (Ottawa, Canada). Nous remercions sincèrement tous les participants interlaboratoires pour leur contribution : Marlene Fuchs, Stephanie Kirschner et Thomas Moser d'Eurofins Agroscience Services EcoTox GmbH; Cornelia Bandow, Jörg Römbke, Adam Szeffczyk et Lilli Senn d'ECT Oekotoxikologie GmbH; Holly Lopez de Nautilus Environmental; Darlene Lintott d'Exova; Ana Daniela Alves, Tiago Natal da Luz et Carla Pereira de l'Université de Coimbra; Xavier Domene et Alba Llovet du CREAM – Universitat Autònoma de Barcelona; Kees van Gestel et Rudo Verweij de Vrije Universiteit Amsterdam; Richard Nhan, Kayode Jegede et Steven Siciliano de l'Université de la Saskatchewan; Virginie Bérubé, Mélanie Picard et Pierre Yves Robidoux d'AGAT Laboratories; et Heather Lemieux, Juliska Princz et Rick Scroggins d'ECCC (Ottawa, Canada).

Nous remercions les membres de la commission d'examen qui ont formulé de nombreuses observations judicieuses, notamment Thomas Moser d'Eurofins Agroscience Services EcoTox GmbH (Niefern-Öschelbronn, Allemagne); Lilli Senn et Jörg Römbke d'ECT Oekotoxikologie GmbH (Flörsheim am Main, Allemagne); Carla Sofia Pereira, Mathieu Renaud et Tiago Natal da Luz de l'Université de Coimbra (Coimbra, Portugal); Xavier Domene du CREAM – Universitat Autònoma de Barcelona (Barcelone, Espagne); Kees van Gestel de Vrije Universiteit Amsterdam (Amsterdam, Pays-Bas); et Kayode Jegede, John Owojori et Steven Siciliano de l'Université de la Saskatchewan (Saskatoon, Canada).

Nous sommes reconnaissants du soutien continu des membres des laboratoires d'essai environnemental régionaux d'ECCC (annexe B) et du Groupe intergouvernemental sur les essais écotoxicologiques (annexe C). Nous remercions tout particulièrement les membres (anciens et actuels) du laboratoire de toxicologie des sols d'ECCC d'avoir fourni des photographies à inclure dans le présent document sur la méthode d'essai.

Section 1

Introduction

1.1 Contexte

L'Unité de l'élaboration et de l'application des méthodes (UEAM) d'Environnement et Changement climatique Canada (ECCC; anciennement Environnement Canada) est responsable de mettre au point, de normaliser et de publier des méthodes d'essai biologique (v. annexe A) applicables à la mesure et à l'évaluation, dans des conditions de laboratoire contrôlées et définies, des *effets toxiques* d'échantillons de *substances* ou *matières* d'essai sur des organismes terrestres ou aquatiques (essais monospécifiques). En 1994, l'UEAM, l'Association canadienne des producteurs pétroliers et le gouvernement fédéral, par l'intermédiaire du Programme de recherche et de développement énergétiques, ont lancé un programme pluriannuel afin d'étudier, de concevoir, de valider et de publier un certain nombre de méthodes d'essai normalisées pour mesurer la *toxicité* d'échantillons de *sol contaminé* ou susceptible d'être contaminé, en faisant appel à des espèces terrestres appropriées d'organismes expérimentaux. Le programme avait pour but de mettre au point des méthodes applicables à divers types de *sols* canadiens auxquels seraient exposées des espèces terrestres représentatives des écosystèmes de ces sols. De nombreux examens exhaustifs des méthodes d'essai biologique utilisées dans le monde ont été effectués afin d'évaluer la toxicité des *contaminants* pour les invertébrés terrestres (Bonnell Environmental Consulting, 1994; Römbke et coll., 2006).

Environnement Canada a publié quatre méthodes d'essai biologique normalisées : i) Essai pour déterminer la toxicité de sols contaminés pour les vers de terre (*Eisenia andrei*, *Eisenia fetida* ou *Lumbricus terrestris*), SPE 1/RM/43 (EC, 2004a); Essai de mesure de la levée et de la croissance de plantes terrestres exposées à des contaminants dans le sol, SPE 1/RM/45 (EC, 2005a, modifiée en 2007); iii) Essai de mesure de la survie et de la reproduction de collemboles exposés à des contaminants dans le sol, SPE 1/RM/47 – 2^e édition (EC, 2014a); et iv) Essai de croissance de plantes terrestres indigènes de la région boréale exposées à un sol contaminé, SPE 1/RM/56 (EC, 2013a).

Le présent document décrit les procédures universelles de préparation et d'exécution des *essais de toxicité* d'un sol avec l'acarien oribate *Oppia nitens*. Des conseils sont aussi fournis au sujet des ensembles particuliers de conditions et de modes opératoires qui sont exigés ou recommandés lorsque la méthode d'essai biologique vise l'évaluation de différents types de substances ou matières (p. ex., des échantillons de sol ou de déchets particuliers semblables prélevés sur le terrain ou des échantillons d'une *substance chimique* ou plus mélangée ou mise en contact en laboratoire avec un sol naturel ou artificiel. Les *paramètres* biologiques établis pour les essais toxicologiques sont le succès de la reproduction, qu'on mesure à la fin de l'essai¹.

¹ Les méthodes d'analyse des sols d'ECCC ont toujours été conçues de manière à saisir les paramètres létaux (c.-à-d. la survie) et sublétaux (p. ex. reproduction, croissance) (EC, 2004a, 2014a). Toutefois, le succès de reproduction est le paramètre privilégié de cette méthode d'essai utilisant l'acarien oribate, car il s'est avéré beaucoup plus sensible que le paramètre lié à la survie des adultes (p. ex. EC, 2010, 2013b; Princz et coll., 2010, 2012, 2018; Li. et coll., 2018; Gainer et coll., 2018). La différence d'amplitude entre les deux paramètres est souvent suffisamment importante pour qu'il soit très difficile de déterminer une série de concentrations appropriée qui permettrait de saisir les deux paramètres

simultanément. Des recherches récentes ont mis en lumière les caractéristiques de l'espèce, notamment la longue durée de vie et la petite taille des couvées des acariens oribates, ce qui peut être lié à cette sensibilité observée pour le paramètre de reproduction (Gainer et coll., 2018). Bien que cet essai soit axé sur la reproduction en tant que critère d'évaluation, il est encore possible de calculer une *CL50* si cela est justifié (v. 4.7). Les données sur la survie des adultes sont recueillies et enregistrées à la fin de l'essai pour tous les sols afin de faciliter l'évaluation de la reproduction (p. ex., confirmer la survie des adultes, repérer les valeurs aberrantes) et l'évaluation de la validité de l'essai (v. 4.4 et 4.7).

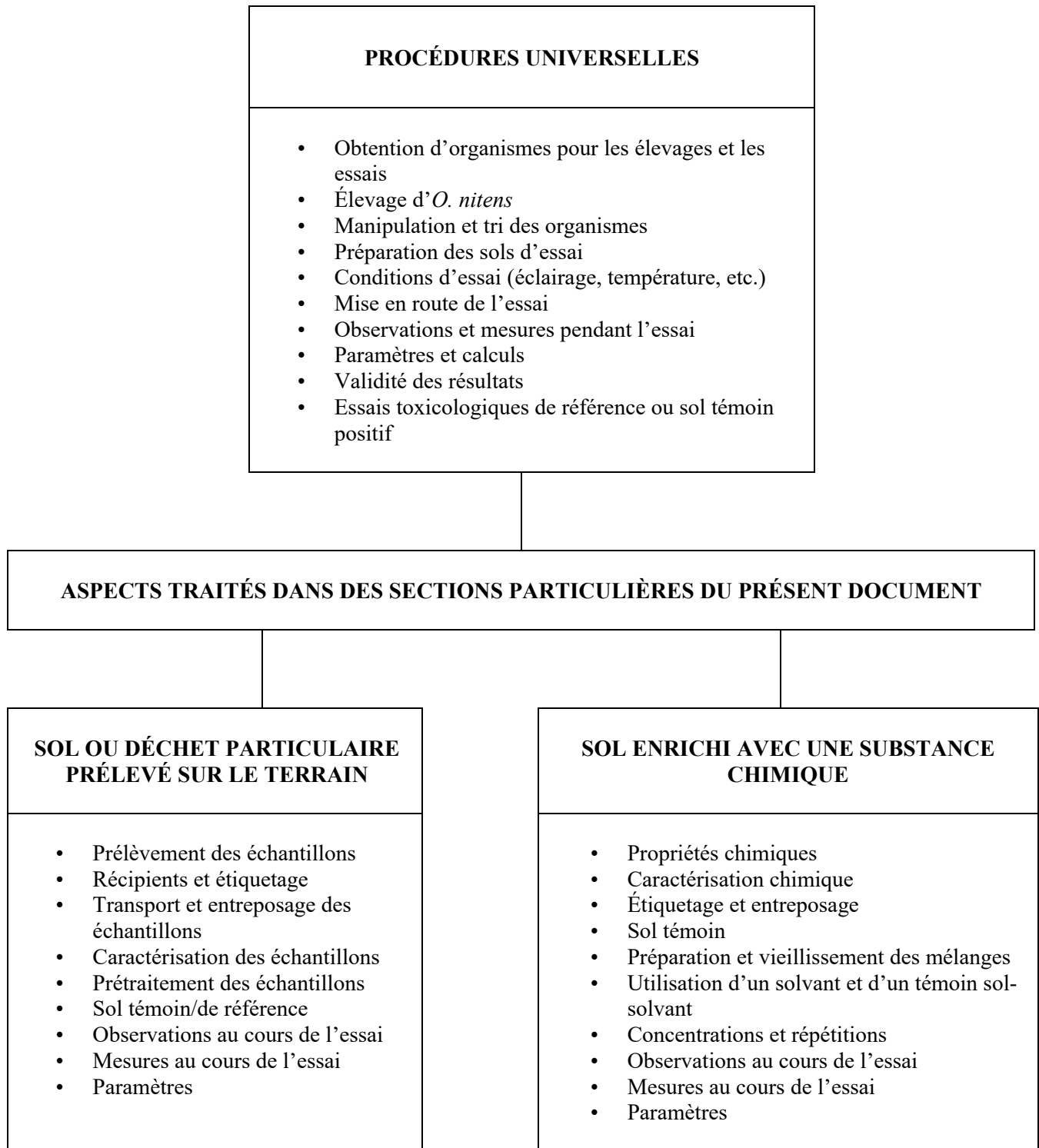


Figure 1 Points à considérer dans la préparation et l'exécution d'essais de toxicité des sols avec des acariens et divers types de substances ou matières d'essai

Le diagramme de la figure 1 donne un aperçu des procédures universelles abordées ici. Il énumère les aspects particuliers qui concernent expressément les essais sur des échantillons de sol ou de déchets particuliers semblables prélevés sur le terrain (p. ex., boues d'épuration, boues de forage, déblais de dragage) ou de sol enrichi en laboratoire avec une ou des substances chimiques.

La méthode d'essai a été conçue pour évaluer la toxicité *sublétale* d'échantillons de matière, notamment :

- un sol prélevé sur le terrain, contaminé ou susceptible d'être contaminé, provenant de régions agricoles ou non agronomiques;
- un sol qu'on envisage d'éliminer ou d'*assainir*;
- un sol qui a déjà été assaini;
- des déblais de dragage destinés à être éliminés par épandage sur le sol après déshydratation;
- des boues industrielles ou ménagères et des déchets particuliers semblables qui pourraient être déposés sur le sol;
- un sol contaminé ou *non contaminé* (naturel ou *artificiel*), enrichi avec une ou des substances chimiques (p. ex., pour une *évaluation du risque* que posent des substances chimiques nouvelles ou d'utilisation courante).

Dans la mise au point de la présente méthode d'essai biologique, on s'est efforcé de trouver un équilibre entre les considérations scientifiques, pratiques et pécuniaires et de faire en sorte que les résultats soient suffisamment précis pour la plupart des situations dans lesquelles ils seront appliqués. On suppose que l'utilisateur a une certaine connaissance des essais de toxicité des sols. Des instructions précises en lien avec les exigences d'un protocole réglementaire ne sont pas fournies dans le présent rapport, mais ce dernier se veut néanmoins un document d'orientation utile dans le contexte d'un tel protocole et pour d'autres applications.

Le lecteur qui souhaite obtenir des indications sur la mise en œuvre de la présente méthode d'essai biologique et d'autres méthodes, de même que sur

l'interprétation et l'application des données relatives aux paramètres mesurés afin de déterminer la toxicité d'un sol, devrait consulter les sous-sections 4.12, 5.5 et 5.6.4 du Guide des essais écotoxicologiques employant une seule espèce et de l'interprétation de leurs résultats (EC, 1999). Des directives détaillées sur l'utilisation des statistiques afin de déterminer les critères d'effet dans les essais écotoxicologiques sont disponibles dans le Document d'orientation sur les méthodes statistiques applicables aux essais d'écotoxicité d'Environnement Canada (EC, 2005b).

1.2 Identification, répartition et cycle biologique d'*Oppia nitens* (C. L. Koch)

L'espèce expérimentale à utiliser dans la méthode d'essai biologique décrite ici, soit *Oppia nitens*, appartient au sous-ordre Oribatida. Les acariens oribates (Oribatida = Cryptostigmata) font partie de la classe Arachnida (embranchement Arthropoda, sous-embranchement Chelicerata) communément connue pour les araignées, les scorpions et les acariens. Les acariens appartiennent à l'infraclasse Acari, qui est la plus diverse et la plus abondante de toutes les infraclasses d'arachnides (Walter et coll., 1996). On a trouvé des acariens fossilisés datant de près de 400 millions d'années; ils constituent donc certains des animaux terrestres les plus anciens (Norton et coll., 1988). L'infraclasse Acari est divisée en trois super-ordres : les Parasitiformes (qui comprennent les tiques), les Opilioacariformes et les Acariformes. Les acariens oribates font partie des Acariformes ou acariens « mites ». Les Acariformes sont séparés des deux autres super-ordres principalement par leurs *soies* sensorielles modifiées et la présence de chitine optiquement active (actinochitine) (Proctor, 1998).

Les acariens oribates circulent librement et sont habituellement les microarthropodes les plus abondants et les plus diversifiés présents dans les horizons organiques (Crossley et Bohnsack, 1960; Walter, 1985; Behan-Pelletier, 1999; Heneghan et coll., 1999), avec des densités allant de 200 000 (Maraun et Scheu, 2000) à environ 500 000 individus par m² (Behan et coll., 1978). Ces acariens sont souvent les arthropodes les plus abondants dans les écosystèmes froids de l'hémisphère Nord, ce qui est particulièrement important pour le Canada

(Behan, 1978). Les acariens oribates contribuent de façon considérable à l'immobilisation et à la minéralisation des éléments nutritifs (p. ex., l'azote) (Singh et coll., 1996; Hansen, 2000; Johnston et Crossley, 2002) et à la formation des sols (Coleman et coll., 2004).

Les acariens oribates sont généralement de couleur brun moyen à brun foncé, à quelques exceptions près, et mesurent en moyenne de 300 à 700 µm de long; toutefois, leur taille peut varier de 150 à 1 500 µm (Behan-Pelletier, 1999). La croissance et la maturité sont caractérisées par six stades de développement post-embryonnaire (prélarve inactive, larve active, protonympe, deutonympe, tritonympe et *adulte*), la croissance s'effectuant avec la perte de l'exosquelette. Certains aspects du développement sont uniques, car les pattes des *stades larvaires* ultérieurs sont formées à l'intérieur du corps, plutôt que dans l'enveloppe des pattes des stades larvaires précédents (Proctor, 1998). La mue (*exuviation*) est un stade de repos pré-exuvial (développement du tégument), caractérisé par une immobilité prolongée et, selon l'espèce, peut occuper jusqu'à un tiers de la durée de vie totale d'un acarien (Luxton, 1981). La perte d'exosquelette s'arrête au dernier stade de développement, lorsque l'exosquelette de la forme adulte se durcit et se sclérose. La mélanisation est également typique et se manifeste par une coloration brun moyen à brun foncé.

Les caractéristiques du cycle de vie des acariens oribates sont généralement décrites comme faisant l'objet d'une « *sélection à stratégie K* », et elles présentent un faible métabolisme, un développement lent et une faible fécondité. Cependant, étant donné l'abondance et la diversité des espèces d'acariens oribates, elles présentent des habitudes alimentaires vastes et opportunistes (Norton, 1985), elles sont capables de se disperser (quoique lentement, et surtout à l'âge adulte) et de coloniser différents habitats et horizons de sol, ainsi que d'occuper des niveaux trophiques variés (Behan-Pelletier, 1999). La durée de vie des acariens oribates (c.-à-d. de l'œuf à l'adulte) varie selon les espèces, allant de quelques semaines à plusieurs mois, et jusqu'à un an dans les sols tempérés (Norton, 1985), et de trois à sept ans dans les climats plus frais (Cannon et Block, 1988; Webb, 1989). Cependant, le délai de maturité a été principalement documenté dans des

conditions de laboratoire dont la température peut influencer sur la durée de maturation (Norton, 1994). Il convient également de noter que certaines espèces ont une capacité de surfusion lorsque les températures sont sous le point de congélation, ce qui peut prolonger leur longévité et permettre également la dormance hivernale (Cannon et Block, 1988).

Oppia nitens C. L. Koch, 1836 fait partie de la grande famille d'oribates, les Brachypylina :

- super-ordre, Acariformes;
- ordre, Sarcoptiformes;
- sous-ordre, Oribatida;
- infraordre, Brachypylina;
- super-famille, Oppioidea;
- famille, Oppiidae;
- sous-famille, Oppiinae.

Les adultes *Oppia nitens* mesurent environ 510 µm de long et 290 µm de large (Michael, 1884), tandis que les larves mesurent ~200 µm de long et ~105 µm de large et les tritonymphes mesurent ~372 µm de long et ~195 µm de large (Seniczak, 1975). Pendant les stades *juvéniles*, les acariens sont blancs/translucides, mais ils passent des teintes dorées à un riche brun châtain dans la semaine suivant l'âge adulte (annexe E). Le temps de développement semble dépendre des conditions environnementales, Princz (2014) ayant constaté que l'espèce arrive à maturité dans les quatre semaines suivant l'éclosion à une température de 20 à 23 °C, tandis que Sengbusch et Sengbusch (1970) ont observé une période de développement de 45 à 46 jours à 20 °C, les femelles ne pondant que trois mois après l'éclosion; Stefaniak et Seniczak (1981) ont observé, quant à eux, une période de développement de 28 jours à 23 °C, alors que Yu et coll. (1997) ont observé une période de développement de 2 à 3 semaines à 23 °C avec une humidité assez élevée de 85 ± 5 %. Il existe des renseignements contradictoires concernant le mode de reproduction (c.-à-d. sexuée ou parthénogénétique); cependant, les observations de spermatophores dans des conditions de laboratoire (Stefaniak et Seniczak, 1981) laissent supposer une reproduction sexuée. La documentation scientifique ne rapporte aucun dimorphisme sexuel documenté chez l'espèce (c.-à-d. que la taille des mâles ne diffère pas de celle des femelles), et aucun

dimorphisme sexuel n'a été observé à ce jour dans les élevages actuels de laboratoire. Les œufs d'*O. nitens* sont ovales et blanchâtres, avec une surface lisse, et des tailles allant de 90 à 150 µm (Seniczak, 1975); les œufs éclosent environ une semaine après l'oviposition (Princz, 2014).

Les caractéristiques diagnostiques permettant de déterminer qu'il s'agit d'*O. nitens* ont toujours inclus le nombre et le type de soies, mais plus récemment, l'accent est mis sur l'identification taxonomique basée sur l'ADN (c.-à-d. les codes à barres). L'Organisation internationale de normalisation (ISO) a publié une procédure normalisée pour la détermination des espèces expérimentales écotoxicologiques avec codes à barres de l'ADN (ISO, 2019a). Pour *O. nitens*, le séquençage de la région 5' de la sous-unité 1 de la cytochrome oxydase mitochondriale à partir de plusieurs échantillons est disponible aux fins de comparaison sur le portail de données International Barcode of Life (code à barres de la vie internationale) : www.boldsystems.org. Le Barcode of Life Data Systems (BOLD) est l'une des nombreuses bases de données internationales qui permettent d'accéder aux séquences de codes à barres de l'ADN et qui offrent une plateforme pour leur analyse.

Oppia nitens a été documenté comme étant une espèce fongivore et polyphage, mais il présente quelques préférences alimentaires sélectives (Seniczak et Stefaniak, 1978). Singh et coll. (1996) ont observé une forte préférence pour la litière de feuilles mortes mélangée à des champignons séchés, avec une préférence modérée pour la litière de feuilles ou les champignons seuls, et très peu de préférence pour la levure en grain; cependant, *O. nitens* a été cultivé avec succès sur de la levure en grain seule (Princz, 2014). Les autres substrats d'alimentation dans la nature comprennent les lichens, l'humus brut ou la charogne (tissus morts et en décomposition), et l'espèce peut être prédatrice et cannibale (Seniczak, 1975; Seniczak et Stefaniak, 1978).

1.3 Historique de l'utilisation des acariens dans les essais de toxicité

La mise au point de méthodes d'essai biologique pour mesurer la toxicité des sols accuse un retard par rapport aux essais portant sur d'autres milieux (p. ex., l'eau et les sédiments) (Bonnell Environmental Consulting, 1994). Ce retard est dû en partie au fait que les chercheurs et les organismes de réglementation se sont concentrés sur l'environnement aquatique. Les systèmes édaphiques présentent une plus grande complexité que les systèmes aquatiques et posent de nombreux problèmes en raison de leur manque d'homogénéité. La diversité des voies d'exposition à prendre en considération (p. ex., l'eau de porosité, les vapeurs du sol ou le contact direct avec des particules de sol), conjuguée au coût élevé de la réalisation des essais toxicologiques sur des sols, a souvent conduit les expérimentateurs à extrapoler aux expositions à des sols contaminés les résultats d'essais sur des milieux aquatiques (Bonnell Environmental Consulting, 1994).

Au cours des années 1970 et avant, l'évaluation de la qualité des sols consistait principalement en des mesures des propriétés physicochimiques du sol. C'est seulement au cours des années 1980 que les organismes responsables de l'homologation et de l'épandage des pesticides ont commencé à utiliser des méthodes d'essai biologique normalisées pour mesurer la toxicité des sols [p. ex., l'United States Environmental Protection Agency (USEPA) et l'Office of Pesticides Programs (Holst et Ellanger, 1982); l'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE), 1984a, b].

La toxicité de *sols de site* est devenue une « nouvelle » source de préoccupation au milieu des années 1980, et des programmes de réglementation tels que le SUPERFUND aux États-Unis et le Programme national d'assainissement des lieux contaminés (PNALC) au Canada ont été mis en place pour répondre au besoin impérieux de lignes directrices sur l'évaluation et l'assainissement des lieux contaminés hautement prioritaires. Un examen des *tests biologiques* existants avec des organismes entiers, pour évaluer la toxicité de sols, d'eaux douces et de sédiments d'eau douce (Keddy et coll., 1995), réalisé aux termes du PNALC, a mené à la

définition d'une série d'essais utilisables immédiatement pour évaluer des lieux contaminés au Canada (Bonnell Environmental Consulting, 1994). Keddy et coll. (1995) ont conclu que la plupart des méthodes ou modes opératoires existants pour mesurer la toxicité d'échantillons de sol provenant de lieux contaminés ne permettaient pas une évaluation écotoxicologique correcte, et ils ont recommandé que des efforts soient déployés afin de mettre au point une série de méthodes d'essai biologique normalisées qui feraient appel à des espèces expérimentales et à des conditions d'essai applicables aux écosystèmes pédologiques canadiens. Le Conseil canadien des ministres de l'environnement (CCME) a publié en 1994 un cadre de travail pour l'évaluation du risque écologique (ERE) (CCME, 1994), qui a eu par la suite une incidence sur la gestion des lieux contaminés (CCME, 1996, 1997). La démarche adoptée dans l'ERE, qui s'appuyait sur les résultats d'essais toxicologiques monospécifiques, a mis en évidence la nécessité de concevoir des essais toxicologiques fiables, reproductibles et réalistes, avec des espèces terrestres pertinentes d'un point de vue écologique, pour évaluer les sols prélevés dans des lieux contaminés (Bonnell Environmental Consulting, 1994). À la fin des années 1990, les évaluations biologiques sous la forme d'essais toxicologiques sont devenues un complément utile aux analyses chimiques, notamment dans les *évaluations du risque* particulier à un lieu.

Les acariens oribates ont servi d'indicateurs biologiques des perturbations environnementales (Lebrun et van Straalen, 1995; Behan-Pelletier, 1999; Gergócs et Hufnagel, 2009), s'adaptant aux changements de la qualité du sol et démontrant une sensibilité aux contaminants (p. ex., métaux, pesticides, hydrocarbures pétroliers) dans le sol (tel qu'il est examiné dans Princz, 2014). Par rapport aux autres acariens et aux arthropodes terrestres, les populations d'acariens oribates se sont révélées plus sensibles aux perturbations du sol telles que les impacts des polluants, les amendements organiques et les pratiques forestières (Al-Assiuty et coll., 2000; Battigelli et coll., 2004; Minor et Norton, 2004). Les caractéristiques de leur cycle biologique (p. ex., faible métabolisme, développement lent, faible fécondité) et leur capacité de dispersion lente limitent leur capacité d'adaptation aux perturbations à court terme, ce qui entraîne un déclin des

populations, qui peut à son tour être détecté comme un signe de dégradation de l'environnement (Lebrun et van Straalen, 1995). L'utilisation des acariens oribates pour les essais écotoxicologiques a été examinée (Lebrun et van Straalen, 1995; Hugier et coll., 2015); elle démontre une augmentation récente de leur applicabilité dans l'évaluation des sols prélevés dans des lieux contaminés ainsi que des sols enrichis avec une substance chimique, et elle évalue des paramètres tels que la létalité, l'évitement et la reproduction.

Les premières tentatives de normalisation de la méthode ont commencé par la mise au point, par van Gestel et Doornekamp (1998), d'un essai portant sur les sols avec l'espèce parthénogénétique *Platynothrus peltifer* afin de définir la mortalité et la reproduction (C. L. Koch, 1839). Les méthodes d'essai comprenaient des études d'exposition par voie alimentaire et par le sol, les études d'exposition par le sol ayant démontré une plus grande sensibilité à certains *toxiques* (sel de cuivre et de sodium de sulfonates d'alkylbenzène linéaires). Les résultats de cette recherche ont démontré la nécessité d'adopter un système d'exposition par le sol pour tenir compte des multiples voies d'exposition. Cependant, la normalisation d'une méthode d'essai avec *P. peltifer* a été limitée par la nécessité d'utiliser des spécimens prélevés sur le terrain en raison des difficultés d'établissement et de maintien des élevages en laboratoire. Bien que les essais aient été efficaces pour discerner les effets sur la reproduction après une exposition à un sol contaminé, les essais ont été compromis par une mortalité élevée chez les adultes et ont été longs (p. ex., de 6 à 12 semaines pour le paramètre de la reproduction) de manière à tenir compte du long cycle de développement de l'espèce (p. ex., >150 j jusqu'à maturité) (van Gestel et Doornekamp, 1998). Bien que cette espèce soit répandue dans les écosystèmes boréaux et arctiques, les difficultés associées à l'élevage et aux essais ont également conduit à la recommandation d'exclure cette espèce de l'élaboration des méthodes d'essai de toxicité dans le sol (Römbke et coll., 2006).

D'autres études ont intégré l'utilisation d'*Archezogetes longisetosus* (Aoki, 1965) comme espèce expérimentale en laboratoire (Seniczak et Seniczak, 2002; Köhler et coll., 2005; Seniczak, 2006; Seniczak et coll., 2006, 2009; Heethoff et coll., 2007), car cette espèce est parthénogénétique,

facile à élever dans des conditions de laboratoire et caractérisée par une courte durée de génération avec une fécondité relativement élevée (Heethoff et coll., 2007). Toutefois, cette espèce est limitée à une répartition pantropicale; par conséquent, la pertinence de cette espèce pour les habitats non tropicaux peut être remise en question, particulièrement lorsqu'on évalue les sols des régions boréales et nordiques. Pour d'autres espèces d'acariens, de nombreuses recherches ont été menées pour normaliser *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* en tant qu'espèce expérimentale standard (OCDE, 2008; Smit et coll., 2012; ISO, 2019b); cependant, cette espèce occupe un niveau trophique supérieur en raison de ses habitudes de prédation, et ne représente pas la niche écologique qu'occupent les acariens oribates.

Bien que la recherche sur les métaux domine les études toxicologiques associées aux acariens oribates, les chercheurs ont également évalué l'effet des pesticides en laboratoire et sur le terrain. D'une manière générale, la toxicité des pesticides est propre à la substance et à l'espèce (p. ex., Al-Assiuty et Khalil, 1995; Cortet et coll., 2002; Prinzing et coll., 2002), avec des conséquences négatives sur certaines espèces [p. ex., azadiractine (Stark, 1992); 2,4,6-trinitrotoluène et p-nitrophénol (Parmelee et coll., 1993)], tandis que d'autres espèces ne subissent aucune perturbation [p. ex., chlorpyrifos (Stark, 1992; Michereff-Filho et coll., 2004); endosulfan (Osler et coll., 2001); éthylène-bis-dithiocarbamate de manganèse et de zinc (Adamski et coll., 2007); et néonicotinoïdes (de Lima e Silva et coll., 2017)].

En ce qui concerne la contamination par les hydrocarbures, les acariens oribates montrent un certain degré de sensibilité aux sols contaminés par les hydrocarbures pétroliers, ainsi qu'aux hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) à plus petits cycles, sans effet associé aux composés HAP à cinq cycles, tels que le benzo[a]pyrène et la créosote (Blakely et coll., 2002; Owajori et Siciliano, 2012; Princz et coll., 2012). Des résultats similaires ont été obtenus lors de l'exposition de *H. aculeifer* au benzo[a]pyrène pendant trois semaines; en effet, aucun effet sur la survie ou la reproduction des adultes n'a été observé jusqu'à la plus forte concentration d'essai de 947 mg/kg de sol sec (Sverdrup et coll., 2007). Cependant, d'autres

chercheurs ont conclu qu'une contamination par les HAP était associée à une diminution de l'abondance des acariens dans le sol (Erstfeld et Snow-Ashbrook, 1999).

Le potentiel d'*O. nitens* en tant qu'espèce expérimentale n'a été étudié que relativement récemment. Yu et coll. (1997) ont étudié la toxicité des toxines *Bacillus thuringiensis* présentes dans le coton et les pommes de terre transgéniques pour *O. nitens*. L'effet de l'exposition alimentaire seulement a été évalué sur la survie et la reproduction des adultes, et aucun effet néfaste n'a été détecté. Ces auteurs ont utilisé le cadmium comme témoin positif, mais n'ont pas signalé les effets du métal sur la survie ou la reproduction des adultes. Princz et coll. (2010) font état du succès de l'utilisation d'élevages synchrones d'*O. nitens* pour les essais de mortalité et de reproduction dans des sols prélevés sur le terrain, et ont fourni des conseils sur leur utilisation dans les essais de toxicité du sol. Toutefois, les auteurs ont averti que la teneur en matière organique du sol pourrait servir de facteur limitant pour leur utilisation dans les sols très riches en minéraux. Depuis, d'autres recherches ont démontré l'applicabilité de l'utilisation d'*O. nitens* dans l'évaluation des sols prélevés dans des lieux contaminés (p. ex., Princz et coll., 2012) et des sols enrichis avec une substance chimique (p. ex., Owajori et Siciliano, 2012; de Lima e Silva et coll., 2017; Gainer et coll., 2018, 2019; Li et coll., 2018; Princz et coll., 2018), ce qui justifie leur inclusion dans une approche de batterie d'essais dans le cadre de l'évaluation des risques liés aux sols contaminés. Une étude récente de Huguier et coll. (2015) met en garde que les acariens *O. nitens*, comparativement aux autres invertébrés du sol, ont de façon générale une sensibilité inférieure ou égale à la contamination anthropique, tout en faisant écho au sentiment que les acariens représentent des communautés qui ne peuvent être omises de l'évaluation des dangers pour l'environnement. Plus récemment, les experts ISO du comité technique TC-190 : Qualité du sol a accepté de procéder à l'élaboration d'une procédure normalisée pour mesurer l'inhibition de la reproduction des acariens oribates (*Oppia nitens*) exposés aux contaminants dans le sol, sous la direction d'experts canadiens (ISO, 2019c).

Section 2

Organismes expérimentaux

2.1 Espèces et stade de développement

L'essai décrit dans le présent document doit être réalisé avec des organismes élevés en laboratoire et appartenant à *Oppia nitens* C. L. Koch, 1836. L'identification, la répartition et le cycle biologique d'*O. Nitens* sont résumés en 1.2. L'identification des espèces doit être confirmée et documentée² lors de l'établissement d'un nouvel élevage, ou avec chaque nouveau lot d'*O. nitens* introduit dans l'élevage de laboratoire (Römbke et coll., 2016). Tous les deux ans au moins, on devrait repérer jusqu'au niveau de l'espèce les élevages d'*O. nitens* conservés pendant une longue période dans le laboratoire d'essais. L'identification des espèces peut être faite par l'intermédiaire des caractéristiques taxinomiques distinctives qui sont décrites et illustrées dans les clés taxinomiques ainsi que par des personnes compétentes qui ont de l'expérience dans l'identification des acariens oribates, ou par l'intermédiaire de l'identification taxinomique fondée sur le code à barres de l'ADN (ISO, 2019a). Pour démarrer l'essai de toxicité d'un sol décrit dans le présent document, il faut utiliser des acariens adultes synchrones *O. nitens* recueillis au cours d'une période de ≤ 3 jours et âgés de 8 à 10 jours après l'exuviation jusqu'à la forme adulte (v. 2.3.8).

2.2 Source

Les organismes expérimentaux à utiliser doivent être des acariens élevés en laboratoire (v. 2.3). Les sources de géniteurs d'*Oppia nitens* nécessaires pour

démarrer les élevages peuvent être des laboratoires gouvernementaux ou privés qui font l'élevage de cette espèce d'acarien en vue d'essais de toxicité des sols³.

On peut obtenir un stock de géniteurs d'*O. nitens* auprès de la source canadienne suivante :
Unité de l'élaboration et de l'application des méthodes
Direction générale des sciences et de la technologie
Environnement et Changement climatique Canada
335, chemin River
Ottawa (Ontario) K1A 0H3
Courriel : ec.méthodes-methods.ec@canada.ca,

et la source internationale suivante :
Cornelius (Kees) A.M. van Gestel
Département des sciences écologiques
Vrije Universiteit Amsterdam
De Boelelaan 1085
1081 HV Amsterdam
Pays-Bas
Courriel : kees.van.gestel@vu.nl

Tous les acariens utilisés dans un essai de toxicité d'un sol doivent provenir de la même population. Les acariens destinés à servir de géniteurs devraient être transportés au laboratoire avec une partie du sol ou du substrat auquel ils sont adaptés. Les stocks de géniteurs, issus d'un élevage d'organismes d'âges variés, devraient être transportés dans de petits récipients contenant un substrat en plâtre de Paris (v. 2.3.5)⁴ ou dans un petit récipient contenant un

² Pour être acceptable, l'identification des spécimens de laboratoire doit être effectuée par un taxinomiste qualifié ou par analyse moléculaire (code à barres de l'ADN).

³ Les expérimentateurs qui souhaitent utiliser des descendants d'organismes ayant occupé une niche particulière peuvent démarrer les élevages à partir de populations sauvages ou améliorer génétiquement les élevages en introduisant un stock de géniteurs provenant de différentes sources. Si les organismes proviennent d'une population sauvage, il faut confirmer leur taxinomie; de plus, il faudrait évaluer leur sensibilité ou

celle de leurs descendants à un ou des toxiques de référence avant de les utiliser dans les essais. Idéalement, les organismes prélevés sur le terrain devraient provenir de sites réputés exempts de tout épandage ou de toute source de pesticides ou d'engrais pendant les cinq dernières années au moins.

⁴ Il est possible que le plâtre de Paris se détache du fond du récipient pendant le transport; il faudrait donc prendre des précautions pour éviter que les acariens soient écrasés entre le substrat détaché et le couvercle du récipient. Le récipient devrait être fermé hermétiquement avec une

échantillon de sol. Au besoin, on se procurera des quantités supplémentaires de ce substrat aux fins d'*acclimatation* ou d'élevage, selon les conditions et les exigences de l'élevage (v. 2.3). Les récipients utilisés pour l'expédition et le transport devraient être isolés afin de réduire au minimum les fluctuations de température pendant le transport; la température devrait être maintenue à ~20 °C. Le transport d'organismes vivants devrait se faire rapidement afin que les organismes soient livrés dans les plus brefs délais (c.-à-d. dans les 24 h). On devrait éviter toute surpopulation d'organismes pendant l'expédition ou le transport afin de réduire le stress au minimum.

À l'arrivée au laboratoire, les organismes peuvent être conservés dans le substrat (sol ou plâtre de Paris) utilisé pour le transport pendant qu'on ajuste la température, ou être transférés dans un nouveau substrat d'élevage (v. 2.3.5). Si la nature du substrat (y compris sa *texture* et sa *teneur en humidité*) dans lequel les acariens ont d'abord été conservés (p. ex., par un fournisseur) ou transportés diffère sensiblement de celle du substrat dans lequel ils doivent être élevés (v. 2.3.5), il serait prudent de prévoir une période d'adaptation de plusieurs jours au nouveau substrat. L'impact de la transition peut être atténué en ajoutant une partie du substrat de transport au substrat d'élevage.

On devrait ajuster graduellement la température du sol (p. ex., ≤3 °C par jour) pour l'amener à la température à utiliser pendant l'élevage (v. 2.3.4). On devrait suivre les conseils fournis en 2.3.7 au sujet de la manipulation des acariens lorsqu'on transfère les organismes d'une source extérieure aux récipients d'élevage (v. 2.3.2). Pendant cette période transitoire d'*acclimatation* du stock de géniteurs ou des organismes expérimentaux, les autres conditions

devraient être aussi semblables que possible à celles utilisées pour le maintien des élevages (v. 2.3).

2.3 *Élevage d'Oppia nitens*

2.3.1 *Généralités*

La présente sous-section fournit des orientations et des recommandations générales pour l'élevage d'*Oppia nitens* en vue d'essais de toxicité des sols. Conformément à l'adage selon lequel « *ce qui pourrait bien fonctionner dans un laboratoire pourrait ne pas fonctionner aussi bien dans un autre* » de nombreux aspects de l'élevage, notamment le choix des récipients d'élevage, le nombre d'organismes par récipient, les conditions de renouvellement du sol, le substrat d'élevage, le type de nourriture et les rations, sont laissés à la discrétion du personnel de laboratoire, qui agira en fonction de son expérience, même si des indications et des recommandations sont fournies dans les paragraphes qui suivent. On utilise des indices de performance⁵ pour déterminer si les organismes d'élevage conviennent aux essais et si les résultats des essais sont acceptables. Pour convenir aux essais, les élevages doivent présenter de faibles taux de mortalité; de plus, les organismes doivent sembler en bonne santé⁶ et se comporter et se nourrir normalement (v. 2.3.9). En outre, les organismes *témoins* doivent satisfaire à tous les critères de validité de l'essai toxicologique (v. 4.4). L'acceptabilité de l'élevage devrait également être démontrée au moyen d'*essais toxicologiques de référence* réalisés en continu ou au moyen de sols témoins positifs à l'aide d'un *toxique de référence* (v. 4.9). Si un élevage ne satisfait pas à ces critères, il faudrait rechercher les causes de cette situation. Il faut prendre soin d'éviter toute contamination d'un élevage avec d'autres espèces semblables (c.-à-d. mélangé avec d'autres acariens ou espèces d'invertébrés). En conséquence, il est recommandé

bande de Parafilm® pour empêcher la perte d'humidité jusqu'à la réception, après quoi la bande de Parafilm® peut être retirée.

⁵ Ces indices concernent notamment la survie et l'état des organismes d'élevage qui seront utilisés dans l'essai (v. 2.3.9); ils comprennent également les critères auxquels les organismes témoins doivent satisfaire pour que l'essai soit valide (v. 4.4) ainsi que les critères liés à la performance de groupes d'animaux dans une concentration témoin

positive exécutée en même temps que chaque essai définitif ou dans des essais toxicologiques de référence (v. 4.9).

⁶ Les laboratoires d'ECCC ont observé que les acariens adultes qui n'ont pas la pigmentation foncée typique d'*O. nitens* (c.-à-d. opaque et d'apparence « laiteuse ») ne peuvent se reproduire et ne conviennent donc pas aux essais (v. 2.3.9). Consulter l'exemple photographique à l'annexe E.

de procéder à des vérifications taxinomiques périodiques (p. ex., tous les deux ans) des élevages conservés au laboratoire (v. 2.1).

Il incombe au laboratoire de faire la preuve de sa capacité d'obtenir des résultats cohérents et précis à l'aide d'un toxique de référence lorsqu'il se prépare pour la première fois à effectuer des essais de toxicité d'un sol avec des acariens *O. nitens* d'élevage. À cette fin, il devrait déterminer sa *précision* intralaboratoire, exprimée sous la forme d'un *coefficient de variation* (CV) des données respectives sur la concentration létale médiane (CL50), en effectuant ≥ 5 essais complets (c.-à-d. 28 jours) avec des lots (groupes) différents d'organismes expérimentaux provenant de la même source, avec le même toxique de référence ainsi qu'un mode opératoire et des conditions expérimentales identiques pour chaque essai (v. 4.9).

Lorsque le laboratoire effectue des essais de toxicité des sols avec *O. nitens*, une certaine cohérence doit être démontrée, soit en incluant une concentration témoin positive avec chaque essai *définitif* (v. 4.9), soit en effectuant des essais toxicologiques de référence, ce qui doit être réalisé au minimum deux fois par an avec les élevages conservés en laboratoire, dans les conditions et selon les méthodes décrites en 4.9. De plus, on devrait vérifier la performance de tout élevage établi récemment à l'aide d'un nouveau stock de géniteurs (v. 2.2) en effectuant un essai toxicologique de référence ou en utilisant un sol témoin positif. Si les résultats sont jugés acceptables (v. 2.3.9 et 4.9), le laboratoire pourra alors s'approvisionner en organismes expérimentaux dans ces élevages.

Les élevages d'*O. nitens* devraient être observés fréquemment (p. ex., une ou deux fois par semaine). Idéalement, on devrait consigner les informations suivantes :

- la date de démarrage de l'élevage avec des adultes;
- les dates de renouvellement du substrat;
- le régime d'alimentation et d'arrosage (y compris le type et la quantité d'aliments et d'eau ajoutés chaque fois);
- les conditions ambiantes et la qualité du substrat (p. ex., température ambiante, *photopériode* et qualité de la lumière, *pH* du substrat);

- des observations sur l'état de santé des élevages (p. ex., comportement et aspect des acariens, taux de reproduction, présence d'organismes d'âges variés, odeur du substrat, emplacement des acariens dans le récipient, quantité de nourriture délaissée dans le récipient, présence de champignons ou d'organismes autres qu'*O. nitens*).

Le tableau 1 qui suit présente une liste de contrôle des conditions et modes opératoires recommandés et exigés pour l'élevage d'*O. nitens* afin d'obtenir des organismes utilisables dans les essais de toxicité des sols.

2.3.2 Installations et appareils

L'élevage des acariens devrait se faire dans une installation de laboratoire à température contrôlée. Le dispositif de régulation de la température (incubateur ou pièce à température constante) devrait permettre de maintenir la température à l'intérieur des limites recommandées (v. 2.3.4). La zone d'élevage doit être isolée de tout secteur d'essai, d'entreposage des échantillons ou de préparation de ceux-ci afin d'éviter la contamination à partir de ces sources. Elle doit être conçue et construite de façon à prévenir la contamination des élevages (p. ex., absence de tuyaux ou d'accessoires en cuivre ou en métal galvanisé qui pourraient laisser dégoutter des condensats contaminés par des métaux).

Tout le matériel et tous les récipients et accessoires susceptibles d'entrer en contact avec les organismes ou le substrat dans l'installation d'élevage doivent être propres, rincés convenablement et fabriqués dans des matériaux non toxiques (p. ex., verre, Téflon^{MC}, acier inoxydable 316, nylon, Nalgène^{MC}, porcelaine, polyéthylène, polypropylène). Les matériaux toxiques comme le cuivre, le zinc, le laiton, le métal galvanisé, le plomb et le caoutchouc naturel ne doivent pas entrer en contact avec l'appareillage et le matériel, ni avec le substrat d'élevage ou l'eau.

Divers récipients d'élevage tels que des bacs en plastique ou des enceintes de reproduction conviennent à l'élevage d'*O. nitens*. Les côtés ou le couvercle peuvent être translucides ou transparents afin de permettre à la lumière d'atteindre la surface du substrat d'élevage (v. 2.3.3), mais il ne s'agit pas

Tableau 1. Liste de contrôle des conditions et modes opératoires recommandés et exigés pour l'élevage d'*Oppia nitens* destinés à servir d'organismes expérimentaux dans des essais de toxicité des sols

Source du stock de géniteurs	– élevage d'organismes d'âges variés provenant d'un laboratoire gouvernemental ou privé; identification confirmée jusqu'au niveau de l'espèce
Acclimatation	– graduelle, pour les différences de température (recommandé : ≤ 3 °C/jour) et de substrat à l'arrivée au laboratoire
Récipients d'élevage	– bacs en plastique ou enceintes de reproduction, avec couvercles perforés ou non; parois ou couvercle transparents ou translucides pour permettre à la lumière d'atteindre la surface du substrat d'élevage
Température ambiante	– moyenne quotidienne : 20 ± 2 °C; instantanée : 20 ± 3 °C
Éclairage	– éclairage incandescent, fluorescent ou à DEL; intensité de 400-800 lux à la surface du récipient d'élevage; photopériode fixe (p. ex., 16 h de clarté et 8 h d'obscurité ou 12 h de clarté et 12 h d'obscurité)
Type de substrat	– ≥ 1 cm de sol riche en matière organique; mélange de plâtre de Paris et de charbon actif selon un ratio de 8:1 de ≥ 1 cm; surface du substrat recouverte de plâtre de Paris ou de morceaux triangulaires de papier filtre enduits de plâtre de Paris; autre possibilité : couche de ≥ 1 cm de plâtre de Paris recouverte de ≥ 1 cm de sol riche en matière organique
Hydratation du substrat	– avec de l'eau d'essai; teneur en humidité suffisante pour maintenir la surface du substrat humide, mais sans accumulation d'eau surnageante sur la surface du substrat d'élevage recouvert de plâtre de Paris ou au fond des récipients d'élevage sur un substrat de sol
pH du substrat	– 6,0-7,5
Renouvellement du substrat	– au besoin et au moins une fois tous les 4-6 mois; transférer les acariens dans les substrats d'élevage fraîchement préparés; mélanger des organismes provenant des récipients d'élevage
Surveillance de l'élevage	– vérification hebdomadaire de la température ambiante dans l'installation d'élevage; mesure du pH lorsque de nouveaux lots de sol ou de plâtre de Paris sont préparés

Entretien de l'élevage	– aérer les récipients au moins une fois par semaine (recommandation de deux fois par semaine); vérifier le taux d'humidité du substrat dans chaque récipient au moment de l'aération; vaporiser la surface ou ajouter plusieurs gouttes d'eau d'essai pour maintenir le taux d'humidité; consigner l'état de l'élevage; maintenir la densité de population à ~5-15 acariens adultes par centimètre carré pour le substrat recouvert de plâtre de Paris; conserver des élevages sur un substrat de sol avec des organismes d'âges variés se déplaçant activement sur la surface du substrat ou se regroupant autour de tas de levures après la distribution de nourriture; l'ajout de matière organique au substrat pourrait accroître la reproduction
Alimentation	– levure sèche granulée (p. ex., Fleischmann's ^{MC}); nourriture divisée en plusieurs tas ou saupoudrée sur la surface du substrat; deux fois par semaine
Entretien des élevages synchrones	– les nouveaux acariens adultes sont choisis à partir du substrat en plâtre de Paris sur une période de ≤3 jours en fonction de la couleur de leur tégument; les organismes sélectionnés sont séparés de l'élevage principal; les organismes conservés dans le sol sont extraits des élevages dans le sol à l'aide de chaleur, puis transférés dans un substrat en plâtre de Paris aux fins de sélection; les organismes choisis pour la synchronisation sont conservés sur le plâtre de Paris comme dans le cas de l'élevage principal (p. ex., nourri et aéré au moins deux fois par semaine)
Âge des organismes expérimentaux	– organismes sélectionnés en tant que nouveaux adultes (exuviation) (tégument légèrement coloré) sur une période de ≤3 jours, puis vieillis pendant 8 à 10 jours avant le début de l'essai
Indices de la santé de l'élevage	– élevage considéré comme étant en bonne santé si : 1) les organismes d'âges variés se déplacent activement sur la surface du substrat, avec une faible incidence (≤10 %) de non-coloration des acariens (apparence « laiteuse »); 2) les résultats des essais toxicologiques de référence ou des sols témoins positifs avec des acariens provenant de l'élevage se situent à l'intérieur des limites de contrôle « historiques »; les acariens qui semblent blessés ou en mauvaise santé (p. ex., apparence laiteuse) ne doivent pas servir à l'essai et devraient être éliminés; les données liées à la reproduction issues des sols témoins négatifs sont étudiées

*** Les renseignements contenus dans ce tableau ne sont qu'un résumé. Les exigences et recommandations définitives de cette méthode d'essai figurent dans le corps du présent document.**

d'une exigence. Chaque récipient devrait être doté d'un couvercle – celui-ci peut être non perforé afin de réduire au minimum l'assèchement du substrat en surface et le risque de contamination, ou être perforé (p. ex., trous couverts d'un grillage en fibre de verre ou Nitex^{MC}) pour permettre la circulation d'air. L'emploi de récipients d'élevage en bois n'est pas recommandé en raison de la présence possible de contaminants toxiques (p. ex., colles pour contreplaqué, produits chimiques anti-tache de sève

ou produits d'extraction du bois tels que les acides résiniques et les juvabionnes).

Le choix de la taille et du nombre de récipients d'élevage pourrait dépendre du nombre d'acariens adultes dont le laboratoire a besoin pour effectuer une ou des séries d'essais de toxicité des sols. Chaque récipient d'élevage devrait pouvoir recevoir une couche de sol ou de plâtre de Paris de ≥1 cm d'épaisseur, ou une combinaison des deux (c.-à-d.

couche de plâtre de Paris de ≥ 1 cm d'épaisseur recouverte d'une couche de sol de ≥ 1 cm d'épaisseur).

2.3.3 Éclairage

L'espèce *O. nitens* peut être élevée sous un éclairage incandescent, fluorescent ou à diode électroluminescente (DEL), et une photopériode régulée (p. ex., 16 h de clarté et 8 h d'obscurité ou 12 h de clarté et 12 h d'obscurité). L'intensité lumineuse à proximité de la partie supérieure des récipients d'élevage devrait être de 400-800 lux. Cet intervalle équivaut à un flux quantique de 5,6-11,2 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ pour un éclairage fluorescent blanc froid, de 6,4-12,8 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ pour un éclairage fluorescent à spectre continu ou de 7,6-15,2 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ pour un éclairage incandescent. Les sources lumineuses devraient être suffisamment éloignées des récipients d'élevage pour empêcher l'évaporation causée par l'accumulation de chaleur.

2.3.4 Température

Pour l'espèce expérimentale, la moyenne quotidienne de la température ambiante dans l'installation d'élevage devrait être de 20 ± 2 °C, et la température instantanée de l'installation, de 20 ± 3 °C.

2.3.5 Substrat d'élevage

Le choix du substrat d'élevage pour *O. nitens* est laissé à la discrétion du personnel de laboratoire, qui décidera en fonction de son expérience; cependant, les substrats d'élevage décrits ci-dessous ont fait leurs preuves et sont recommandés.

Selon l'expérience d'Environnement et Changement climatique Canada, les élevages d'*O. nitens* présentent des taux de survie et de reproduction plus élevés lorsqu'ils sont conservés dans un substrat de sol par rapport à ceux conservés sur un substrat de plâtre de Paris (ECCC, 2018). Le substrat recommandé par ECCC pour l'élevage des vers de terre (v. 2.3.5 de EC, 2004a) a été utilisé avec succès

pour l'élevage des acariens; cependant, d'autres types de sol pourraient aussi convenir. Les sols des champs riches en matière organique (dont la non-contamination a été démontrée – c.-à-d. qu'ils n'ont pas été préalablement traités avec des pesticides, etc.) se sont également révélés appropriés pour l'élevage d'*O. Nitens*. On peut utiliser ces sols pour conserver de gros élevages ou des élevages de secours au laboratoire. Les laboratoires d'ECCC ont mieux réussi à élever des acariens dans les sols sableux riches en matière organique ou en litière de feuilles (ECCC, 2018). Une épaisseur minimale de 1 cm est recommandée pour l'élevage. Lorsque des organismes sont nécessaires pour mener des essais, ils sont extraits des élevages dans le sol avec de la chaleur, puis transférés sur un substrat en plâtre de Paris de manière à faciliter l'observation, la manipulation et la synchronisation.

À l'instar de Wiles et Krogh (1998), ISO (1999), Greenslade et Vaughan (2003), EC (2014a) et OCDE (2009), nous recommandons d'employer un substrat composé de 8 parties de plâtre de Paris (stuc)⁷ et de 1 partie de charbon (p. ex., un charbon actif de qualité analytique de 375 μm mesh, dont celui de marque Fisher, n° 35-474 au catalogue) pour l'élevage d'invertébrés terrestres tels que les collemboles, un substrat également jugé approprié par ECCC pour l'élevage d'*O. nitens*. Le substrat d'élevage est préparé sous une hotte, dans un flacon de 1 L en plastique avec un bouchon vissé. On commence par déposer 120 g de plâtre de Paris et 15 g de charbon dans le flacon. Ensuite, on ajoute 130 mL d'eau d'essai, puis on ferme le flacon et on l'agite pendant 30 secondes. La quantité d'eau nécessaire peut varier selon le type de plâtre utilisé. On verse ensuite le mélange de plâtre de Paris ainsi préparé dans le ou les récipients d'élevage de façon à obtenir une couche de 1 cm d'épaisseur (Becker-van Slooten et coll., 2003)⁸. Il faudrait procéder rapidement afin d'éviter que le substrat ne durisse avant d'être versé dans les récipients d'élevage. On tapote doucement les récipients sur les côtés et sur la table de travail pour éliminer les bulles d'air qui pourraient s'être formées pendant le mélange, pour

⁷ La qualité du plâtre de Paris peut varier. Si le plâtre dégage une odeur forte et que le taux de reproduction des acariens est faible, on devrait utiliser un nouveau lot de plâtre de Paris.

⁸ 120 g de plâtre de Paris, 15 g de charbon et 130 mL d'eau donnent suffisamment de substrat pour un récipient d'élevage de 16 × 11 × 5,5 cm (Becker-van Slooten et coll., 2003).

répartir également le substrat d'élevage, et pour supprimer les aspérités⁹. Il faudrait placer les récipients d'élevage sur une surface plane et laisser sécher le substrat à l'air pendant ≥ 3 h. Une fois le substrat durci, on ajoute de l'eau d'essai dans les récipients d'élevage, pratiquement jusqu'à saturation (il ne devrait pas y avoir d'eau surnageante). Si les récipients d'élevage préparés ne sont pas utilisés immédiatement, ils peuvent être entreposés à la température ambiante. Avant l'entreposage, il faudrait saturer le substrat avec de l'eau d'essai (on verse lentement ~ 1 cm d'eau d'essai sur le substrat préparé) afin d'éviter son assèchement pendant l'entreposage. Si le substrat s'assèche de manière excessive, il se tassera et se détachera des parois du récipient, créant ainsi un vide. Dans un tel cas, il faudrait éliminer le substrat, car les acariens se rassembleront et pondront des œufs le long des parois et au fond du récipient (ils seront alors inaccessibles). Il faudrait rincer le substrat avec de l'eau d'essai avant d'y déposer tout organisme. Pour rincer, il faudrait ajouter ~ 1 cm d'eau d'essai au substrat et frotter doucement la surface du bout du doigt (ganté) afin d'éliminer les aspérités. Le substrat devrait être rincé 3 fois. On peut vider l'eau en excès, éponger légèrement la surface avec un essuie-tout, et fermer hermétiquement les récipients avec les couvercles, après quoi les récipients sont prêts à être utilisés.

Une troisième option pour l'élevage consiste à combiner deux méthodes décrites précédemment (c'est-à-dire un substrat en plâtre de Paris ≥ 1 cm d'épaisseur recouvert d'une couche de ≥ 1 cm de sol)¹⁰.

Le pH d'un nouveau lot de sol ou de plâtre de Paris devrait être vérifié avant l'utilisation. Le pH du sol peut être mesuré en utilisant la méthode du CaCl_2

décrite ici. Dans le cas du plâtre de Paris, le pH peut être vérifié en plaçant un papier pH sur la surface humide du substrat. Le pH des deux substrats d'élevage devrait se situer entre 6,0 et 7,5.

Il faudrait réhydrater les récipients d'élevage avec de l'eau d'essai 1-2 fois par semaine pour maintenir le taux d'humidité (qui est optimal lorsque le plâtre de Paris reste humide). Pour la réhydratation, il suffit de vaporiser doucement la surface du sol à l'aide d'un brumisateur comme il convient ou d'ajouter plusieurs gouttes d'eau d'essai à l'aide d'une pipette ou d'un flacon pressable jusqu'à ce que l'eau commence à rester sur la surface du plâtre de Paris. Il faudrait prendre soin d'éviter la surhydratation (c.-à-d. il ne doit pas y avoir d'eau surnageante sur le substrat en plâtre de Paris ou dans le fond des bacs d'élevage sur un substrat de sol) et de ne pas blesser les acariens ou de ne pas souffler les acariens en dehors du récipient d'élevage pendant la réhydratation.

Les récipients doivent être aérés au moins une fois par semaine; toutefois, il est recommandé de les aérer deux fois par semaine et plus si on a déjà eu des problèmes de champignons dans les élevages. On peut aérer les élevages pendant la réhydratation hebdomadaire ou lors des processus d'alimentation deux fois par semaine en retirant simplement les couvercles pendant ≥ 1 min.

2.3.6 Alimentation

L'élevage réussi d'*O. nitens* repose sur l'utilisation de la levure sèche granulée ou de la levure de boulanger. On peut se procurer dans les épiceries la levure à utiliser comme nourriture pour les élevages. La levure Fleischmann's^{MC} est la marque qui a été utilisée avec succès dans la mise au point de la présente méthode (M. Jatar, Environnement et

⁹ Les bulles d'air laissent à la surface du substrat d'élevage des crevasses pouvant encourager les acariens à pondre des œufs. Pour favoriser la production d'œufs, on dépose sur le substrat des morceaux triangulaires de papier filtre enduits de plâtre de Paris ou une coiffe en plâtre de Paris (qu'on prépare en remplissant de plâtre une barquette de pesée en aluminium légèrement repliée, puis qu'on laisse durcir). Par ailleurs, une mince couche de matière organique (p. ex., sol ou litière de feuilles compostées) déposée sur la surface du substrat pourrait accroître la production d'œufs.

¹⁰ En plus d'améliorer potentiellement la production d'œufs, l'ajout de sol sur le substrat en plâtre de Paris pourrait prolonger la bonne santé de l'élevage. Cela pourrait également faciliter l'extraction des organismes de l'élevage, car les acariens se regroupent autour des tas de levure après avoir reçu de la nourriture, et le sol peut alors être facilement retiré de l'élevage aux fins d'extraction des acariens avec de la chaleur.

Changement climatique Canada, comm. pers., 2015); toutefois, d'autres marques peuvent être utilisées. La quantité de nourriture ajoutée à chaque récipient d'élevage dépend de la densité de population des acariens et de leur stade de développement. Cette quantité devrait donc être établie en fonction des observations et des notes prises au sujet de la nourriture qui a été consommée ou non précédemment.

La nourriture peut être divisée en plusieurs tas ou saupoudrée sur la surface du substrat d'élevage (c.-à-d. sol ou plâtre de Paris). Les tas facilitent le nettoyage de la levure non consommée, mais ils devraient être bien espacés pour que les acariens n'aient pas à aller loin pour trouver de la nourriture. Les acariens devraient être nourris deux fois par semaine, au moment de l'aération et de la réhydratation. On peut ôter les restants de levure non consommée (le cas échéant) avant d'ajouter la nouvelle levure¹¹. On devrait veiller à éviter toute apparition d'une quantité excessive de champignons et de bactéries dans les récipients d'élevage¹². Pour rendre la levure active, il faudrait l'ajouter après l'hydratation du substrat. On peut aussi activer la levure en l'hydratant avec quelques gouttes d'eau d'essai, en prenant soin de ne pas provoquer une hydratation excessive, car les acariens pourraient être pris au piège si la levure est trop humide.

2.3.7 Manipulation des organismes et entretien des élevages

Les acariens devraient être manipulés le moins possible pour éviter de les blesser et de les stresser inutilement. S'il est nécessaire de les manipuler, il faudrait procéder avec douceur, minutie et rapidité afin de réduire au minimum le stress subi par les animaux. On peut employer un pinceau fin pour transférer les acariens d'un récipient d'élevage ou

d'essai à un autre; toutefois, on doit se garder de blesser les organismes. On peut aussi transférer les acariens en tapotant doucement un récipient au-dessus d'un autre. Les animaux blessés ou apparemment stressés lors de la manipulation ne doivent pas servir aux essais et devraient être éliminés. Il est à noter que le comportement de toilettage se manifeste souvent pendant plusieurs minutes après la manipulation, mais cela ne signifie pas que l'animal est blessé.

Il est recommandé d'inspecter le contenu de chaque récipient d'élevage immédiatement avant chaque distribution de nourriture afin de déterminer l'état apparent des acariens et du substrat d'élevage. Il faudrait consigner dans un registre l'état apparent de l'élevage (organismes et substrat) au moment de chaque observation (v. 2.3.1).

Il faudrait limiter la densité de chargement des acariens dans chaque récipient d'élevage afin d'éviter la surpopulation et ses conséquences négatives sur la croissance et la reproduction des acariens et sur la santé de l'élevage. Dans le cas du substrat en plâtre de Paris, on suggère une densité de ~5-15 acariens adultes par cm², car, d'après les observations, les acariens se portent bien lorsqu'ils sont légèrement entassés (M. Jatar, Environnement et Changement climatique Canada, comm. pers., 2015). Dans le cas du sol, la densité est difficile à évaluer; toutefois, si le nombre de juvéniles en élevage commence à diminuer (p. ex., il n'y a que des adultes regroupés autour des tas de levure entre 24-48 heures après la distribution de nourriture), cela pourrait indiquer que la capacité de densité des bacs est atteinte et que le substrat d'élevage devrait être renouvelé (v. 2.3.9).

On devrait renouveler le substrat dans chaque récipient d'élevage selon les besoins et tous les

¹¹ Les restants de levure non consommée peuvent entraîner la formation excessive de populations de bactéries ou de champignons, ce qui pourrait être néfaste pour les élevages. Toutefois, il faut s'y prendre avec soin, car des acariens juvéniles peuvent fréquemment se trouver sur les restants de nourriture ou dessous.

¹² Pour éviter l'apparition d'une quantité excessive de champignons et de bactéries dans les récipients d'élevage, on peut procéder comme suit : utiliser de l'eau ultra pure (p. ex., de l'eau Milli-Q®) pour la préparation et

l'hydratation du substrat d'élevage, aérer les récipients d'élevage plus souvent (p. ex., ≥2 fois par semaine) et ôter tout restant de levure (Stämpfli et coll., 2005). Si la quantité de champignons ou de bactéries devient excessive dans l'un des récipients d'élevage, les acariens peuvent être attirés sur de nouveaux morceaux de plâtre de Paris avec quelques grains de nourriture fraîche, puis transférés sur un nouveau substrat d'élevage, ou bien le récipient d'élevage peut être éliminé.

4-6 mois, quelle que soit la densité des organismes. Dans le cas des acariens conservés sur du plâtre de Paris, on peut préparer de nouveaux récipients d'élevage et les y transférer par l'intermédiaire de coiffes en plâtre de Paris ou de morceaux sur lesquels de la nourriture a été déposée et laissée dans l'ancien récipient afin de les attirer¹³. Dans le cas des acariens conservés sur un substrat de sol, les élevages peuvent être renouvelés en extrayant du sol les acariens dans les bacs d'élevage existants à l'aide de la chaleur et en transférant les acariens sur un substrat d'élevage frais (v. 2.3.5)¹⁴. Quel que soit le type de substrat, il est possible de réduire la population d'acariens dans un récipient d'élevage surpeuplé en transférant une partie seulement de l'élevage (p. ex., 75 % des individus). Il est important que les nouveaux élevages contiennent un mélange d'organismes provenant de différents récipients d'élevage afin d'éviter les croisements consanguins. Le fait d'alterner entre un substrat en plâtre de Paris et un substrat de sol peut aider à maintenir la santé de l'élevage et à stimuler sa croissance. Il est recommandé de conserver les élevages d'acariens sur au moins deux types de substrats différents pour éviter la perte de l'élevage tout entier, dans l'éventualité où les organismes ne se développeraient pas sur l'un des types de substrat. Le changement de substrat ou l'ajout de matière organique (p. ex., fumier organique) à la surface du substrat d'élevage pourrait améliorer la santé de l'élevage et stimuler l'oviposition (ECCC, 2018).

Il faudrait surveiller la température ambiante dans l'installation d'élevage une fois par semaine et vérifier le taux d'humidité du substrat d'élevage au moment de l'aération hebdomadaire. Au besoin, les ajustements nécessaires devraient être apportés (v. 2.3.4 et 2.3.5).

¹³ Des coiffes en plâtre de Paris sur lesquelles on a déposé de la levure sont placées à la surface du récipient d'élevage. Une fois les acariens rassemblés sur les coiffes (c.-à-d. après 24-48 heures), on peut les déplacer dans un nouveau récipient d'élevage qui contient du substrat frais sur lequel on a déposé de la nourriture pour les attirer. Il est aussi possible de briser en morceaux le substrat en plâtre de Paris contenant les acariens et de le placer sur un nouveau substrat d'élevage contenant de la nourriture pour les attirer. Une fois les acariens transférés au nouveau substrat (c.-à-d. après 24-48 h), on peut ôter les morceaux de l'ancien substrat en plâtre de Paris.

2.3.8 Élevages synchrones destinés aux essais

Pour que les élevages donnent de bons résultats, il faut qu'ils produisent le nombre nécessaire d'organismes expérimentaux en bonne santé, à un stade de développement connu, ayant le même âge et la même taille. En outre, les organismes d'élevage doivent satisfaire à des indices de santé et de performance précis (v. 2.3.9). Les paragraphes suivants décrivent les procédures qu'il faudrait suivre pour obtenir des organismes expérimentaux du même âge (c.-à-d. adultes, âgés de 8 à 10 jours après l'exuviation jusqu'au stade adulte) aux fins des essais toxicologiques décrits dans le présent document.

Pour établir des élevages synchrones, on choisit de nouveaux adultes à partir d'extractions d'élevages existants sur un substrat en plâtre de Paris ou un substrat de sol et on les transfère dans des récipients frais contenant du substrat en plâtre de Paris. Comme il est nécessaire de visualiser clairement les acariens choisis pour la synchronisation, ils doivent être sélectionnés parmi les organismes conservés sur un substrat en plâtre de Paris (p. ex., parmi les élevages conservés sur un substrat en plâtre de Paris, ou les élevages sur un substrat de sol qui ont été extraits à l'aide de la chaleur et placés sur un substrat en plâtre de Paris au fond du dispositif d'extraction à la chaleur; v. annexe G). Les nouveaux adultes sont identifiés d'après l'apparence de leur tégument, dont la couleur varie du rose à l'orange clair ou ambre et qui est presque translucide (v. les images à l'annexe E). Les acariens doivent être sélectionnés et ajoutés à l'élevage synchrone pendant une période de ≤ 3 jours pour atteindre la quantité souhaitée. Une fois que le nombre requis d'acariens a été recueilli, l'élevage doit être nourri et hydraté conformément à la méthode décrite pour

¹⁴ Pendant l'extraction à la chaleur, les acariens sont recueillis sur un substrat en plâtre de Paris dans la moitié inférieure du dispositif d'extraction à la chaleur (v. annexe G). Les acariens peuvent ensuite être transférés du récipient d'extraction à la chaleur dans le nouveau sol en tapotant le récipient d'extraction à la chaleur au-dessus d'un bac d'élevage contenant du substrat frais ou en retirant la base en plâtre de Paris du récipient d'extraction à la chaleur et en la posant directement sur un substrat d'élevage frais comportant de la nourriture pour les attirer. Une fois les acariens transférés au nouveau substrat (c.-à-d. après 24-48 h), on peut ôter la base en plâtre de Paris.

l'élevage principal (v. 2.3.5 et 2.3.6) tout en le laissant se développer pendant 8-10 jours avant d'être utilisé pour les essais.

Tous les acariens élevés en laboratoire aux fins des essais visant à mesurer les effets d'une substance ou matière toxique (y compris un toxique de référence) sur leur reproduction devraient être acclimatés en laboratoire avant la mise en route desdits essais, le plus possible dans les conditions de l'essai toxicologique (v. 4.3). Pendant la période de synchronisation des élevages, les conditions de température devraient être identiques à celles utilisées dans les essais, et les acariens doivent être nourris avec de la levure sèche (v. 2.3.4, 2.3.6 et 4.3).

2.3.9 Indices de santé et de performance

Chaque récipient d'élevage devrait faire l'objet d'une vérification au moins une fois par semaine, vérification pendant laquelle la performance de l'élevage devrait être surveillée et consignée (v. 2.3.1, 2.3.6 et 2.3.7). On devrait évaluer régulièrement et rajuster au besoin les méthodes et procédures utilisées pour entretenir l'élevage de manière à préserver ou à restaurer sa santé. Si l'élevage semble en mauvaise santé ou atypique lors d'une vérification hebdomadaire (ou plus fréquente), il faudrait le vérifier quotidiennement pour s'assurer qu'il ne se produit pas une « mortalité en cascade » (augmentation exponentielle du taux de mortalité au fil du temps). Les élevages sont considérés comme étant en bonne santé si des individus *O. nitens* de tailles différentes se déplacent activement à la surface du substrat ou sont regroupés autour des tas de levures lors de la distribution de nourriture¹⁵, et s'il y a une faible incidence ($\leq 10\%$) de non-coloration des organismes (opaque avec une apparence « laiteuse ») (v. la note de bas de page n° 6 dans la section 2.3.1 et l'annexe E).

Les techniciens d'ECCC et certains participants à l'étude interlaboratoire ont signalé avoir parfois trouvé des acariens opaques et d'apparence « laiteuse » (ECCC, 2018, 2019). L'ampleur et la fréquence de cette occurrence varient, mais semblent augmenter si la densité de l'élevage grandit

excessivement pour les besoins de l'essai. On a émis l'hypothèse que cette différence de couleur chez les acariens oribates pourrait être un défaut génétique, un résultat du stress ou un symptôme de malnutrition (Woodring et Cook, 1962; Taberly, 1987; ECCC, 2018). S'ils sont observés dans les élevages, ces acariens devraient être éliminés et ne doivent pas être utilisés comme organismes expérimentaux, car ils ne se reproduisent pas pendant les essais (v. l'exemple photographique à l'annexe E; ECCC, 2018).

Il existe deux possibilités pour satisfaire aux exigences minimales en matière d'assurance de la qualité lorsqu'il est question d'utiliser une substance de référence connue (p. ex., l'acide borique). La première option consiste à effectuer deux essais toxicologiques de référence à concentrations multiples par an (c.-à-d. une fois tous les six mois) à l'aide d'organismes synchrones provenant des mêmes élevages que ceux composés des organismes expérimentaux pour les essais définitifs de toxicité d'un sol. La deuxième option consiste à inclure une concentration témoin positive avec chaque essai définitif de toxicité sur les acariens en utilisant les mêmes organismes expérimentaux synchrones que ceux utilisés dans l'essai définitif (v. 4.9 pour plus de détails). Tous les essais effectués avec le ou les toxiques de référence devraient être réalisés dans les conditions et selon les modes opératoires exposés en 4.9. 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) d'après la performance des organismes expérimentaux dans le *sol témoin négatif* sont décrits en 4.4.

Un laboratoire qui effectue régulièrement des essais de toxicité avec des acariens pourrait trouver utile de surveiller les données sur le nombre de *descendants* obtenus dans le sol témoin négatif, comme mesure de la santé et de la performance de l'élevage. Un graphique de ces données en fonction du temps peut révéler des problèmes de reproduction attribuables au régime alimentaire ou à d'autres conditions auxquelles les élevages sont exposés (G. Stephenson, AquaTerra Environmental, comm. pers., 2016).

¹⁵ Si le nombre de juvéniles observés un ou deux jours après la distribution de nourriture commence à diminuer (c.-à-d. que seuls les adultes sont regroupés autour des tas de levure), cela pourrait indiquer un déclin de la santé de

l'élevage et la nécessité de renouveler l'élevage (J. Princz, Environnement et Changement climatique Canada, comm. pers., 2019).

Section 3

Système d'essai

3.1 Installations et appareils

Les essais doivent être réalisés dans une enceinte à atmosphère contrôlée ou une installation équivalente dans laquelle on peut contrôler adéquatement la température et l'éclairage (v. 4.3). L'installation d'essai devrait être bien aérée afin de protéger le personnel des expositions aux émanations néfastes et elle devrait être isolée de toute perturbation physique ou de tout contaminant susceptible de nuire aux organismes expérimentaux. La zone de travail réservée à la préparation des *sols d'essai* devrait être dotée d'une hotte et être ventilée adéquatement.

Pour prévenir toute contamination, il faut que l'installation d'essai soit isolée de la zone d'élevage des acariens (v. 2.3). En outre, l'installation d'essai devrait être éloignée des endroits où les échantillons sont entreposés ou préparés afin d'éviter tout risque de contamination des récipients d'essai et de leur contenu à partir de ces sources. Le système de ventilation devrait être conçu et utilisé de façon à empêcher l'air de l'installation d'essai de contaminer les enceintes d'élevage, et il devrait faire l'objet d'inspections à cet égard. L'air repris dans la zone de manipulation et d'entreposage des échantillons ou dans celle réservée au traitement ou à l'analyse des substances chimiques ne devrait pas être recirculé dans la partie du laboratoire réservée aux essais.

Tout matériau de construction susceptible d'entrer en contact avec les organismes, le sol, l'eau ou les récipients d'essai à l'intérieur de l'installation d'essai doit être non toxique (v. 2.3.2) et devrait réduire au minimum la sorption de substances chimiques. On devrait utiliser, dans toute la mesure du possible, le verre borosilicaté, le nylon, le polyéthylène ou le polystyrène haute densité, les polycarbonates, les plastiques fluorocarbonés, le Téflon^{MC}, le Nalgène^{MC}, la porcelaine, la fibre de verre et l'acier inoxydable 316 pour réduire au

minimum la sorption et le lessivage des substances chimiques. On doit éviter les matériaux toxiques, dont le cuivre, le zinc, le laiton, le métal galvanisé, le plomb et le caoutchouc naturel.

L'installation d'essai doit comporter les instruments de base exigés pour surveiller la qualité (p. ex., température, pH) du sol d'essai et de l'*eau d'essai* (*d'hydratation*) qui y est associée. En outre, le laboratoire devrait être équipé d'instruments permettant de procéder à des analyses rapides et précises de la teneur en humidité des sols d'essai. L'équipement requis comprend une étuve pouvant être réglée à 105 °C pour le séchage des sols, une balance de pesée précise à 0,1 mg près et un pH-mètre. Le matériel de protection comprend un respirateur avec filtre contre la poussière, des gants, des vêtements de laboratoire et des lunettes de protection, et il doit être porté lorsqu'on prépare les mélanges et les aliquotes de sol d'essai.

Tous les récipients d'essai, tout l'équipement et toutes les fournitures susceptibles d'entrer en contact avec les sols de site, les sols d'essai, l'eau d'essai (*d'hydratation*), les *solutions mères* ou les solutions d'essai doivent être propres et rincés avant usage à l'*eau désionisée* ou *distillée* (c.-à-d. l'eau d'essai). On devrait laver après usage toutes les fournitures non jetables. On recommande la méthode de nettoyage suivante (EC, 2004a, 2005a, 2013a, 2014a)¹⁶ :

1. trempage dans l'eau du robinet (avec ou sans détergent) pendant 15 min, puis récurage avec un détergent ou lavage au lave-vaisselle automatique;
2. double rinçage à l'eau du robinet;
3. rinçage soigneux à l'acide nitrique (HNO₃) ou chlorhydrique (HCl) (qualité sans métal) frais

¹⁶ On devrait appliquer les étapes 1 à 4 de la méthode de nettoyage s'il y a un risque de contamination par les métaux, les étapes 1, 2, 5, 6 et 7 s'il y a un risque de contamination

par des matières organiques; et toutes les étapes s'il y a un risque de contamination par ces deux sources.

dilué (10 % en volume¹⁷) afin d'éliminer le tartre, les métaux et les bases;

4. double rinçage à l'eau désionisée (ou autre eau d'essai);
5. rinçage unique à l'acétone non diluée de qualité pesticide afin d'éliminer les composés organiques, et à l'hexane de qualité « réactif » (p. ex., qualité CLHP, pureté de $\geq 98,5$ %) pour éliminer les résidus huileux (travailler sous une hotte)¹⁸;
6. après avoir laissé le solvant organique se volatiliser des récipients sous la hotte, nouveau lavage avec du détergent (récurer au besoin);
7. triple rinçage à l'eau désionisée (ou autre eau d'essai).

Les récipients d'essai et les appareils susceptibles d'entrer en contact avec le sol ou l'eau d'essai (d'hydratation) devraient être rincés à fond à l'eau d'essai avant d'être utilisés.

3.2 Essais initiaux et essais définitifs

3.2.1 Essais initiaux

Avant de procéder pour la première fois à des essais définitifs de toxicité d'un sol, il est recommandé que le laboratoire effectue ≥ 5 essais de performance témoins sur un ou des échantillons de sol naturel non contaminé ou de *sol artificiel* qu'il utilisera (ou envisage d'utiliser) comme sol témoin négatif dans un ou des essais définitifs de toxicité d'un sol (v. 3.3). De plus, ≥ 5 essais avec un toxique de référence devraient être exécutés sur un ou des échantillons du sol témoin négatif artificiel ou naturel que le laboratoire entend utiliser en parallèle avec les essais définitifs (v. 4.9). Ces essais initiaux sont recommandés pour confirmer qu'un laboratoire spécifique peut obtenir, pour l'espèce expérimentale choisie et conformément aux conditions et procédures d'élevage décrites dans le présent

document (v. 2.3), une performance acceptable dans ce sol témoin (v. 3.3).

Les conditions et modes opératoires retenus pour exécuter ces essais initiaux sur un sol témoin négatif devraient être identiques et conformes à ceux décrits à la section 4. Dans le cas des essais initiaux avec un ou des toxiques de référence, les conditions et modes opératoires devraient être identiques et conformes à ceux décrits en 4.9. Chaque essai sur un sol témoin négatif ou avec un ou des toxiques de référence devrait être effectué avec un lot différent d'organismes expérimentaux de la même espèce provenant de la même source.

Les données des essais de performance témoins ($n \geq 5$) doivent montrer que les critères de validité des essais (v. 4.4) peuvent être satisfaits pour l'espèce prévue et pour le sol naturel ou artificiel qu'on entend utiliser comme sol témoin négatif dans les essais définitifs. La méthode recommandée pour mettre en parallèle les données des essais initiaux ($n \geq 5$) consiste à calculer et à comparer la grandeur du CV pour les séries d'essais respectives et les valeurs des paramètres (v. 4.9).

3.2.2 Essais définitifs

Les récipients d'essai qui seront utilisés dans les essais définitifs doivent être inertes aux substances d'essai et de référence ou aux mélanges de contaminants (en d'autres termes, ces substances ou mélanges ne devraient pas adhérer aux récipients d'essai ou réagir de quelque façon que ce soit avec les récipients). Les récipients devraient être assez grands pour permettre la survie et la reproduction des acariens pendant la durée de l'essai. Des flacons en verre d'une capacité de ~ 30 mL (diamètre interne de $\sim 2,6$ cm) ont été utilisés avec succès comme récipients d'essai dans l'élaboration de la présente méthode d'essai; toutefois, des récipients ayant des dimensions et des volumes différents peuvent être utilisés. Chaque récipient doit être nettoyé soigneusement avant et après emploi; on doit aussi le rincer à fond avec de l'eau désionisée ou une autre eau d'essai avant de s'en servir. Chaque récipient d'essai devrait être muni d'un couvercle en plastique

¹⁷ Pour préparer une solution d'acide titrant 10 %, ajouter lentement 10 mL d'acide concentré à 90 mL d'eau désionisée.

¹⁸ **Il n'est pas** recommandé de rincer l'équipement ou les récipients en plastique ou en Plexiglas^{MD} avec de l'acétone ou de l'hexane, car ces solvants peuvent dépolir et attaquer le plastique et lui faire perdre sa transparence.

ou en métal muni d'un petit trou pour permettre les échanges gazeux.

3.3 Sol témoin négatif

Chaque essai de toxicité d'un sol doit comporter un sol témoin négatif parmi les *traitements* expérimentaux. Un sol témoin négatif est essentiellement exempt de tout contaminant qui pourrait nuire à la performance des acariens pendant l'essai. L'utilisation d'un sol témoin négatif fournit une mesure de l'acceptabilité de l'essai, une preuve de la santé et d'une performance adéquate des organismes expérimentaux, l'assurance que les conditions et modes opératoires sont appropriés et une base pour l'interprétation des données obtenues avec les sols d'essai.

Dans un essai de toxicité d'un sol, on peut utiliser un sol naturel non contaminé ou un sol artificiel comme sol témoin négatif. Les points à prendre en considération dans le choix d'un sol témoin négatif approprié comprennent le plan de l'étude, les caractéristiques physicochimiques du ou des sols d'essai et la disponibilité d'un sol naturel non contaminé présentant des propriétés acceptables¹⁹. Pour les essais définitifs sur des échantillons de sol prélevés dans la forêt boréale ou la taïga, il est recommandé d'utiliser comme sol témoin négatif un sol naturel non contaminé. Quel que soit le type de sol, on doit également posséder des preuves expérimentales que le sol témoin négatif choisi permettra de satisfaire aux critères de validité de l'essai établis dans le présent document de manière régulière et fiable (v. 4.4).

La méthode d'essai biologique décrite ici a été élaborée et mise à l'essai avec 11 sols témoins négatifs présentant diverses caractéristiques physicochimiques (EC, 2010, 2013b, 2014b;

Hennessy, 2010; Princz et coll., 2010, 2012, 2018; Princz, 2014; Ritchie et coll., 2017; ECCC, 2018, 2019). Ces sols non contaminés incluaient deux sols artificiels, quatre sols agricoles naturels (c.-à-d. deux sols sablo-loameux de l'Alberta et du Québec, un sol argilo-loameux de l'Ontario et un sol sablo-loameux LUFA d'Allemagne), et cinq sols recueillis dans les écozones de la forêt boréale et de la taïga au Canada (c.-à-d. deux podzols humo-ferriques gleyifiés de Terre-Neuve et de l'Ontario, un luvisol gris foncé et un brunisol eutrique orthique de la Saskatchewan, ainsi qu'un gleysol humique régosolique de l'Alberta). Ces sols présentaient des compositions différentes en ce qui a trait aux caractéristiques physicochimiques susceptibles d'influer sur le devenir et les effets des contaminants. Tous les sols prélevés sur le terrain venaient de zones n'ayant fait l'objet d'aucun épandage direct de pesticides au cours des années précédentes et, par conséquent, étaient considérés comme « non contaminés ». L'origine et les caractéristiques physicochimiques de ces sols naturels sont décrites en détail à l'annexe D. Les critères de validité des essais (v. 4.4) pour *O. nitens* sont fondés sur des données relatives à la performance de ces organismes dans un sol témoin négatif, données qui ont été obtenues pour chacun des divers sols (ECCC, 2018). Pendant l'élaboration de la méthode d'essai, on a observé une tendance à la baisse du nombre de juvéniles produits dans certains des horizons pédologiques de subsurface (c'était souvent le cas, mais non exclusivement, des sols ayant un faible pourcentage de MO).

3.3.1 Sol naturel

Le sol témoin négatif peut être un sol naturel prélevé sur un site non contaminé dont on sait qu'il n'a fait l'objet d'aucun épandage de pesticides ou d'engrais depuis ≥ 5 ans. Les acariens dont on a besoin pour démarrer un élevage (v. 2.2) pourraient provenir du même endroit que ce sol témoin négatif.

¹⁹ Une page du site Web du Conseil canadien des ministres de l'environnement (CCME) est consacrée aux Recommandations canadiennes pour la qualité de l'environnement ainsi que pour la qualité des sols (www.ccme.ca). L'information qu'on y trouve est utile lorsqu'on examine les données analytiques [p. ex., les valeurs pour les métaux ou les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)] relatives à des échantillons de sol prélevés sur le terrain, dans un endroit envisagé comme source de sol naturel pouvant être utilisé comme sol

témoin négatif dans des essais toxicologiques. Ce site Web et les liens connexes aideront les expérimentateurs dans l'examen des caractéristiques physicochimiques de sols naturels présumés non contaminés qu'ils envisagent d'utiliser comme sol témoin négatif dans des essais de toxicité des sols. On peut également communiquer avec le CCME par téléphone (1-204-948-2090) ou par courriel (info@ccme.ca).

Tous les échantillons de sol naturel choisis pour être éventuellement utilisés comme sol témoin négatif dans des essais de toxicité d'un sol (ainsi que les échantillons de *sol de référence* possible) doivent être analysés par rapport aux caractéristiques physicochimiques suivantes :

- granulométrie (pourcentage de sable, de limon et d'argile)
- teneur en *carbone organique total (COT)*²⁰
- TMO²⁰
- pH
- *conductivité*
- teneur en humidité
- *capacité de rétention d'eau (CRE)*
- *capacité d'échange cationique (CEC)*

On devrait aussi procéder aux analyses suivantes :

- anions et cations majeurs (Na⁺, K⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Al³⁺, S²⁻, Cl⁻)
- azote total, nitrate (NO₃⁻), nitrite (NO₂⁻) et ammonium (NH₄⁺)
- phosphore phytodisponible ou total
- potassium phytodisponible ou total
- ratio C/N

Il est recommandé de procéder aux analyses préalables suivantes pour confirmer que le sol témoin négatif ou le sol de référence ne sont pas contaminés :

- insecticides organophosphorés
- insecticides organochlorés
- herbicides
- métaux
- hydrocarbures pétroliers (y compris les HAP)
- autres contaminants préoccupants propres au site ou à la région

Les concentrations des pesticides et des métaux ne devraient pas excéder celles établies par le CCME pour la qualité des sols, le cas échéant (v. la note de

bas de page n° 19). Si des organismes indigènes sont présents dans l'échantillon ou les échantillons de sol naturel ou qu'ils soulèvent des problèmes à tout moment (p. ex., pendant l'entreposage ou les essais), il faudrait prendre note de ce fait (p. ex., fournir une description physique et indiquer leur nombre estimatif) et enlever si possible ces organismes à la main (par tamisage, notamment). Par ailleurs, la plupart des organismes indigènes (les acariens prédateurs étant ici particulièrement préoccupants) peuvent être tués par au moins un ou plusieurs cycles de gel et de dégel si l'on soupçonne qu'ils sont trop petits pour être éliminés à la main (v. la note de bas de page n° 75 du présent document et 5.6.6 de EC, 2012). Si les résultats des essais biologiques initiaux et des analyses physicochimiques sont satisfaisants, on peut prélever un plus gros échantillon de ce sol naturel, le laisser sécher à l'air jusqu'à ce qu'il ait une teneur en humidité comprise entre 10 et 20 %, le tamiser avec un tamis à grosses mailles (4-10 mm)²¹, le transférer dans des seaux en plastique propres, soigneusement rincés, et l'entreposer dans l'obscurité à 4 ± 2 °C jusqu'à ce qu'on en ait besoin. On ne devrait pas utiliser de seaux en plastique pour le prélèvement et l'entreposage des échantillons de sol s'il y a un risque de lixiviation des composantes chimiques du plastique dans le sol.

3.3.2 Sol artificiel

Le sol témoin négatif peut être un sol artificiel préparé en laboratoire. L'utilisation d'un sol artificiel permet de travailler avec un matériel uniforme et normalisé; cette façon de procéder est également avantageuse dans les essais visant à mesurer la toxicité de substances chimiques dont on enrichit un sol témoin négatif (section 6).

Conformément aux recommandations d'Environnement Canada (EC, 2004a, 2005a, 2013a, 2014a), on devrait employer les trois ingrédients suivants pour préparer le sol artificiel qui sera utilisé

²⁰ On peut calculer le COT d'après la TMO en multipliant cette dernière par une constante du sol (AESAs, 2001). Toutefois, comme la relation entre le COT et la matière organique varie légèrement d'un sol à un autre, la teneur en COT devrait être déterminée également au moyen d'analyses de laboratoire.

²¹ Les tamis plus poreux (p. ex., 6-10 mm) peuvent être nécessaires pour les sols à forte teneur en matière organique. Des directives supplémentaires sur les exigences en matière de tamisage, y compris la sélection de la taille appropriée des tamis, sont fournies dans EC (2012).

dans la présente méthode d'essai biologique (en fonction de la masse sèche) :

- i) 10 % de tourbe (*Sphagnum* sp.) séchée à l'air et tamisée (avec un tamis à mailles de 2 mm, p. ex.)
- ii) 20 % de kaolin dont les particules sont de <40 µm
- iii) 70 % de sable siliceux de « qualité 70 »

Les ingrédients (les pourcentages ci-dessus sont exprimés en tant que fraction de la masse sèche) à l'état sec devraient être mélangés avec soin à l'aide d'un agitateur mécanique ou manuellement (porter des gants)²². On devrait ajouter du CaCO₃ de qualité « réactif » au mélange sec, en quantité suffisante pour que le pH [mesuré à l'aide d'une méthode de mise en suspension dans une solution de chlorure de calcium (CaCl₂); v. 4.6] du sol artificiel, une fois hydraté, se situe entre 6,0 et 7,5²³. On devrait hydrater ensuite le mélange graduellement à l'aide d'eau d'essai (eau désionisée ou distillée) jusqu'à ce que sa teneur en humidité soit de ~20 % (ce qui correspond à ~28 % de la CRE du sol)²⁴, tout en

continuant de mélanger jusqu'à obtention d'une couleur et d'une texture uniformes. Au besoin, on ajoutera au mélange hydraté une quantité supplémentaire de CaCO₃ de qualité « réactif » en quantité suffisante pour maintenir le pH dans la plage de 6,0-7,5. Les échantillons de sol artificiel dont on a ajusté le pH devraient être entreposés dans l'obscurité, à 20 ± 2 °C, pendant ≥3 jours, avant d'être utilisés dans un essai de toxicité afin que le pH ait le temps de s'équilibrer. Par la suite, ces échantillons peuvent être entreposés à 4 ± 2 °C. Lorsque le sol artificiel entreposé doit être utilisé dans un essai toxicologique, il faudrait en hydrater de nouveau la quantité appropriée, à l'aide d'eau d'essai, jusqu'à obtention d'une teneur en humidité équivalant à ~70 % de la CRE ou jusqu'à ce qu'il ait la texture optimale pour l'essai (c.-à-d. une consistance grumeleuse homogène avec des grumeaux de ~1-3 mm de diamètre; v. 5.3).

Les échantillons de sol artificiel choisis pour être éventuellement utilisés comme sol témoin négatif dans des essais de toxicité d'un sol doivent être analysés par rapport aux caractéristiques physicochimiques suivantes :

²² Il est recommandé de commencer à mélanger les ingrédients secs (pour incorporer le CaCO₃) à l'aide d'un agitateur mécanique. Il faudrait continuer à mélanger à la main gantée afin que tout le sol, y compris dans les coins du récipient, soit bien mélangé. Le personnel doit prendre les précautions nécessaires pour éviter toute inhalation des poussières et tout contact avec ces ingrédients.

²³ La quantité de CaCO₃ requise pour ajuster le pH du sol artificiel dans la plage indiquée dépend de la nature (c.-à-d. de l'acidité) des ingrédients (en particulier de la tourbe *Sphagnum* sp.). Entre 10 et 30 g de CaCO₃ par kilogramme de tourbe pourraient suffire. Sans ajout de CaCO₃, le sol artificiel fraîchement préparé peut avoir un pH de seulement 4,5. Lorsqu'on ajuste le pH, il faudrait viser un pH de 7,0-7,5, car le pH du sol artificiel baisse légèrement (à 6,5-7,0), en règle générale, pendant la période d'équilibration de 3 jours, avant de se stabiliser. Il faudrait vérifier régulièrement (p. ex., aux 2 semaines) le pH des échantillons de sol artificiel entreposés afin de vérifier qu'il n'a pas trop varié; des ajustements devraient être effectués en y ajoutant au besoin du CaCO₃ (AquaTerra, 1998; G. Stephenson, comm. pers., 2001). On peut également entreposer un mélange de sol artificiel sec; ce mélange sera ensuite hydraté partiellement jusqu'à ce qu'il ait une teneur en humidité de ~20 %, entreposé à 20 ± 2 °C pendant ≥3 jours, puis de nouveau hydraté à

~70 % de sa CRE (ou jusqu'à ce que la texture soit optimale pour l'essai) quand on voudra l'utiliser dans un essai de toxicité. Lorsqu'on entrepose un sol artificiel sec, il faut l'hydrater partiellement (jusqu'à ~20 % d'humidité) et le laisser reposer un certain temps (≥3 jours) afin que le pH se stabilise dans la plage recommandée dans la présente méthode pour un sol artificiel entreposé partiellement hydraté. Dans cette méthode facultative, il est nécessaire d'entreposer temporairement le sol artificiel partiellement hydraté afin de pouvoir ajouter la quantité d'eau (et, dans certains cas, de solution chimique) nécessaire pour obtenir le pH et la teneur en humidité (c.-à-d. ~70 % de la CRE) requis pour un sol d'essai artificiel. On considère qu'il est préférable d'entreposer le sol artificiel partiellement hydraté, plutôt que sec, car cela permet au personnel du laboratoire de l'hydrater plus rapidement pour obtenir la teneur en humidité voulue (~70 % de la CRE) tout en veillant à l'équilibre du pH, en plus de réduire le temps nécessaire à la stabilisation du pH associée à l'entreposage du sol artificiel sec.

²⁴ Le pourcentage d'hydratation peut devoir être ajusté à la hausse ou à la baisse selon le type de tourbe utilisé pour la préparation du sol artificiel.

- granulométrie (pourcentage de sable, de limon et d'argile)
- teneur en carbone organique total (COT)²⁰
- TMO²⁰
- pH
- conductivité
- teneur en humidité
- capacité de rétention d'eau (CRE)
- capacité d'échange cationique (CEC)

Des analyses supplémentaires, telles que celles décrites pour les sols naturels (v. 3.3.1) peuvent également être effectuées, au besoin.

3.4 Sol témoin positif

Il est recommandé d'inclure un ou des échantillons de *sol témoin positif* dans chaque série d'essais de toxicité d'un sol avec des acariens afin de faciliter l'interprétation des résultats des essais. On s'efforcera de choisir, comme sol témoin positif, un sol toxique qui provoquera chez les organismes expérimentaux une réponse prévisible, c'est-à-dire une réponse observée dans des essais de toxicité réalisés antérieurement avec cette matière. Le sol témoin positif peut être un échantillon de sol témoin négatif enrichi avec un toxique de référence pour lequel on dispose de données historiques concernant sa toxicité pour des acariens, mesurée dans des conditions et selon des modes opératoires précis. Aux fins de la présente méthode d'essai, on doit utiliser un ou des toxiques de référence dans le cadre d'un essai à concentrations multiples ou en tant que *réplicats* d'un sol témoin positif (c.-à-d. à une concentration spécifique) lorsqu'on évalue la sensibilité des organismes expérimentaux ainsi que la précision et la fiabilité des résultats obtenus par le laboratoire avec cette matière (v. 4.9). On peut également inclure dans les essais un échantillon de sol témoin négatif (naturel ou artificiel; v. 3.3) enrichi expérimentalement (section 6) avec une ou des substances chimiques toxiques préoccupantes lorsqu'on évalue l'échantillon ou les échantillons de sol d'essai, à une concentration toxique pour *O. nitens* utilisée conformément à la méthode d'essai biologique décrite ici. Dans certains cas, on pourrait

inclure un sol témoin positif composé d'un échantillon fortement contaminé de sol ou de boues prélevé sur le terrain, qui s'est révélé systématiquement toxique pour des acariens dans des essais réalisés selon la présente méthode²⁵.

3.5 Sol de référence

Un ou des échantillons de sol de référence pourraient être inclus dans un essai visant à évaluer la toxicité d'un sol pour des acariens. Le type et la nature de l'échantillon ou des échantillons de sol utilisés comme sol de référence dans une étude donnée dépendent du schéma expérimental et des objectifs de l'étude. Si l'étude porte sur la toxicité d'échantillons de sol prélevés sur un site contaminé ou susceptible d'être contaminé, on pourrait utiliser, comme sol de référence, un ou des échantillons de sol prélevés sur un site non contaminé dont les propriétés physicochimiques (p. ex., teneur en carbone organique, TMO, granulométrie, texture, pH, conductivité) concordent le plus étroitement possible avec celles de l'échantillon ou des échantillons du sol d'essai (contaminé). Idéalement, le lieu de prélèvement du sol de référence se trouve près du ou des sites d'où proviennent les échantillons de sol d'essai, mais il est éloigné de la ou des sources de contamination. Un sol de référence non contaminé prélevé sur le terrain et situé près du ou des sites d'essai pourrait également être choisi si des essais antérieurs avec des acariens ont révélé qu'il n'est pas toxique et qu'il possède des caractéristiques physicochimiques comparables à celles du sol d'essai. Les sols de référence de la forêt boréale et de la taïga doivent être échantillonnés par *horizon pédologique* dans toute la mesure du possible. Chaque échantillon doit ensuite être entreposé et mis à l'essai individuellement (en d'autres termes, chaque horizon doit être traité comme un échantillon distinct) (v. 5.1 et EC, 2012). On pourrait soumettre un ou des échantillons non dilués d'un sol de référence prélevé sur le terrain à un essai de détermination de leurs effets toxiques, ou mélanger ce sol avec un ou des échantillons de sol d'essai et de référence pour préparer la gamme de concentrations à inclure dans un essai à

²⁵ Si le sol témoin positif est un échantillon fortement contaminé de sol prélevé sur le terrain, il est important que son potentiel toxique soit stable dans le temps (c.-à-d. que l'échantillon soit assez ancien pour que sa

biodisponibilité se soit stabilisée).

concentrations multiples²⁶ (v. 3.6, 4.1 et 5.3). On ne devrait pas prélever d'échantillons de sol de référence dans des sites dont on sait qu'ils ont fait l'objet d'épandages de pesticides ou d'engrais au cours des cinq dernières années ou plus.

L'expérimentateur pourrait choisir d'inclure un ou des échantillons de sol artificiel comme sol de référence dans des essais particuliers, notamment dans des essais à concentrations multiples sur des sols de site ou des *sols enrichis avec une substance chimique*, afin d'étudier l'influence de certaines caractéristiques physicochimiques (p. ex., un certain nombre de sols de référence artificiels préparés pour fournir une gamme de valeurs en regard de la texture ou de la TMO; Sheppard et Evenden, 1998; Stephenson et coll., 2002) sur la toxicité d'un sol de site contaminé ou d'un sol enrichi avec une substance chimique. On pourrait aussi utiliser à cette fin des échantillons multiples de sol non contaminé prélevés sur le terrain à divers endroits, qui présentent une ou des caractéristiques physicochimiques très différentes. Dans ce cas, il faudrait inclure dans l'essai une portion non diluée de chaque sol de référence utilisé pour préparer une série de concentrations du sol d'essai.

Chaque essai comportant un ou des échantillons de sol de référence doit inclure un échantillon de sol témoin négatif (v. 3.3). Par contre, pour certains essais (comportant, p. ex., une série de concentrations de sol enrichi avec une substance chimique, préparée avec un sol témoin négatif artificiel ou naturel), il n'est pas nécessaire d'inclure un échantillon de sol de référence. Pour les essais sur un sol prélevé sur le site à l'étude, l'approche à privilégier aux fins des comparaisons consiste à inclure un ou des échantillons de sol de référence provenant d'un site voisin (v. 5.6); la décision de diluer un sol de site avec un sol de référence (plutôt qu'avec un sol témoin négatif) au cours de la préparation de la série de concentrations en vue d'un essai à concentrations multiples dépend des objectifs de l'étude.

3.6 Sol d'essai

La présente méthode d'essai biologique a été conçue pour mesurer la toxicité d'un ou de plusieurs échantillons ou mélanges de sol contaminé ou susceptible d'être contaminé (sol d'essai) avec des acariens utilisés comme organismes expérimentaux. L'échantillon ou les échantillons de sol d'essai peuvent être constitués soit de sol prélevé sur un site industriel ou autre site préoccupant, soit de biosolides industriels ou urbains (p. ex., déblais de dragage, boues provenant d'une usine d'épuration des eaux usées urbaines, compost, fumier) dont on envisage l'épandage sur le sol. Un échantillon de sol d'essai prélevé sur le terrain pourrait être soumis à un essai à concentration unique (c.-à-d. sans aucune dilution, généralement) ou à un essai de toxicité à concentrations multiples qu'on prépare en mélangeant des quantités mesurées de sol d'essai avec un sol témoin négatif ou un sol de référence (v. 5).

Le fait de prélever des échantillons de sol par horizon permet de tenir compte de la stratification de la contamination attribuable, en partie, à la spéciation des contaminants et à leur mobilité résultante (EC, 2012). C'est pourquoi il faut prélever par horizon les échantillons de sol de référence et de sol contaminé provenant des écozones de la région boréale ou de la taïga. Les sols prélevés par horizon doivent être traités comme des échantillons individuels et mis à l'essai séparément (v. 4.1). L'échantillonnage des sols dont les horizons pédologiques sont indistincts (p. ex., dont les horizons superficiels ont été mélangés ou perturbés par des activités anthropiques) devrait se faire en fonction de la profondeur (v. 5.1). Le sol d'essai pourrait aussi être constitué d'une ou de plusieurs concentrations d'un sol enrichi avec une substance chimique, qu'on prépare en laboratoire en mélangeant une ou des substances chimiques avec un sol témoin négatif, un sol de référence, ou un sol de site (v. 6). La section 5 fournit des conseils sur le prélèvement, la manipulation, les analyses et les essais liés aux sols prélevés sur le terrain.

²⁶ Il est également possible de préparer cette gamme de concentrations à l'aide d'un sol témoin négatif. Une telle décision pourrait être prise si on sait que les sols de référence envisagés ne seront probablement pas toxiques dans l'essai prévu ou si on veut préparer une gamme de

concentrations de sol d'essai avec un sol non contaminé dont les caractéristiques (p. ex., texture, TMO) concordent étroitement avec celles du sol d'essai.

Section 4

Modes opératoires universels

Les conditions et modes opératoires généraux exposés ci-après pour les essais toxicologiques avec des acariens s'appliquent aux essais visant à évaluer la toxicité d'échantillons de sol, de déchets particuliers ou de substances chimiques, de même qu'aux essais connexes avec un toxique de référence. La section 5 décrit des modes opératoires plus spécifiques pour les essais sur des échantillons de sol ou d'autre matière particulière semblable prélevés sur le terrain (p. ex., boues d'épuration, stériles miniers égouttés, résidus de boues de forage, compost, biosolides). La section 6 renferme des conseils et décrit des modes opératoires relativement à des essais sur un sol témoin négatif ou un sol enrichi (dopé) en laboratoire avec une ou des substances chimiques. Des indications particulières ayant trait à la réalisation d'essais sur des sols de la région boréale et de la taïga ont été intégrées dans l'ensemble de la présente méthode d'essai.

Il faut inclure dans les modes opératoires universels tous les aspects du système d'essai décrit à la section 3. Les conditions et procédures exposées à la section 2 pour l'élevage d'*O. nitens* en vue des essais de toxicité d'un sol s'appliquent également.

La liste de contrôle sommaire qui figure au tableau 2 énumère les conditions et modes opératoires recommandés et exigés pour tous les essais sur des échantillons de sol contaminé ou susceptible d'être contaminé ainsi que pour les essais portant sur des types particuliers de substances ou matières d'essai, dont des échantillons de sol de site (y compris des sols de la région boréale et de la taïga), de biosolides (p. ex., déblais de dragage, boues provenant d'une usine d'épuration des eaux usées, compost, fumier) ou de sol témoin négatif (ou d'un autre sol, contaminé ou non contaminé) enrichi en laboratoire avec une ou des substances chimiques.

La présente méthode d'essai biologique permet de mesurer les effets de l'exposition à un sol contaminé sur le succès de la reproduction des acariens. Les organismes expérimentaux doivent être des acariens *O. nitens* synchrones élevés en laboratoire. La durée de l'essai est de 28 jours²⁷ et les sols sont hydratés pendant l'essai, mais non renouvelés.

²⁷ Des études ont été menées pour évaluer la reproduction à la suite d'une exposition au sol de 15 et 20 adultes synchrones sur 28 ou 35 jours (EC, 2013b). Le taux de reproduction était plus important après 35 jours d'exposition au sol, mais il est devenu plus difficile de faire la distinction entre les adultes d'origine et la

génération F1 (c.-à-d. les descendants), car les nouveaux adultes arrivaient à maturité sur une période de 35 jours (scénario d'exposition). Par conséquent, il a été décidé de maintenir la durée d'essai de 28 jours (ECCC, 2018).

Tableau 2. Liste de contrôle des conditions et modes opératoires recommandés et exigés pour les essais visant à mesurer les effets de l'exposition à un sol contaminé sur la reproduction d'*Oppia nitens*

Universel

Type d'essai	–	essai de toxicité sur un sol entier; <i>en conditions statiques</i> (sans renouvellement)
Durée de l'essai	–	28 jours
Organismes expérimentaux	–	<i>O. nitens</i> : élevages synchrones en laboratoire; recueillis sur une période de ≤ 3 jours, âgés de 8 à 10 jours après l'exuviation jusqu'au stade adulte
Nombre de répétitions	–	≥ 5 répétitions par traitement : 15 organismes expérimentaux synchrones par répétition (récipient d'essai)
Sol témoin négatif	–	selon le plan et les objectifs de l'étude; sol non contaminé prélevé sur le terrain ou sol artificiel pour les essais sur un sol de site; il est recommandé d'utiliser un sol artificiel pour les essais sur un sol enrichi avec une ou des substances chimiques
Récipient d'essai	–	flacon en verre de 30 mL (diamètre interne de $\sim 2,6$ cm) ou autres récipients appropriés, avec couvercle; on recommande un couvercle en plastique ou en métal avec un petit trou pour l'échange gazeux
Quantité de sol par récipient d'essai	–	volume de ~ 20 mL à la teneur optimale en humidité du sol pour des flacons de verre de 30 mL ou l'équivalent; sol de ≥ 3 cm d'épaisseur; sol de 3-4 cm d'épaisseur recommandée
Teneur en humidité du sol d'essai	–	pour préparer le sol, l'hydrater jusqu'à obtention du pourcentage optimal de sa CRE si le sol a été prélevé sur le terrain (v. 5.3); ~ 70 % de la CRE s'il s'agit d'un sol artificiel (v. 3.3.2 et 6.2); pendant l'essai, hydrater au besoin
Température ambiante	–	moyenne quotidienne : 20 ± 2 °C; instantanée : 20 ± 3 °C
Éclairage	–	incandescent, fluorescent ou DEL; intensité lumineuse de 400-800 lux en un point adjacent à la surface du sol des récipients (doit être ≥ 400 lux); photopériode fixe (p. ex., 16 h de clarté et 8 h d'obscurité ou 12 h de clarté et 12 h d'obscurité)

- Alimentation – levure sèche granulée (p. ex., Fleischmann's^{MC}), saupoudrée sur la surface du sol; tous les 7 jours du jour 0 au jour 21; ~0,5-1 mg par récipient d'essai à chaque distribution de nourriture
- Aération et hydratation – ouvrir brièvement les récipients d'essai au moins une fois par semaine pour aérer et évaluer le taux d'humidité; déterminer la perte d'humidité en pesant les récipients d'essai (p. ex., peser les récipients au début de l'essai et chaque semaine par la suite), et hydrater si la perte est >2 % de la teneur en eau initiale
- Mesures au cours de l'essai – température ambiante dans l'installation d'essai, quotidiennement ou en continu; teneur en humidité, pH et conductivité (au besoin) du sol dans chaque traitement/concentration, au début et à la fin de l'essai; présence excessive de champignons, présence et quantité estimée de nourriture non consommée et « humidité » apparente du sol, au moins une fois par semaine
- Paramètres – nombre total d'acariens adultes vivants et nombre total de descendants vivants dans chaque récipient d'essai à la fin de l'essai (jour 28); taux moyen (\pm ET) de survie des adultes dans chaque traitement à la fin de l'essai (jour 28); nombre moyen (\pm ET) de descendants vivants dans chaque traitement à la fin de l'essai (jour 28); dans le cas d'un essai à concentrations multiples, CIp 28 jours pour le nombre moyen de descendants vivants produits par traitement à la fin de l'essai
- Validité de l'essai – essai non valide si le taux moyen de survie des adultes (première génération) dans le sol témoin négatif à la fin de l'essai est <70 %; essai non valide si le taux moyen de reproduction des adultes dans un sol témoin négatif est de <30 descendants par récipient
- Essai avec un toxique de référence – choisir entre un essai avec une concentration témoin positive ou un essai toxicologique de référence à concentrations multiples :
- si l'on choisit l'essai avec concentration témoin positive, il doit être effectué parallèlement à chaque essai définitif; utiliser de l'acide borique (H_3BO_3) ou un produit semblable; préparer et mettre à l'essai ≥ 5 répétitions d'une concentration prédéterminée, en utilisant un sol artificiel comme substrat; 15 acariens par répétition; suivre les conditions et modes opératoires décrits à la section 4.9 et à l'annexe H; déterminer le pourcentage de réduction de la production de descendants (en tant que pourcentage de la réponse dans le témoin) à la fin de l'essai (c.-à-d. jour 28)
 - si l'on choisit l'essai toxicologique de référence à concentrations multiples, il doit être effectué deux fois par an; utiliser de l'acide borique (H_3BO_3) ou un produit semblable; préparer et mettre à l'essai ≥ 5 concentrations plus un témoin négatif, en utilisant un sol artificiel comme substrat; ≥ 5 répétitions pour le témoin négatif et les concentrations d'essai; 15 acariens par répétitions;

suivre les conditions et modes opératoires décrits à la section 4.9; déterminer la CI50 28 jours pour l'inhibition du nombre de descendants (avec des limites de confiance à 95 %); exprimer en milligrammes d'acide borique par kilogramme de sol sec; les critères de validité sont les mêmes que ceux de l'essai définitif

Sol prélevé sur le terrain

- | | |
|----------------------------------|---|
| Transport et entreposage | – utiliser un récipient en plastique ou autre matériau approprié rempli à ras bord et le fermer hermétiquement; étiqueté et codé; transporter à l'abri de la lumière (p. ex., dans une glacière, un seau en plastique ou un autre récipient opaque); les échantillons ne doivent pas geler ou surchauffer pendant le transport; entreposer dans l'obscurité à 4 ± 2 °C; procéder aux essais de préférence dans les deux semaines, obligatoirement dans les six semaines suivant le prélèvement, sauf si la stabilité des contaminants du sol a été établie |
| Sol témoin négatif | – sol naturel non contaminé prélevé sur le terrain ou sol artificiel pour lequel des essais antérieurs de 28 jours ont montré que tous les critères de validité de l'essai pouvaient être systématiquement satisfaits; analysé pour déterminer, au minimum, les éléments suivants : granulométrie (pourcentage de sable, de limon, d'argile), COT (%), MO (%), pH, conductivité, teneur en humidité (%), CRE et CEC. |
| Sol de référence | – un ou des échantillons pour les essais sur un sol prélevé sur le terrain, sur un ou des sites présumés non contaminés, mais à proximité des lieux d'échantillonnage du sol d'essai; caractéristiques (p. ex., TMO [%], granulométrie, texture, pH et conductivité) du sol de référence semblables à celles du ou des sols d'essai; analysé conformément à la description concernant le sol témoin négatif naturel |
| Caractérisation des sols d'essai | – doit au moins inclure : teneur en humidité, CRE, pH, conductivité, teneur en COT (%), TMO (%), granulométrie (pourcentage de sable, de limon et d'argile) et CEC; devrait au moins inclure : azote, phosphore, potassium, ratio C/N, cations et anions majeurs; peut inclure : densité apparente, carbone inorganique total, matières volatiles totales, demande biochimique en oxygène, demande chimique en oxygène, potentiel d'oxydoréduction, sels solubles, taux d'adsorption du sodium, contaminants préoccupants (p. ex, métaux, HAP, pesticides) et caractéristiques de la contamination (p. ex., odeur, taches, débris, présence de carburant ou de solvant) |
| Préparation des sols d'essai | – au besoin, enlever à l'aide de pincettes les débris et les macro-organismes indigènes; au besoin, passer doucement le sol à travers un tamis à mailles appropriées (p. ex., 4-10 mm); au moins un cycle de gel-dégel pour les horizons à forte TMO; homogénéiser; déterminer la teneur en humidité et la CRE; hydrater avec de l'eau d'essai (ou déshydrater selon le cas) jusqu'à obtention du pourcentage optimal de la CRE; mélanger; essai à concentrations multiples : diluer avec le sol témoin ou de référence; s'assurer que le mélange est homogène |

Sol enrichi avec une ou des substances chimiques

- | | |
|---|--|
| Sol témoin négatif | – sol artificiel ou non contaminé prélevé sur le terrain pour lequel des essais antérieurs de 28 jours ont montré que tous les critères de validité de l'essai pouvaient être systématiquement satisfaits; analysé pour déterminer, au minimum, les éléments suivants : granulométrie (pourcentage de sable, de limon, d'argile), COT (%), MO (%), pH, conductivité, teneur en humidité (%), CRE et CEC. |
| Caractérisation de la ou des substances chimiques | – avant de procéder à l'essai, on devrait obtenir des données sur la concentration des matières actives et des impuretés, la solubilité dans l'eau, la pression de vapeur, la stabilité, les constantes de dissociation, les coefficients d'adsorption, la toxicité pour les humains et les organismes terrestres, ainsi que la biodégradabilité de la ou des substances chimiques dont on a enrichi le sol témoin négatif |
| Solvant | – eau désionisée (de préférence); si on utilise un solvant organique, l'essai doit inclure un témoin sol-solvant en plus d'un sol témoin négatif |
| Préparation des mélanges | – le mode opératoire dépend de la nature de la ou des substances d'essai ainsi que du plan d'expérience et des objectifs de l'essai; les mélanges de sol et de substance chimie peuvent être préparés manuellement ou à l'aide d'un agitateur mécanique; la ou les substances d'essai peuvent être ajoutées en quantités mesurées dans une solution (eau ou solvant organique) ou sous forme de matière solide partiellement ou entièrement composée de la ou des substances d'essai; les conditions de mélange sont normalisées pour chaque traitement; s'assurer que le mélange est homogène |
| Concentration, dans le mélange de sol, de la ou des substances chimiques ajoutées | – en règle générale, mesurée au début et à la fin de l'essai, en trois titres au moins : élevé, moyen et faible |

* Les renseignements contenus dans ce tableau ne sont qu'un résumé. Les exigences et recommandations définitives de cette méthode d'essai figurent dans le corps du présent document.

La version définitive de la présente méthode a été appliquée et validée par plusieurs laboratoires au cours de trois séries d'essais parallèles avec *O. nitens* utilisant un sol artificiel et prélevé sur le terrain enrichi avec de l'acide borique (EC, 2019)²⁸.

4.1 Préparation des sols d'essai

Chaque récipient d'essai (v. 3.2.2) de l'installation d'essai doit être codé ou étiqueté clairement afin qu'on puisse identifier l'échantillon (et connaître sa concentration s'il est dilué). Il faut consigner la date et l'heure du début de l'essai, soit directement sur les étiquettes, soit sur des feuilles de données distinctes réservées à l'essai. On devrait disposer les récipients d'essai de manière à faciliter les observations et les mesures. Les traitements devraient être répartis au hasard dans l'installation d'essai, et il faudrait changer régulièrement l'emplacement des récipients pendant l'essai (p. ex., chaque semaine, au hasard) (EC, 2004a, 2005a, 2013a, 2014a).

Le jour où les acariens sont exposés pour la première fois aux échantillons de substance ou matière d'essai

est désigné jour 0. La veille du démarrage de l'essai (jour -1), il faudrait mélanger soigneusement²⁹ (v. 5.3 et 6.2) chaque échantillon ou sous-échantillon de sol d'essai ou de matière particulaire semblable, y compris le sol témoin négatif et, le cas échéant, le sol de référence, afin d'obtenir un mélange homogène quant à la couleur, à la texture et à l'humidité. Si l'essai est réalisé sur des échantillons de sol de site prélevés sur le terrain, il faudrait éliminer avant le mélange les pierres, le chaume, les bouts de bois et les débris de grande taille qu'on aura observés, de même que toute végétation ou tout macro-invertébré (v. 5.3).

Chaque lot de sol d'essai ou d'horizon pédologique devrait correspondre à la quantité dont on a besoin pour les répétitions que comporte le traitement prévu (v. tableau 2), plus une quantité additionnelle pour les analyses physicochimiques à exécuter (v. 4.6) et un surplus afin de compenser le sol inutilisé qui adhère aux parois du récipient servant au mélange. La teneur en humidité de chaque sol d'essai devrait être connue ou déterminée. S'il faut l'ajuster, il est recommandé d'ajouter de l'eau d'essai (ou, au

²⁸ Dans la première phase des essais de validation interlaboratoires, 8 laboratoires ont participé à un essai de 28 jours avec *O. nitens* en utilisant trois différents sols témoins non contaminés : un sol forestier naturel, un sol sablo-loameux naturel et un sol artificiel. Cette première série devait permettre aux laboratoires de se familiariser avec l'espèce à tester et la méthode d'essai. Huit laboratoires ont participé à la deuxième série d'essais de validation interlaboratoires, qui comprenait des essais sur la reproduction avec *O. nitens* exposé à l'acide borique dans un sol sablo-loameux prélevé sur le terrain pendant 28 jours. Tous les laboratoires ont répondu aux critères de performance témoin minimums acceptables proposés pour la survie des adultes de $\geq 70\%$ ainsi qu'aux critères de performance témoin proposés pour la reproduction de ≥ 30 juvéniles en moyenne (c.-à-d. descendants) par répétition; un laboratoire n'a pas réussi à répondre aux critères de validité de l'essai proposés pour le sol artificiel (29 ± 12 juvéniles) seulement. Les coefficients de variation pour la survie des adultes dans les sols témoins étaient de 5,1 % et de 8,2 % pour les sols sablo-loameux artificiels et les sols limoneux-sableux prélevé sur le terrain, respectivement; les coefficients de variation correspondants pour la production de descendants étaient de 41 et de 42 %, respectivement. La CI50 moyenne pour la production de descendants était de $105 \pm 7,0$ mg de H_3BO_3 par kilogramme de sol sec, avec des valeurs allant de 98 à 118 mg/kg. La variation interlaboratoire,

exprimée sous forme de CV, était de 6,7 % (ECCC, 2019). Huit laboratoires ont participé à la troisième série d'essais de validation interlaboratoires. Il s'agissait d'essais sur la reproduction avec *O. nitens* exposé à l'acide borique dans un sol LUFA 2,2 pendant 28 jours. Tous les laboratoires ont répondu aux critères de performance témoin minimums acceptables proposés pour la survie des adultes de $\geq 70\%$ ainsi qu'aux critères de performance témoin proposés pour la reproduction de ≥ 30 juvéniles en moyenne par répétition. Les coefficients de variation pour la survie des adultes dans les sols témoins étaient de 8,2 % et de 5,9 % pour les sols artificiels et LUFA 2,2, respectivement; les coefficients de variation correspondants pour la production de descendants étaient de 37 % et de 52 %, respectivement. La CI50 moyenne pour la production de descendants était de 86 ± 24 mg de H_3BO_3 par kilogramme de sol sec, avec des valeurs allant de 42 à 114 mg/kg. La variation interlaboratoire, exprimée sous forme de CV, était de 28 %, ce qui démontre un accord acceptable entre les laboratoires (ECCC, 2019).

²⁹ Tout liquide qui s'est séparé d'un échantillon ou sous-échantillon de sol d'essai pendant le transport ou l'entreposage doit y être réintégré.

besoin, de déshydrater le sol) jusqu'à obtention de la teneur souhaitée (v. 5.3 et 6.2). Pour évaluer quantitativement l'homogénéité d'un lot, on peut prélever des aliquotes du mélange et en analyser notamment la granulométrie, les teneurs en COT, en matière organique et en humidité ainsi que la concentration de la ou des substances chimiques d'intérêt.

Une fois le lot préparé, on devrait immédiatement en transférer une quantité de sol d'essai permettant d'obtenir une épaisseur de 3-4 cm (c.-à-d. ~20 mL pour un flacon de 30 mL ou l'équivalent) dans chaque récipient de répétition. La quantité de sol dans chaque récipient de répétition doit être la même et doit permettre d'obtenir une épaisseur minimale de 3 cm dans le récipient d'essai. Pour lisser le sol (sans le tasser) ajouté à chaque récipient d'essai, il faudrait utiliser une spatule ou taper doucement le flacon en verre sur la table de travail ou avec la paume de la main.

Dans le cas des sols échantillonnés par horizon (p. ex., sols de la région boréale ou de la taïga), chaque horizon doit être préparé et mis à l'essai séparément dans des essais définitifs individuels. Pour les sols soumis à des essais à concentrations multiples, il faudrait mélanger chaque horizon de sol d'essai avec l'horizon correspondant du sol témoin négatif ou de référence (v. 5) aux diverses concentrations prévues (p. ex., 0 %, 6,25 %, 12,5 %, 25 %, etc.). Dans certains cas, il pourrait être impossible de prélever les mêmes horizons de sol témoin négatif et de sol d'essai. Par exemple, un sol témoin négatif peut être prélevé par horizon, mais non pas le sol de site parce qu'un ou des horizons de sol d'essai en sont absents ou sont mélangés. Il faudrait alors préparer les concentrations en mélangeant le poids qui convient de sol d'essai et l'horizon (il peut y en avoir plus d'un) disponible du sol témoin négatif aux concentrations voulues.

Pour un essai à concentration unique (p. ex., sur un sol de site non dilué, sur un sol d'essai avec une concentration particulière ou enrichi avec une

substance chimique à la dose maximale indiquée sur l'étiquette), on doit préparer ≥ 5 récipients de répétition et 5 récipients témoins négatifs de répétition en ajoutant du sol provenant du même lot à chaque récipient de répétition. Dans le cas d'un sol de site, les répétitions devraient être constituées des *réplicats* prélevés individuellement dans un lieu d'échantillonnage donné (v. 5.1). Pour un essai à concentrations multiples, on doit préparer ≥ 5 récipients de répétition pour chaque sol témoin négatif et ≥ 5 récipients de répétition par traitement. L'analyse de *puissance* effectuée sur les données de reproduction générées à l'aide de cette méthode (v. 5.6.2) a indiqué que pour cinq réplicats de laboratoire, une taille d'effet de 40 % ou plus peut être détectée de manière fiable (puissance ≥ 80 %). Il est recommandé d'effectuer un plus grand nombre de répétitions (c.-à-d. ≥ 8) pour détecter de façon fiable une taille d'effet plus petite (c.-à-d. 30 %) (v. 5.6.2). Lorsque l'incertitude entourant la toxicité d'un échantillon est appréciable, il pourrait être avantageux de procéder à un *essai préliminaire* pour choisir plus précisément les concentrations à utiliser dans l'essai définitif; le nombre de répétitions pourrait y être réduit (à 3, p. ex.). Pour tout essai visant à estimer la concentration inhibitrice correspondant à un pourcentage d'effet précisé (*CIp*) dans un essai définitif à concentrations multiples, on doit préparer ≥ 7 concentrations plus un ou des traitements *témoins*; il est toutefois recommandé d'en prévoir un plus grand nombre (≥ 10 , plus un ou des traitements témoins) pour améliorer la probabilité d'encadrer chaque paramètre³⁰. Si un essai préliminaire est effectué avant l'essai définitif, on peut utiliser moins de concentrations dans l'essai définitif, car on disposera de plus de données sur la gamme de concentrations/dilutions avec effet. Dans ce cas, au moins cinq concentrations d'essai doivent être utilisées.

On recommande de préparer ≥ 25 g de sol pour chaque traitement (y compris tout sol témoin ou de référence utilisé) en vue des analyses physicochimiques à effectuer le jour 0 et à la fin de l'essai (v. 4.6)³¹.

³⁰ On peut prévoir ≥ 10 concentrations (plus des témoins) afin de mieux mettre en évidence la forme de la relation concentration-réponse et choisir le modèle de régression linéaire ou non linéaire qui convient (v. 4.8.1.1).

³¹ L'extraction à la chaleur à la fin de l'essai modifie souvent les propriétés physicochimiques du sol d'essai. Il faudrait donc préparer des répétitions supplémentaires (avec ou sans organisme expérimental, selon les objectifs)

Il faudrait choisir une vaste gamme de concentrations, dont une faible concentration n'ayant aucun effet néfaste (comme c'est le cas avec le traitement témoin négatif) et une concentration élevée pour laquelle l'effet est « total » ou grave. Si le paramètre prévu se situe dans une série de concentrations très rapprochées, toutes ces concentrations pourraient se révéler trop faibles ou trop élevées. Pour disposer d'une vaste gamme de concentrations tout en obtenant des effets importants au centre de la gamme, il pourrait être nécessaire de prévoir des traitements additionnels afin de subdiviser plus finement la gamme choisie. Dans tous les cas, il faudrait employer une série géométrique régulière (v. annexe F). On trouvera dans EC (2005b) de plus amples indications sur le choix des concentrations d'essai aux fins de la présente méthode.

Après avoir ajouté une aliquote mesurée de sol dans chaque récipient d'essai, on devrait boucher hermétiquement les récipients avec des couvercles (v. 3.2.2) afin de réduire au minimum la perte d'humidité. Il faudrait conserver les récipients d'essai pendant toute une nuit dans les conditions de température et d'éclairage prévues pour l'essai (v. 4.3) afin de permettre l'équilibrage chimique des sols d'essai (p. ex., sol enrichi avec une substance chimique ou sol de site dilué avec un sol témoin). Si la volatilisation, la dégradation ou le métabolisme des contaminants ou des substances chimiques dans les sols d'essai suscitent des préoccupations, on peut entreprendre l'essai immédiatement après la préparation du sol d'essai (v. 6.2). Les dates de préparation des sols témoins et d'essai ainsi que les dates d'ajout des organismes dans les récipients d'essai doivent être consignées et signalées.

dans le seul but d'effectuer des mesures physicochimiques à la fin de l'essai (v. 4.6).

³² Les premières études ont été menées auprès de 15 et 20 adultes synchrones. L'utilisation de 15 adultes était préférable, car elle réduisait de 25 % le nombre total d'organismes requis pour un essai, tout en permettant une production suffisante de juvéniles (ECCC, 2018). D'autres études ont également été menées pour évaluer les biais relatifs au sexe dans la sélection des organismes expérimentaux individuels, étant donné que le sexe ne pouvait pas être choisi *a priori*. Le sexe des acariens

4.2 Mise en route de l'essai

Une fois le sol préparé, les organismes expérimentaux sont transférés dans chaque récipient d'essai le jour suivant (jour 0). Afin de disposer d'un nombre suffisant d'organismes, il faudrait préparer des élevages synchrones qui fourniront un nombre d'organismes supérieur au nombre requis (v. 2.3.8).

On doit prélever des acariens adultes, âgés de 8-10 jours après l'exuviation jusqu'au stade adulte dans les élevages synchrones (v. 2.3.8 pour d'autres informations sur les élevages synchrones). Quinze individus doivent être transférés dans chaque récipient d'essai³².

Les organismes peuvent être transférés délicatement des élevages synchrones sur un morceau (format lettre) de carton noir rigide plié en deux, un petit récipient en verre ou une barquette de pesée (préalablement lavée et séchée afin d'éliminer la pellicule cireuse dont les barquettes sont enduites) à l'aide d'un pinceau fin. On devrait procéder à une observation finale des acariens afin de vérifier qu'on a prélevé le nombre correct d'organismes et que leur aspect est normal (les organismes choisis devraient sembler en bonne santé et actifs, mobiles, sans défauts ou blessures visibles et de même coloration³³). Tous les acariens atypiques devraient être rejetés. Ensuite, on devrait transférer soigneusement les organismes sur la surface du sol de chaque récipient d'essai en tapotant doucement le carton ou la barquette de pesée au-dessus du récipient d'essai. Le groupe d'acariens transféré dans chaque récipient d'essai devrait être réparti au hasard dans les répétitions et les traitements.

adultes provenant de cinq essais effectués avec du sol artificiel a été examiné au microscope après avoir nettoyé les acariens avec de l'acide lactique; le rapport résultant entre les mâles et les femelles était de 49 ± 11 % à 51 ± 11 %, respectivement, par suite d'une sélection aléatoire des organismes expérimentaux provenant d'élevages synchrones (ECCC, 2018).

³³ Les individus qui semblent blessés ou qui sont trop petits (par rapport aux autres choisis) ou d'une coloration différente (p. ex., opaque ou « laiteuse » – v. annexe E) ne doivent pas être utilisés dans l'essai.

4.3 Conditions d'essai

- Il s'agit d'un essai de toxicité d'un sol d'une durée de 28 jours, qui ne comporte aucun renouvellement du sol des récipients d'essai.
- Le récipient d'essai (p. ex., flacon en verre de 30 mL); son contenu (c.-à-d. une quantité permettant d'avoir une épaisseur de sol d'essai de ≥ 3 cm) est couvert (v. 3.2.2 et 4.1).
- Pour un essai à concentration unique, il faut préparer ≥ 5 récipients de répétition pour chaque sol d'essai (c.-à-d. chaque traitement) et pour chaque sol témoin. Pour un essai à concentrations multiples, il faut préparer ≥ 5 récipients de répétition pour chaque concentration d'essai et 5 récipients de répétition pour chaque sol témoin.
- Pour les essais à concentrations multiples, il faut utiliser ≥ 7 concentrations, en plus du ou des traitements témoins appropriés. Si un essai préliminaire est effectué avant l'essai définitif, on peut réduire le nombre de concentrations, mais cinq, au minimum, sont nécessaires.
- L'essai doit être réalisé à une température moyenne quotidienne de 20 ± 2 °C. En outre, la température instantanée doit toujours être de 20 ± 3 °C.
- Les récipients d'essai doivent être éclairés selon une photopériode fixe (p. ex., 16 h de clarté et 8 h d'obscurité ou 12 h de clarté et 12 h d'obscurité). Il faudrait utiliser des lampes incandescentes, fluorescentes ou à DEL. L'intensité lumineuse en un point adjacent à la surface du sol dans chaque récipient d'essai devrait être de 400-800 lux, la valeur minimale étant de 400 lux (v. 2.3.3).

4.4 Critères de validité des essais

Pour que l'essai décrit dans cette méthode d'essai biologique soit valide, il doit satisfaire à chacun des deux critères suivants³⁴ :

- i) le taux moyen de survie des acariens adultes maintenus pendant 28 jours dans un sol témoin négatif doit être, à la fin de l'essai, de ≥ 70 %;
- ii) le taux moyen de reproduction des acariens adultes maintenus pendant 28 jours dans un sol témoin négatif doit être de ≥ 30 descendants par récipient témoin à la fin de l'essai.

4.5 Alimentation

Pendant l'essai toxicologique, les acariens *O. nitens* doivent être nourris avec de la levure sèche granulée tous les sept jours (jour 0-21), que l'on dépose dans chaque récipient d'essai. On devrait ajouter environ 0,5-1 mg de levure sèche granulée à chaque récipient d'essai lors de la distribution de nourriture. Il faut utiliser une levure sèche granulée (p. ex., Fleischmann's^{MC}). On devrait répartir uniformément la levure sur la surface du sol d'essai humide (un sol humidifié de façon optimale devrait être suffisant pour hydrater et activer la levure avec le temps). Il est important que les organismes de chaque récipient d'essai reçoivent la même quantité de levure. Au moment de déposer la levure dans un récipient d'essai, si on constate qu'il reste de la levure de la fois précédente, il ne faudrait pas enlever cette levure, mais plutôt ajouter une quantité réduite de levure fraîche pour cette fois³⁵.

4.6 Observations et mesures

Les paramètres biologiques pour l'essai sont le nombre de descendants produits dans chaque récipient à la fin de l'essai (jour 28). Il faut observer

³⁴ Les critères de validité des essais présentés ici sont fondés sur des données témoins obtenues dans de nombreuses études réalisées pendant la mise au point de la méthode (EC, 2010, 2013b, 2014b; Hennessy, 2010; Princz et coll., 2010, 2012, 2018; Princz, 2014; Ritchie et coll., 2017; ECCC, 2018, 2019). Les sols non contaminés pris en compte dans l'élaboration des critères de validité de l'essai comprenaient deux sols artificiels, quatre sols agricoles et cinq sols boréaux (y compris neuf horizons

différents au total; v. annexe D). Les critères de validité étaient basés sur un calcul du 5^e centile (ECCC, 2018).

³⁵ Si du mycélium se forme à la surface du sol dans le récipient d'essai, il suffit de le morceler soigneusement avec une pince et un microscope tout en prenant soin de ne pas perturber les organismes expérimentaux.

et consigner l'état, l'aspect et le nombre des acariens vivants transférés dans chaque récipient d'essai le jour 0. Les couvercles doivent être retirés de tous les récipients d'essai aux fins d'aération une fois par semaine ou plus fréquemment (soit ≥ 2 fois par semaine) au besoin, ou à mesure que l'essai avance et que le nombre d'organismes par récipient d'essai augmente³⁶. Il faudrait en profiter de l'occasion pour observer et consigner toute présence de bactéries ou de champignons en quantité excessive, toute activité trophique ainsi que la présence et la quantité de nourriture non consommée.

La température ambiante dans l'installation d'essai (v. 4.3) doit être mesurée quotidiennement (p. ex., à l'aide d'un thermomètre maxima/minima) ou en continu (p. ex., à l'aide d'un enregistreur graphique).

Une fois par semaine, il faut vérifier l'humidité apparente du contenu de chaque récipient d'essai³⁷. Pour déterminer la perte d'humidité, il faudrait aussi peser les récipients d'essai, et ce, au début de l'essai. On peut ensuite vérifier le poids de chaque récipient d'essai une fois par semaine et ajouter de l'eau d'essai pour compenser la perte de poids (en raison de la perte d'eau) si celle-ci représente > 2 % de la teneur en eau initiale (ISO, 1999). Lorsque le nombre de récipients d'essai est élevé, on peut calculer la quantité moyenne d'eau perdue en pesant 10 à 20 % des récipients choisis au hasard au début de l'essai et une fois par semaine par la suite. La

quantité d'eau perdue ainsi calculée peut ensuite être ajoutée à tous les récipients d'essai. L'eau d'essai perdue peut être ajoutée sous la forme d'une légère brume ou à l'aide d'un compte-gouttes.

Le pH et la teneur en humidité du sol d'essai ou de l'horizon pédologique représentant chaque traitement (y compris le sol témoin négatif et, le cas échéant, le sol de référence) doivent être mesurés et consignés 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 lorsqu'on s'attend à ce que le sol d'essai ait une forte teneur en sel. Les mesures initiales (jour 0) devraient être effectuées sur un *échantillon* composé de sous-échantillons de chaque lot du sol d'essai ou de l'horizon pédologique utilisé pour préparer les répétitions d'un traitement donné (v. 4.3)³⁸. Les mesures finales (jour 28 selon l'espèce utilisée) devraient être effectuées sur des répétitions additionnelles préparées pour chaque traitement (v. 4.1) en vue des analyses à la fin de l'essai.

Le pH du sol devrait être mesuré à l'aide d'une méthode utilisant une suspension dans une solution de CaCl_2 (variante d'une méthode décrite dans Hendershot et coll., 1993; selon les recommandations de Becker-van Slooten et coll., 2004)³⁹. Pour ces analyses, on dépose 4 g de sol hydraté⁴⁰ dans un bécher en verre de 30 mL (~3 cm de diamètre et ~7 cm de hauteur) et on ajoute 20 mL de CaCl_2 0,01 M⁴¹. Il faudrait agiter la suspension

³⁶ Tapoter doucement sur le couvercle du récipient d'essai pour déloger les acariens; le couvercle devrait être retiré lentement afin que les organismes qui se cachent sous le couvercle retombent dans le récipient d'essai.

³⁷ L'humidité apparente d'un sol dépend de la nature du sol et de la quantité d'eau perdue par évaporation dans les récipients d'essai. Les sols peuvent sembler trop secs lorsque la CRE est sous-estimée (v. 5.3).

³⁸ Le jour précédant le démarrage de l'essai (jour -1), on devrait déposer une ou plusieurs répétitions de chaque sol d'essai dans un récipient d'essai qui sera conservé au laboratoire. Ces répétitions devraient être réservées aux analyses physicochimiques des conditions auxquelles les acariens sont exposés le jour 0. On devrait également préparer une série distincte de répétitions le jour -1 aux fins des analyses physicochimiques à la fin de l'essai (jour 28). Des organismes peuvent être ajoutés ou non à des répétitions le jour 0.

³⁹ La méthode décrite dans Hendershot et coll. (1993) comporte une étape dans laquelle l'échantillon est séché à l'air pendant 48 h avant la mesure du pH. Les expérimentateurs d'Environnement Canada ont constaté que cette étape est chronophage (K. Doe, Environnement Canada, comm. pers., 2004; J. Princz, Environnement Canada, comm. pers., 2004) et qu'elle ne modifie pas de façon appréciable le pH par rapport à celui du sol hydraté (c.-à-d. le sol utilisé dans l'essai de toxicité) (Courchesne et coll., 1995; J. Princz, Environnement Canada, comm. pers., 2004).

⁴⁰ Il faudra peut-être utiliser un ratio sol/solution de CaCl_2 plus bas (p. ex., 2 g de sol pour 20 mL de CaCl_2) pour les sols qui ont une forte TMO (c.-à-d. pour les sols où la suspension ne donne pas de surnageant).

⁴¹ Pour préparer une solution aqueuse de CaCl_2 0,01 M, dissoudre 2,940 g de CaCl_2 dihydraté ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) avec de l'eau distillée dans une fiole jaugée de 2 000 mL.

par intermittence pendant 30 min (p. ex., toutes les 6 min), puis la laisse reposer pendant ~1 h. On plonge ensuite une sonde à pH dans le liquide surnageant et on consigne la valeur du pH une fois que la valeur indiquée ne change plus.

Pour mesurer la teneur en humidité de chaque sol d'essai ou de chaque horizon pédologique, on devrait déposer un sous-échantillon de 3-5 g de chaque sol ou horizon dans un plateau en aluminium préalablement pesé, puis on mesure et on consigne son poids humide. Chaque sous-échantillon devrait ensuite être placé dans un four de séchage à 105 °C jusqu'à obtention d'un poids constant, ce qui demande habituellement >24 h. Le poids sec de chaque sous-échantillon devrait ensuite être mesuré et consigné. La teneur en humidité du sol doit être calculée en pourcentage du poids sec du sol à l'aide de la formule suivante :

teneur en humidité (%) =

$$\frac{\text{poids humide (g)} - \text{poids sec (g)}}{\text{poids sec (g)}} \times 100$$

Il est important que la teneur en humidité soit calculée en fonction du poids sec (et **non** du poids humide) puisque les résultats de ces calculs sont utilisés avec les calculs de la CRE (également déterminée en fonction du poids sec) pour exprimer la teneur optimale en humidité des sols d'essai (v. 5.3).

Selon le type d'essai et le plan de l'étude, les concentrations de la ou des substances chimiques préoccupantes pourraient être mesurées, au début et à la fin de l'essai, dans les sols d'essai dilués ou non. Pour un essai sur un échantillon de sol de site, la ou

les substances chimiques à doser dépendront du ou des contaminants préoccupants (v. 5.5). Pour un essai à concentrations multiples sur un sol enrichi avec une substance chimique, de telles mesures devraient être effectuées, au minimum, pour les concentrations élevées, moyenne et faible soumises à l'essai (v. 6.3). On devrait prélever des aliquotes de chaque sol ou horizon pédologique en vue de ces analyses, comme il est indiqué plus haut pour le pH et la teneur en humidité, et les analyses devraient être effectuées selon des techniques éprouvées et reconnues (p. ex., SPAC, 1992; Carter, 1993; Carter et Gregorich, 2008).

4.7 *Fin de l'essai*

L'essai doit prendre fin après 28 jours d'exposition (c.-à-d. jour 28). On doit alors déterminer et consigner le nombre d'acariens adultes vivants et le nombre de descendants vivants dans chaque récipient d'essai. Avant d'ouvrir un récipient d'essai, on devrait tapoter son couvercle (p. ex., 3 petits coups) pour déloger les individus qui auraient pu s'accrocher sous le couvercle. Les acariens vivants (adultes et descendants) doivent être extraits du sol d'essai à l'aide de la méthode d'extraction à la chaleur (v. annexe G).

La méthode d'extraction à la chaleur décrite dans Wiles et Krogh (1998) et dans OCDE (2009) est fondée sur les principes de MacFayden et de Petersen et utilise un extracteur à gradient de température contrôlé où les acariens sont recueillis sur 48 h⁴². Becker-van Slooten et coll. (2005) ont mis au point une technique d'extraction à la chaleur plus simple et plus économique. Cette méthode, qui a ensuite été perfectionnée par Environnement

La conductivité de la solution devrait se situer entre 224 et 240 mS/m à 25 °C, et le pH, dans la plage 5,5-6,5 à 25 °C (Hendershot et coll., 1993). Si le pH se situe en dehors de cette plage, il devrait être ajusté à l'aide d'une solution de chlorure d'hydrogène (HCl) ou d'hydroxyde de calcium [Ca(OH)₂]. Si la conductivité se situe en dehors de la plage acceptable, on doit préparer une nouvelle solution.

⁴² Dans la méthode d'extraction à la chaleur décrite dans Wiles et Krogh (1998), la chaleur est produite par un élément de chauffage installé dans la partie supérieure d'une boîte d'extraction (la chaleur est régulée à l'aide

d'une thermistance placée à la surface de l'échantillon de sol). La température du liquide refroidi qui entoure le récipient de récupération est régulée par une autre thermistance située à la surface de la boîte de récupération (placée sous le sol). Les thermistances sont reliées à un dispositif de contrôle programmable qui élève la température selon un rythme préprogrammé (la température du sol est haussée progressivement de 25 °C à 40 °C à raison de 5 °C toutes les 12 h). Les organismes sont recueillis dans un récipient de récupération refroidi (2 °C) dont le fond est recouvert d'une couche d'un mélange de plâtre de Paris et de charbon.

Canada (EC, 2014a; ECCC, 2018) avec du matériel disponible au Canada, est recommandée ici pour extraire les acariens du sol d'essai. La chaleur, fournie par une lampe munie d'une ampoule de 60 W, est régulée par la distance entre l'ampoule et la surface du sol dans le dispositif d'extraction à la chaleur⁴³. Un dispositif d'extraction à la chaleur devrait être préparé pour chaque récipient d'essai. Une fois l'essai terminé, le sol de chaque récipient d'essai est transféré dans un dispositif d'extraction à la chaleur. Pour ce faire, on peut verser le sol d'essai du récipient d'essai dans l'ouverture du dispositif d'extraction à la chaleur contenant la gaze ou la toile de canevas. On devrait tapoter plusieurs fois le fond du récipient d'essai afin de déloger le sol qui pourrait adhérer aux parois et au fond du récipient. Tous les acariens vivants accrochés au récipient d'essai vide doivent être comptés et ajoutés au compte final. De l'eau peut être utilisée pour faire flotter et compter les acariens qui restent dans le récipient d'essai (v. annexe G). La surface du sol est égalisée au-dessus de la toile de canevas, à l'aide d'une cuillère ou d'une spatule Scoopula. Les dispositifs d'extraction à la chaleur sont placés sous les lampes, à raison de 5-6 dispositifs par lampe au maximum, afin que tous les récipients reçoivent la même lumière et la même chaleur. La distance de l'ampoule est réglée de façon que sa base se trouve à ~25 cm au-dessus de la surface du sol; un thermomètre (électronique, p. ex.) est installé dans l'un des dispositifs d'extraction (c.-à-d. un thermomètre par lampe) pour surveiller les changements de température pendant l'extraction. La température devrait être vérifiée deux fois par jour, ou plus fréquemment si nécessaire, en même temps que l'hydratation du sol (en relevant les lampes lorsque les techniciens ne sont pas présents pour surveiller les dispositifs, par exemple pendant la nuit, pour éviter que le sol ne sèche complètement).

⁴³ Le dispositif consiste en deux gobelets en plastique (p. ex., Fisher, n° 11-838-17 au catalogue) – l'un d'eux est découpé à ~1 cm du fond et l'autre contient une couche de ~1 cm de substrat de plâtre de Paris (v. 2.3.5). Un morceau de canevas en plastique (utilisé pour les travaux à l'aiguille; 7 mesh) est découpé à la bonne taille et collé en place (avec un pistolet à colle chaude et des bâtons de colle non toxique) à ~1 cm du bord supérieur (à l'opposé du bord découpé) du gobelet dont on a enlevé le fond. Pour assembler le dispositif d'extraction à la chaleur, on place le gobelet découpé (celui contenant le canevas) à l'envers sur le gobelet entier (celui contenant le substrat

Il n'est pas nécessaire d'ajuster la hauteur de la lampe, et la température devrait atteindre ~32 °C au bout de 48 h. Il faudrait ajouter au besoin de l'eau d'essai (p. ex., sous la forme d'une légère brume sur la surface du sol d'essai transféré) pour s'assurer que le sol d'essai ne se dessèche pas complètement, mais il ne faudrait pas humidifier davantage le sol dans les 16 heures précédant la fin de l'extraction. À la fin de la période d'extraction (c.-à-d. 48 h), on doit éteindre les lampes et enlever la bande de Parafilm® qui relie les deux parties du dispositif d'extraction à la chaleur. Les organismes qui sont passés à travers le morceau de canevas et qui se retrouvent sur le substrat de plâtre de Paris devraient être comptés à l'aide de la méthode de flottation (v. annexe G). Ils peuvent être comptés immédiatement, manuellement ou à l'aide d'un système d'analyse d'image. Si les organismes ne peuvent être comptés immédiatement, le substrat peut être humidifié avec de l'eau désionisée et placé dans un endroit frais (p. ex., 4 °C-10 °C) jusqu'à ce que le traitement puisse continuer, ou ils peuvent être conservés (p. ex., dans de l'alcool titrant 70 %) pour être comptés plus tard. L'annexe G fournit des détails sur la mise en place des dispositifs d'extraction à la chaleur et sur l'exécution de l'extraction à la chaleur. D'autres méthodes d'extraction à la chaleur peuvent être utilisées, et deux autres modes opératoires sont également décrits à l'annexe G.

Les laboratoires qui n'ont pas d'expérience avec la méthode d'extraction à la chaleur décrite ici doivent commencer par valider et documenter l'efficacité de leur système d'extraction à la chaleur (ils doivent recueillir des données qui démontrent que, après l'extraction à la chaleur, il ne reste pas un nombre important d'organismes expérimentaux dans le sol). Pour ce faire, ils peuvent utiliser la méthode de

de plâtre de Paris) de telle sorte que les deux bords les plus larges (c.-à-d. les bords supérieurs de chaque gobelet) se touchent (le gobelet contenant le canevas est renversé au-dessus de celui contenant le plâtre de Paris). Au besoin, il faudrait entourer la jointure des deux gobelets avec une bande de Parafilm® maintenue en place par du ruban adhésif. Un petit carré de gaze peut être placé sur le canevas afin que le sol ne tombe pas à travers la partie inférieure du dispositif d'extraction (annexe G).

flottation⁴⁴ pour vérifier s'il reste des organismes dans le sol traité à la chaleur et, par le fait même, si leur technique d'extraction à la chaleur est efficace. La méthode d'extraction à la chaleur est jugée acceptable si le nombre d'organismes expérimentaux restant dans le sol (extraits du sol par la méthode de flottation après extraction à la chaleur) représente <5 % du nombre total d'organismes. Si l'efficacité de l'extraction à la chaleur n'est pas acceptable, tous les traitements doivent être effectués dans une matière semblable (c.-à-d. en utilisant la méthode de flottation après l'extraction à la chaleur). Une fois que le personnel du laboratoire a acquis de l'expérience avec l'extraction à la chaleur et démontré l'efficacité du système utilisé, le laboratoire devrait continuer de *surveiller* périodiquement cette efficacité.

Tous les acariens (adultes et descendants) extraits du sol sont comptés et consignés, qu'ils soient morts ou vivants. Les acariens juvéniles (c.-à-d. les descendants) doivent être distingués des adultes et comptés séparément. En règle générale, on distingue aisément les adultes des juvéniles, en raison de leur taille nettement plus grande et de leur couleur plus foncée (v. annexe E). Il faudrait également observer les organismes expérimentaux pendant une courte période pour détecter la présence (ou l'absence) de mouvement. On considère qu'un acarien est mort s'il a complètement cessé de bouger, c'est-à-dire si toutes les parties du corps restent immobiles (pattes, abdomen, tête et antennes). Lorsqu'ils sont morts, les acariens *O. nitens* ont tendance à avoir leurs pattes enroulées sous eux et ils pourraient changer de couleur, même si cela ne se produit pas généralement. On devrait veiller à distinguer les

adultes morts des carapaces rejetées au moment de la mue; ces dernières sont translucides et fripées. Si des adultes ou des descendants morts sont observés après l'extraction à la chaleur, il faudrait les consigner et il faut les inclure à la fois dans les décomptes de « survie » et les calculs des paramètres⁴⁵, tandis que les acariens morts observés avant l'extraction à la chaleur ne doivent pas être inclus dans les décomptes des survivants définitifs. Tous les acariens manquants sont considérés comme morts et ne doivent pas être inclus dans le décompte des survivants, en supposant que ces acariens sont morts et décomposés avant l'extraction.

Les récipients d'essai, quelles que soient les concentrations, devraient être traités au hasard. En effet, le dénombrement peut devenir plus ou moins précis. À la fin de l'essai, on doit analyser les répétitions supplémentaires de chaque sol d'essai (y compris le sol témoin négatif et, le cas échéant, le sol de référence) préparées aux fins des analyses physicochimiques, en vue de déterminer leur pH et leur teneur en humidité (v. 4.6). Il faudrait également effectuer à ce moment-là des analyses afin de déterminer les concentrations d'autres composants chimiques (contaminants) en utilisant les répétitions supplémentaires préparées pour chaque sol d'essai (v. 4.6).

4.8 Paramètres et calculs

Pour chaque essai, il faut calculer le taux de survie des acariens adultes dans chaque récipient d'essai à la fin de l'essai. Le taux de survie moyen (\pm ET) pour tous les acariens adultes exposés à chaque concentration (y compris le sol témoin négatif et, s'il

⁴⁴ La méthode de flottation décrite dans EC (2014a) peut être utilisée pour vérifier l'efficacité de la technique d'extraction à la chaleur. Pour cette méthode, le sol extrait à la chaleur est transféré dans une boîte de Petri en verre. On ajoute de l'eau désionisée à la boîte de Pétri et on agite ou remue légèrement la boue à l'aide d'une tige en verre. Les acariens adultes et les descendants flottent à la surface, et la boîte est placée sous un microscope afin de les compter.

⁴⁵ Après l'extraction à la chaleur du sol, tous les acariens adultes et leurs descendants observés dans le bocal de collecte (c.-à-d. la partie inférieure) du dispositif d'extraction à la chaleur, qu'ils soient vivants ou morts, sont inclus à la fois dans le décompte des adultes vivants

et le calcul des paramètres liés à la production des descendants ayant survécu. Il en est ainsi parce que, pendant l'extraction à la chaleur, les acariens doivent être vivants pour pouvoir se déplacer dans le sol jusqu'à la chambre inférieure du dispositif d'extraction à la chaleur. Tout organisme ayant survécu à l'exposition au sol se déplacera donc à travers le sol jusqu'au bocal de collecte situé en dessous. Par la suite, les organismes expérimentaux présents dans le bocal de collecte du dispositif d'extraction à la chaleur pourraient se dessécher et mourir; ou si les organismes expérimentaux étaient recueillis et conservés (p. ex., dans de l'alcool) avant d'être comptés, il serait alors impossible de distinguer les organismes vivants des organismes morts.

est utilisé, le sol de référence) doit aussi être calculé et consigné à la fin de l'essai, à partir des données sur la survie recueillies pour toutes les répétitions (p. ex., moyenne des répétitions de chaque traitement).

Le paramètre de reproduction est fondé sur le nombre de descendants qui ont survécu dans chaque répétition et dans chaque traitement pendant l'essai. Une réduction importante de ce nombre est considérée comme indicative d'un effet toxique néfaste du traitement sur le succès de reproduction des acariens adultes. La valeur moyenne (\pm ET) du nombre de descendants ayant survécu dans le sol d'essai après 28 jours doit être établie et consignée pour chaque traitement, y compris les sols de référence et les sols témoins négatifs.

Le plus souvent, un plan d'expérience type comporte l'un des deux scénarios suivants :

- i) *Lieux d'échantillonnage* multiples – dans ce cas, on compare les réponses obtenues pour un ou des lieux d'échantillonnage à l'étude avec celles obtenues pour le lieu d'échantillonnage servant de *site de référence*⁴⁶, pour d'autres lieux d'échantillonnage ou pour le sol témoin (essai à concentration unique). On a souvent recours à des tests d'hypothèse dans les évaluations statistiques, et le résultat habituel de ces tests est que, d'un lieu à un autre, la réponse est soit « différente », soit « analogue » (v. 5.6.1).

- ii) Concentrations multiples d'un sol d'essai – dans ce cas, on mélange le sol d'essai avec un sol de référence ou un sol témoin (v. 5.3), ou on l'*enrichit* avec une substance chimique à diverses concentrations (v. 6.2). On doit calculer et consigner la CIp 28 jours (inhibition de la reproduction) (si les données le permettent)⁴⁷.

Dans un scénario comportant de multiples lieux d'échantillonnage, il est essentiel de bien comprendre les forces de divers plans d'étude pour pouvoir appliquer les tests statistiques d'une manière fructueuse. Il faudrait définir clairement les objectifs de l'étude avant la collecte des données et avoir une idée tant de la puissance (capacité de détecter un effet) du plan d'expérience que de la facilité d'interprétation des résultats. En règle générale, on a intérêt à limiter le nombre de comparaisons à faire. À cette fin, on choisit le plus souvent un plan d'expérience et des tests statistiques comportant des comparaisons entre le ou les lieux d'échantillonnage à l'étude et un lieu d'échantillonnage de référence. La puissance du plan d'expérience se trouvera accrue si on peut supposer l'existence d'un gradient (en d'autres termes, les échantillons sont prélevés dans un ordre séquentiel loin de la source ponctuelle de contaminants; v. P.4 dans EC, 2005b). Il pourrait arriver que les objectifs de l'étude et le plan d'expérience ne reçoivent pas l'attention voulue avant la collecte de données, ce qui amène l'expérimentateur à comparer, en guise de compensation, tous les lieux d'échantillonnage possibles et à maximiser ainsi le nombre de comparaisons. Cette façon de faire est vivement

⁴⁶ Un site de référence désigne une zone où l'on trouve un sol non contaminé, à l'abri de l'influence du contaminant à l'étude, c.-à-d. un sol de référence. Un tel sol devrait être échantillonné aux fins des comparaisons décrites à la section 5. Toutefois, en l'absence d'un sol de référence, on peut utiliser un sol témoin négatif.

⁴⁷ Par le passé, les expérimentateurs ont souvent analysé les données quantitatives sur la toxicité sublétales obtenues dans des essais à concentrations multiples en calculant la concentration sans effet observé (*CSEO*) et la concentration minimale avec effet observé (*CMEO*). Ces paramètres statistiques comportent plusieurs inconvénients, dont leur dépendance vis-à-vis des concentrations expérimentales choisies et l'impossibilité de fournir une indication au sujet de la précision (en

d'autres termes, il est impossible d'établir une limite de confiance à 95 % ou autre) (INRE, 1993; EC, 2005b). Compte tenu de ces inconvénients, la CIp constitue le paramètre statistique exigé pour les données sur la reproduction obtenues dans un essai à concentrations multiples avec des acariens. Malgré les critiques récentes blâmant la collecte et la publication de données sur la CSEO et la CMEO et reprochant aux organisations gouvernementales et internationales de ne pas rejeter formellement ces approches et cesser de les recommander (van Dam et coll., 2012), Environnement et Changement climatique Canada a adopté sans équivoque des méthodes basées sur la régression pour les essais toxicologiques en milieu aquatique, sur des sédiments et sur des sols (EC, 2004a, 2005a, 2005b, 2007a, 2007b, 2011a, 2011b, 2014a; Van der Vliet et coll., 2012).

déconseillée, surtout lorsqu'un nombre élevé de lieux d'échantillonnage est en cause, car cela peut avoir des effets indésirables sur les taux d'erreur des *types I* et *II*; l'interprétation des résultats devient souvent plus difficile; une attention indue pourrait être accordée à des comparaisons particulières après la collecte des données⁴⁸. On trouvera en 5.6 et EC (2005b) des indications détaillées sur les tests d'hypothèse applicables au nombre de descendants vivants à la fin de l'essai.

Il faudrait suivre les explications et les conseils fournis dans EC (2005b) pour le calcul de la CIp; des orientations supplémentaires à ce sujet sont données en 4.8.1 ci-après. Au départ, des techniques de régression (v. 4.8.1.1) doivent être appliquées aux données sur les concentrations multiples qu'on entend utiliser pour calculer une CIp⁴⁹. Dans le cas où les données ne se prêtent pas au calcul des CIp 28 jours de la reproduction à l'aide de l'analyse de régression appropriée, il faudrait recourir à une interpolation linéaire de ces données à l'aide du programme ICPIN pour tenter d'obtenir une CIp (v. 4.8.1.2). Bien que le paramètre de reproduction soit le paramètre biologique d'intérêt pour cette méthode, il pourrait se produire des situations où les effets sur la survie des adultes justifient le calcul d'un paramètre *léta* (p. ex., la CLp). Si un tel événement se produit avec les données d'essai, EC (2005b) peut être consulté relativement aux analyses appropriées des données sur la létalité.

Pour avoir une représentation visuelle des données et vérifier si les résultats obtenus sont raisonnables par

rapport aux calculs statistiques ultérieurs, il est vivement recommandé de commencer par porter sur un graphique les données brutes (nombre de descendants vivants) en fonction du logarithme des concentrations. Il faut résoudre tout écart important entre la CIp déterminée de façon approximative et la CIp calculée ultérieurement à l'aide d'un programme informatique. Le diagramme permettrait également de déterminer si on a obtenu une relation logique entre la concentration logarithmique (ou, dans certains cas, la concentration) et l'effet, une caractéristique souhaitable d'un essai valide (EC, 2005b).

4.8.1 CIp

Lorsqu'on exécute un essai à concentrations multiples pour mesurer les effets de l'exposition d'acariens à des mélanges de sol prélevé sur le terrain ou de sol enrichi, on doit utiliser les données *quantitatives* sur l'inhibition de la reproduction pour calculer la CIp (v. paragraphes d'introduction de la sous-section 4.8 et la sous-section 6.2). La CIp est une estimation quantitative de la concentration causant un pourcentage précisé de réduction du nombre moyen de descendants produits par les acariens adultes pendant l'essai.

La CIp est calculée sous forme de pourcentage de réduction (p. ex., CI25 ou CI20, qui correspondent à des taux de réduction de 25 % ou de 20 %, respectivement). C'est l'expérimentateur qui choisit la valeur de *p*, mais on privilégie actuellement 25 % et 20 %. On doit aussi inclure les limites de confiance à 95 % de toute CIp calculée et consignée.

⁴⁸ Zajdlik & Associates Inc. (2010) fait observer ce qui suit à la défense de l'application d'un test global d'hypothèse : « Trop souvent, un écart dans les données monopolise l'attention de l'analyste, qui entreprend alors d'appliquer un test statistique afin de "valider" cet écart. C'est ce qu'on appelle une surexploitation des données, et les conclusions fondées sur cette approche analytique sont suspectes. » Ce même problème s'observe dans les plans d'étude mal définis.

⁴⁹ La régression est la méthode privilégiée pour estimer la CIp. Elle consiste à ajuster mathématiquement les données à un modèle choisi et à calculer ensuite le paramètre statistique à l'aide du modèle qui décrit le mieux la relation entre la concentration d'exposition et la réponse. Des techniques de régression non linéaire ont été recommandées initialement par Stephenson et coll. (2000)

pour diverses raisons, notamment la relation qui existe entre la concentration d'exposition et la réponse des acariens sur le plan de la reproduction est généralement non linéaire, l'*hétéroscédasticité* des données est rarement atténuée par transformation; la technique de simulation bootstrap plus courante comporte plusieurs limitations pour ces types de données, et la régression non linéaire peut convenir si on est en présence d'un phénomène d'hormèse. Lorsqu'on utilise des techniques mathématiques standard, il est possible de décrire correctement une régression en des termes qui fournissent des renseignements utiles à d'autres personnes, de prévoir les effets aux concentrations faible et élevée et d'estimer les intervalles de confiance. Par ailleurs, on peut facilement remédier aux lacunes de la méthode de lissage et d'interpolation (EC, 2005b).

Dans les analyses relatives à la reproduction, le nombre de descendants produits dans chaque répétition doit servir au calcul du nombre moyen de descendants qui ont survécu par traitement (concentration), par rapport au nombre moyen obtenu dans les répétitions de *sol témoin négatif*. On inscrit zéro pour le nombre de juvéniles dans une répétition si tous les acariens adultes de cette répétition sont morts avant d'avoir produit des descendants. Si, pendant l'essai, un acarien adulte meurt après s'être reproduit, le nombre de descendants doit être utilisé dans les analyses. Si aucun descendant n'a survécu dans une répétition (récipient d'essai), on inscrit zéro dans le calcul effectué pour obtenir le nombre moyen de survivants dans le traitement (concentration). Si aucun descendant n'a survécu dans toutes les répétitions d'une concentration donnée, cette concentration reste incluse dans l'analyse, et on inscrit zéro pour le nombre moyen de juvéniles.

Comme il est indiqué précédemment, il faut calculer et consigner la CIp d'après le nombre moyen de descendants qui ont survécu dans chaque traitement (si les données le permettent) à la fin d'un essai à concentrations multiples de 28 jours avec *O. nitens*. Ces calculs doivent être effectués à l'aide des méthodes d'analyse de régression linéaire ou non linéaire appropriées (v. 4.8.1.1). Toutefois, si les analyses de régression fournissent des CIp inacceptables d'après le nombre moyen de descendants produits, il faudrait utiliser le programme ICPIN décrit en 4.8.1.2. Il faut déclarer tout mode opératoire appliqué aux données, les détails concernant toute transformation des données

ainsi que la méthode statistique utilisée pour le calcul de la CIp.

4.8.1.1 Analyse de régression

Une fois terminé l'essai définitif à concentrations multiples de 28 jours, on doit calculer par analyse de régression la CIp (et ses limites de confiance à 95 %) d'après le nombre moyen de descendants vivants produits dans chaque traitement, à la condition que les hypothèses ci-dessous soient satisfaites. Un certain nombre de modèles permettent d'évaluer par régression les données sur la reproduction (tests statistiques quantitatifs). Les modèles proposés comprennent un modèle linéaire et les quatre modèles de régression non linéaire suivants : exponentiel, gompertzien, logistique et *hormético-logistique*⁵⁰ (v. 6.5.8 dans EC, 2005b). Pour que les méthodes de régression puissent être utilisées, les données doivent satisfaire aux hypothèses de *normalité* et d'*homoscédasticité*. Il est fortement conseillé de consulter EC (2005b) pour des orientations additionnelles au sujet de l'application générale des techniques de régression linéaire et non linéaire à l'analyse des données toxicologiques quantitatives⁵¹.

Le processus général d'analyse statistique et de sélection du modèle de régression (linéaire ou non linéaire) le plus approprié pour des données toxicologiques quantitatives est présenté sous forme de logigramme à la figure 2. Le processus de sélection du modèle commence par l'examen d'un diagramme de dispersion ou d'un graphique linéaire des données d'essai afin de déterminer la forme de la courbe concentration-réponse. On compare ensuite

⁵⁰ On pourrait détecter une réaction hormétique (une hormèse) à une ou des concentrations sublétales parmi les plus basses, c'est-à-dire une amélioration de la performance des organismes qui y sont exposés par rapport à celle des organismes dans le sol témoin négatif (v. 10.3 dans EC, 2005b). Par exemple, le nombre de descendants obtenu dans un sol à faible concentration pourrait être plus élevé que celui obtenu dans le traitement témoin. Il ne s'agit pas d'un défaut dans la conduite de l'essai. On est plutôt en présence d'un phénomène biologique réel. Pour calculer la CIp lorsque ce phénomène se produit, il faudrait analyser les données à l'aide du modèle hormétique. Les effets hormétiques sont inclus dans la régression, mais ils ne biaisent pas l'estimation de la CIp. Une CI25 estimative représenterait

toujours une réduction de 25 % de la performance par rapport à celle observée dans le sol témoin.

⁵¹ Parmi les conseils fournis dans EC (2005b), on compte l'utilisation d'un progiciel de statistiques polyvalent (le SYSTAT), mais c'est dans le CETIS (progiciel conçu à des fins écotoxicologiques) qu'on trouvera les modèles d'analyse de régression décrits ici. On peut se procurer la dernière version du SYSTAT auprès de SYSTAT Software, Inc.; site Web : www.systatsoftware.com/products/Systat. Pour obtenir la dernière version du CETIS, s'adresser à Tidepool Scientific Software; site Web : www.tidepool-scientific.com/Cetis/Cetis.

cette forme aux modèles disponibles afin de choisir un ou des modèles convenant le mieux aux données. Ce ou ces modèles sont ensuite examinés plus en détail (v. figure O.1, annexe O de EC, 2005b, pour un exemple de cinq modèles potentiels).

Une fois le ou les modèles appropriés choisis en vue d'un examen plus approfondi, on vérifie les hypothèses de normalité et d'homoscédasticité des *résidus*. Si les résultats de l'application de la technique de régression à un ou plusieurs des modèles examinés satisfont aux hypothèses, on examine les données (et la régression) afin de détecter la présence éventuelle de valeurs aberrantes. Lorsque c'est le cas, on devrait examiner soigneusement les conditions expérimentales et les notes prises pendant l'essai, à la recherche d'une erreur humaine éventuelle. On devrait aussi effectuer l'analyse avec et sans ces valeurs aberrantes et comparer les résultats des deux analyses afin d'évaluer l'effet de ces valeurs sur la régression. On doit ensuite décider s'il faudrait exclure les valeurs aberrantes de l'analyse finale. La décision devrait être fondée sur un examen de la variation biologique naturelle et des phénomènes biologiques susceptibles d'être à l'origine de l'apparente anomalie. On trouvera à la sous-section 10.2 de EC (2005b) d'autres indications relatives aux valeurs aberrantes et aux observations inhabituelles. En l'absence de valeurs aberrantes ou si aucune valeur aberrante n'a été exclue de l'analyse finale, le modèle à privilégier est celui qui présente la plus petite erreur quadratique moyenne résiduelle⁵². Il est conseillé de demander l'avis d'un statisticien qui connaît bien la question des données aberrantes.

La normalité devrait être évaluée à l'aide du test de Shapiro-Wilk, décrit dans EC (2005b). On peut aussi tracer un diagramme de probabilité normale des résidus pendant l'analyse de régression, mais il n'est pas recommandé d'utiliser cette méthode en guise de test unique de normalité, car la détection d'une distribution « normale » ou « non normale » fait

intervenir une évaluation subjective de la part de l'utilisateur. Si les données ne sont pas distribuées normalement, il est conseillé d'essayer un autre modèle, de demander l'avis d'un statisticien au sujet du choix du modèle ou d'utiliser la méthode d'analyse par interpolation linéaire (à l'aide du programme ICPIN, v. 4.8.1.2), qui est moins souhaitable.

Pour évaluer l'homoscédasticité des résidus, on devrait utiliser le test de Levene décrit dans EC (2005b) et examiner les graphiques des résidus par rapport aux valeurs réelles et prévues (estimées). Le test de Levene indique clairement si les données sont homogènes (p. ex., comme dans la figure O.2A, annexe O de EC, 2005b) ou non. Si les données (selon le test de Levene) présentent une *hétéroscédasticité* (c.-à-d. si elles ne sont pas homogènes), il faudrait examiner les graphiques des résidus. Si on observe un changement important dans la variance et que les graphiques des résidus sont incontestablement en forme d'éventail ou de « V » (on trouvera un exemple à la figure O.2B, annexe O de EC, 2005b), il faudrait répéter l'analyse des données à l'aide de la méthode de régression pondérée. Pour pondérer les données, on divise habituellement par l'inverse de la variance, mais d'autres méthodes sont possibles. Avant de choisir la régression pondérée, on compare l'erreur type de la CIp à celle obtenue par la méthode de régression non pondérée.

Si la différence entre les deux erreurs types est de $>10\%$ ⁵³, la régression pondérée est à privilégier. Toutefois, si la différence entre les erreurs types obtenues par les méthodes de régression pondérée et non pondérée est de $<10\%$, il faudrait alors demander l'avis d'un statisticien au sujet de l'utilisation d'autres modèles, compte tenu des données d'essai, ou analyser de nouveau les données par la méthode d'interpolation linéaire (à l'aide du programme ICPIN, v. 4.8.1.2), qui est moins

⁵² On peut aussi utiliser le critère d'information d'Akaike (ou l'équivalent, comme le critère bayésien d'information) pour déterminer le meilleur ajustement du modèle.

⁵³ Ce pourcentage n'est qu'une valeur empirique. Il existe des tests objectifs pour vérifier l'amélioration apportée

par la pondération, mais ils dépassent la portée du présent document. La pondération ne devrait être utilisée qu'en cas de besoin, car elle pourrait introduire des complications supplémentaires dans la modélisation. Il faudrait demander l'avis d'un statisticien lorsque la pondération s'avère nécessaire.

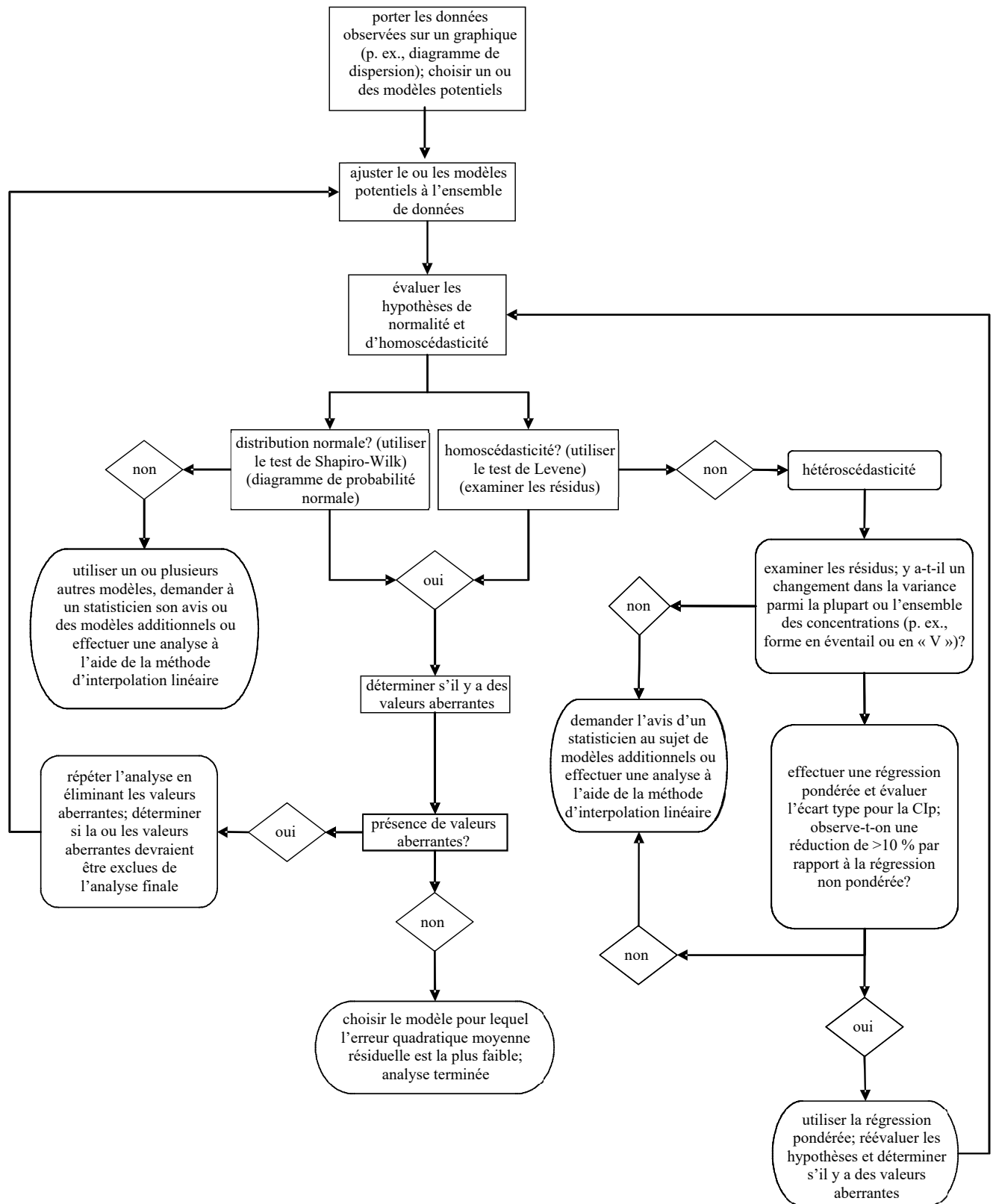


Figure 2 Logigramme du processus général d'analyse statistique et de sélection du modèle le plus approprié pour des données toxicologiques quantitatives (adaptation du logigramme présenté dans Stephenson et coll., 2000)

souhaitable. On compare les régressions pondérée et non pondérée pour chacun des modèles retenus, jusqu'au choix final du modèle (à savoir le modèle et la régression constituant le meilleur choix). L'absence de divergence peut parfois indiquer que le modèle est incorrect ou inapproprié (on trouvera un exemple à la figure O.2C, annexe O de EC, 2005b). Encore une fois, il est fortement conseillé de demander l'avis d'un statisticien au sujet de l'utilisation de modèles additionnels.

Les paramètres estimés par régression doivent être encadrés par les concentrations utilisées dans l'essai; l'extrapolation des paramètres au-delà de la concentration d'essai maximale ne constitue pas une pratique acceptable (EC, 2005b).

4.8.1.2 Interpolation linéaire à l'aide du programme ICPIN

Si on ne réussit pas à obtenir une valeur acceptable de la CIp de la reproduction (c.-à-d. si les hypothèses de normalité et d'homoscédasticité ne peuvent être satisfaites) à l'aide des analyses de régression des valeurs des paramètres (v. 4.8.1.1 susmentionnée), on devrait appliquer la technique de l'interpolation linéaire à l'aide du programme informatique ICPIN. Ce programme public (Norberg-King, 1993; USEPA, 1995, 2002) fait partie de la plupart des progiciels utilisés en *écotoxicologie*, y compris TOXSTAT (1996) et CETIS. L'USEPA fournit également un mode d'emploi clair qui facilite l'utilisation du programme (Norberg-King, 1993)⁵⁴. (Signalons que le programme ICPIN était autrefois connu sous le nom de BOOTSTRP.)

Pour procéder aux analyses à l'aide du programme ICPIN, il n'est pas obligatoire de faire appel à un nombre égal de répétitions par concentration. On

estime la CIp en lissant au besoin les données, puis en se servant des deux points voisins de la CIp choisie (USEPA, 1995, annexe L; USEPA, 2002, annexe M). Il est impossible de déterminer la CIp sans avoir une concentration d'essai plus faible et une autre plus élevée que la CIp; ces deux concentrations devraient avoir un effet suffisamment rapproché de la valeur choisie de p, de préférence avec un écart de ≤ 20 %. Le programme actuel ne comportant pas d'échelle logarithmique pour les concentrations, les utilisateurs canadiens doivent saisir les concentrations sous forme de logarithmes. Certains progiciels du commerce effectuent cette transformation (option générale), mais on devrait s'assurer que les données conservent leur forme logarithmique quand on passe au programme ICPIN. Étant donné que les méthodes habituelles ne seraient pas valides, le programme ICPIN estime les limites de confiance au moyen d'une technique « bootstrap » spéciale qui permet à l'ordinateur d'effectuer un grand nombre de rééchantillonnages à partir des mesures originelles. L'expérimentateur doit préciser ce nombre, qui peut être compris entre 80 et 1 000. On recommande ici qu'il soit de ≥ 400 , mais 1 000 serait encore plus souhaitable⁵⁵. S'il y a absence de juvéniles vivants pour plusieurs concentrations élevées adjacentes, seule la concentration la plus faible de la série devrait être utilisée dans l'analyse (c.-à-d. la concentration la plus proche du milieu de la série de concentrations utilisée dans l'essai). Normalement, l'inclusion de concentrations additionnelles ne présente aucun intérêt particulier puisque ces concentrations n'apportent rien à l'analyse (les données consistent seulement en un nombre nul de descendants).

En plus de déterminer et de consigner les CIp obtenues par ordinateur pour la reproduction des acariens à la fin de l'essai, l'expérimentateur devrait

⁵⁴ Les instructions fournies dans Norberg-King (1993) prêtent parfois à confusion sur ce qu'est une « répétition ». Le terme est utilisé de telle façon qu'il s'appliquerait au nombre d'organismes individuels d'un même récipient. Ce flou terminologique ne nuit en rien au bon fonctionnement du programme. Certains programmes du commerce se sont avérés moins conviviaux pour la saisie des données et l'analyse.

⁵⁵ Étant donné que le programme ICPIN présente

certaines lacunes, son utilisation n'est recommandée ici que dans les cas où la régression ne fournit pas une CIp acceptable. Sa méthode d'interpolation n'est pas optimale, car elle est sensible aux particularités des deux concentrations utilisées. Le programme ne convertit pas les concentrations en logarithmes, ce qui conférerait une valeur légèrement plus élevée à la CIp. En modifiant la méthode bootstrap, on a réglé le problème de l'étroitesse de l'intervalle de confiance, mais les méthodes de régression conviennent mieux à l'estimation de la CIp et ses limites de confiance à 95 % (EC, 2005b) (v. 4.8.1.1).

construire un diagramme du pourcentage de réduction du nombre de descendants en fonction du logarithme de la concentration, et ce, afin de vérifier les estimations mathématiques et de disposer d'une évaluation visuelle de la nature des données (EC, 2005b).

Si le programme ICPIN est utilisé lorsqu'il y a un effet hormétique, une technique de lissage inhérente au programme pourrait changer la valeur témoin et biaiser l'estimation de la CIp. En conséquence, avant de procéder à l'analyse statistique, on devrait remplacer arbitrairement les valeurs hormétiques aux faibles concentrations par la valeur témoin. Cette façon de procéder est considérée comme un expédient provisoire, tant qu'une meilleure approche ne sera pas mise au point (v. Option 4, sous-section 10.3.3 de EC, 2005b). La correction est apportée pour toute concentration d'essai dans laquelle l'effet moyen (c.-à-d. la *moyenne géométrique* des moyennes des répétitions) est plus grand (« meilleur ») que la moyenne pour le témoin. Aux fins de cette correction, on remplace le nombre moyen de descendants observés dans les répétitions à la concentration hormétique (il peut y en avoir plus d'une) par la moyenne des répétitions dans le témoin. La moyenne géométrique pour la ou les concentrations en question sera alors identique à celle obtenue pour le témoin.

4.9 Essais avec un toxique de référence

On emploie couramment un toxique de référence pour évaluer, dans des conditions d'essai normalisées, la sensibilité relative d'une fraction de la population d'acariens adultes d'un élevage particulier (v. 2.3.9) dans lequel on choisira les organismes expérimentaux aux fins de l'essai définitif (il peut y en avoir plus d'un) de toxicité d'un sol. Les essais avec un toxique de référence servent également à démontrer la précision et la fiabilité des données obtenues par le laboratoire pour le toxique en question, dans des conditions d'essai normalisées, ainsi que la compétence technique du personnel du laboratoire qui effectue l'essai (EC, 1995). Un essai avec un toxique de référence, réalisé

conformément aux conditions et modes opératoires décrits ici, doit être effectué selon l'une ou l'autre des fréquences suivantes :

- i) un essai avec un toxique de référence à concentrations multiples au moins deux fois par an⁵⁶, avec des organismes provenant des élevages destinés à l'essai définitif (v. 2.3);
- ii) un essai avec une concentration témoin positive effectué en même temps que chaque essai (v. 2.3.9 et annexe H).

Le laboratoire qui choisit de vérifier la sensibilité de ses élevages par rapport à un toxique de référence dans un essai de toxicité de référence à concentrations multiples devrait réaliser ces essais au moins une fois tous les six mois. Tout essai toxicologique de référence peut être effectué parallèlement à un essai définitif de toxicité d'un sol à l'aide d'organismes provenant du même élevage synchrone, si le nombre d'organismes synchrones le permet.

La présente sous-section traite des conditions et modes opératoires applicables aux essais toxicologiques de référence à concentrations multiples exécutés parallèlement à un essai de toxicité d'un sol de 28 jours avec *O. nitens*, ainsi qu'aux essais visant à déterminer si les élevages de l'espèce qu'on prévoit utiliser dans des essais de toxicité d'un sol sont acceptables et appropriés. Ces conditions et modes opératoires devraient par ailleurs être utilisés pour évaluer la précision intralaboratoire lorsqu'un laboratoire s'apprête pour la première fois à appliquer la présente méthode d'essai biologique (v. 2.3.1 et 2.3.9).

Dans le cas de la première option d'essai avec un toxique de référence, il faut effectuer un essai toxicologique de référence sous forme d'essai à concentrations multiples *en conditions statiques* en utilisant le paramètre de reproduction. Les conditions et modes opératoires décrits dans la présente sous-section pour réaliser un essai de 28 jours sur la reproduction doivent s'appliquer à

⁵⁶ En règle générale, Environnement et Changement climatique Canada préconise des essais toxicologiques de référence mensuels (EC, 2004a); toutefois, comme les élevages doivent être synchrones pour les acariens décrits

dans la présente méthode, le nombre d'organismes disponible pour des essais réalisés à cette fréquence est limité.

chaque essai toxicologique de référence. Les conditions et modes opératoires additionnels décrits ailleurs dans la présente section pour un essai à concentrations multiples sur des échantillons de sol d'essai s'appliquent également aux essais toxicologiques de référence, tout comme les méthodes décrites à la section 6 pour la préparation et la mise à l'essai d'un sol témoin négatif enrichi avec une substance chimique. Pour de plus amples renseignements, le lecteur devrait consulter cette section. Le document d'orientation d'Environnement Canada sur l'utilisation d'un sédiment témoin enrichi (dopé) avec un toxique de référence (EC, 1995) fournit des renseignements utiles qui s'appliquent également aux essais décrits ici.

L'essai de toxicité de référence à concentrations multiples doit être effectué en utilisant les mêmes récipients d'essai que ceux utilisés pour les essais définitifs (v. 3.2.2), avec le même volume de sol (c.-à-d. ≥ 3 cm de sol; v. 4.1) à la teneur en humidité optimale. Il faut prévoir ≥ 5 récipients d'essai de répétition par concentration de toxique de référence pour le sol témoin négatif. Le nombre d'acariens par récipient d'essai doit être de 15, comme il est indiqué en 4.2.

Les procédures de démarrage et de fin d'un essai toxicologique de référence doivent être conformes à celles décrites en 4.2 et 4.7. Les conditions d'essai décrites en 4.3 doivent s'appliquer également. Les organismes expérimentaux doivent être nourris de la manière décrite en 4.5. Les mêmes observations et mesures que celles précisées en 4.6 doivent être effectuées.

Les critères de validité des essais toxicologique de référence sont les mêmes que ceux décrits pour les essais définitifs (v. 4.4). Les résultats d'un essai toxicologique de référence devraient être exprimés en milligrammes de toxique de référence par kilogramme de sol (poids sec).

Les critères convenant au choix du toxique de référence qui sera utilisé dans l'essai parallèle à l'essai définitif de toxicité d'un sol avec des acariens incluent les suivants (EC, 1995) :

- facilité d'obtention à l'état pur;
- longue durée de conservation (stabilité);

- possibilité de répartir uniformément la substance dans un substrat non contaminé;
- bonne courbe concentration-réponse pour les organismes expérimentaux;
- stabilité en solution aqueuse et dans le sol;
- dangers minimes pour l'utilisateur;
- facilité de dosage de la substance avec précision.

L'essai toxicologique de référence exige un minimum de six traitements (c.-à-d. un sol témoin négatif et cinq concentrations du toxique de référence). Il est recommandé d'employer de l'acide borique de qualité « réactif » (H_3BO_3) comme toxique de référence, mais on peut aussi avoir recours à d'autres substances chimiques si elles s'avèrent convenables. On devrait préparer chaque concentration d'essai conformément aux instructions données en 4.1 et 6.2, en utilisant un sol artificiel (v. 3.3.2) comme substrat.

Il faudrait appliquer de façon uniforme les mêmes conditions et modes opératoires décrits ici dans tous les essais toxicologiques de référence (p. ex., ceux effectués deux fois par an) sur un sol témoin négatif enrichi avec de l'acide borique (ou toute autre substance chimique de référence appropriée). Il faudrait effectuer des essais préliminaires pour choisir une série de concentrations d'essai qui permet d'obtenir une CI50 28 jours (v. 6.4).

La Section de l'évaluation biologique et normalisation d'Environnement et Changement climatique Canada présente l'utilisation de répétitions témoins positives dans le cadre de chaque essai définitif de toxicité, réalisé en remplacement des essais courants à concentrations multiples faisant appel à des toxiques de référence. Ainsi, la deuxième option d'essai avec un toxique de référence proposée ici consiste à inclure des répétitions d'une concentration unique d'un toxique connu, qui suscite une réponse partielle uniforme, chaque essai définitif servant de témoin positif. L'utilisation de témoins positifs consiste à exposer les organismes d'essai à des conditions comparables à celles d'un témoin négatif (même nombre de répétitions, même nombre d'organismes par répétition, mêmes récipients et conditions d'essai, etc.), sauf qu'ils sont exposés à une concentration unique d'un toxique connu. Cette option pourrait être plus réalisable et plus pratique dans le cas des essais de toxicité à long terme de type « sublétaux » et « cycle de vie », notamment

l'essai de reproduction de 28 jours mené sur *O. nitens*, décrit dans la présente méthode d'essai.

S'il est choisi, l'essai toxicologique traditionnel de référence à concentrations multiples doit être effectué deux fois par an. Toutefois, l'autre possibilité consiste à effectuer des répétitions d'un sol témoin positif en même temps que chaque essai toxicologique définitif effectué. Cette approche pourrait offrir plusieurs avantages : elle est économique (réduction des efforts et des ressources); elle reflète une réponse des organismes sous-échantillonnés du lot (groupe) utilisé pour les essais; et elle peut mesurer les mêmes paramètres dans la même matrice et pendant la même durée que l'essai définitif, surtout pour les essais de toxicité sublétales du sol menés à long terme).

Il faudrait choisir le toxique pour la concentration témoin positive en fonction des mêmes critères de sélection que ceux utilisés pour un essai toxicologique de référence à concentrations multiples et employer de l'acide borique de qualité « réactif » (H_3BO_3). Il faut utiliser une seule concentration connue pour susciter une réponse partielle constante (par rapport aux essais toxicologiques de référence traditionnels réalisés avec des concentrations multiples pour saisir une gamme d'effets, p. ex., absence totale de reproduction ou absence d'effet sur la reproduction). Les répétitions témoins positives doivent être préparées en utilisant les mêmes récipients d'essai que ceux utilisés pour les essais définitifs (v. 3.2.2), avec le même volume de sol (c.-à-d. ≥ 3 cm de sol; v. 4.1) et une teneur en humidité optimale. Le nombre de récipients d'essai de répétition par échantillon témoin positif doit être ≥ 5 . Le nombre d'acariens par récipient d'essai doit être de 15, comme il est indiqué en 4.2. La concentration témoin positive devrait être préparée conformément aux directives en 4.1 et 6.2 en utilisant un sol artificiel (v. 3.3.2), et les modes opératoires et conditions d'essai doivent être conformes à ceux utilisés dans l'essai définitif, tel qu'il est décrit en 4.2 à 4.7. Dans le cas de l'option avec témoin positif, le paramètre requis est la réponse moyenne (c.-à-d. le nombre de descendants produits) dans la concentration témoin positive, soustraite de la moyenne dans le témoin négatif, divisée par la réponse moyenne du témoin négatif et multipliée par 100 pour obtenir un pourcentage d'inhibition (v. annexe H).

Si cette méthode est retenue, la réponse des témoins positifs (c.-à-d. niveau cible avec effet) doit être définie et doit inclure les limites d'acceptabilité pour chaque paramètre. Les limites d'acceptabilité aux fins de la présente méthode sont synonymes de *limites de contrôle de 95 %* et elles doivent être définies de façon opérationnelle dans chaque laboratoire en prévoyant des limites de variabilité adaptées à l'objectif. Par exemple (v. annexe H), un laboratoire pourrait définir pour son témoin positif que l'acide borique (p. ex., 95 mg H_3BO_3 /kg de sol sec) doit produire une inhibition de 41 % de la production des descendants (c.-à-d. niveau cible avec effet) qui se situe entre les limites de contrôle calculées (c.-à-d. ≥ 27 % et ≤ 56 %), avec un coefficient de variation (CV) de la réponse dans le temps de ≤ 30 %. En conformité avec les résultats actuellement requis pour les essais de toxicité de référence à concentrations multiples, il ne faut pas s'appuyer sur les résultats d'un essai de témoin positif pour déterminer l'acceptabilité des résultats des essais correspondants (c'est-à-dire en tant que critères de validité des essais). Il faut plutôt s'en servir pour surveiller la cohérence dans le temps (moyennes similaires parmi les essais de témoins positifs) ainsi que la précision dans le temps (chevauchement des gammes parmi les essais de témoins positifs). Les valeurs aberrantes dans les réponses des organismes d'essai ou la variabilité extrême dans les réponses obtenues lors des essais individuels doivent servir de base pour déclencher des recherches sur les causes potentielles, comme la sensibilité des élevages, la santé des élevages, les conditions du milieu ou de l'installation ainsi que la performance des techniciens. Les données obtenues des témoins négatifs et des témoins positifs, tout comme les données sur la santé des élevages, devraient être surveillées dans le temps (par une analyse des tendances) afin d'indiquer de manière proactive les changements observés dans la réponse des organismes. L'annexe H donne un exemple de la façon de choisir une concentration témoin positive pour cet essai et de calculer les limites de contrôle.

Pour les essais de toxicité de référence à concentrations multiples et les témoins positifs, lorsque suffisamment de données ont été recueillies (p. ex., au moins cinq points de données) (EC, 1995, 2005b), on doit porter successivement sur une *carte de contrôle* tous les paramètres comparables (c.-à-d. les CI50 pour un toxique de référence particulier

calculées à partir des essais toxicologiques de référence à concentrations multiples, ou le pourcentage de réduction de la production des descendants par rapport au témoin pour une seule concentration du toxique de référence mis à l'essai en tant que témoin positif). Sur chacune de ces cartes, il faudrait porter le logarithme de la concentration sur l'axe vertical, et la date ou le numéro de l'essai, sur l'axe horizontal pour les essais de toxicité de référence à concentrations multiples. Dans le cas des concentrations témoins positives, sur chacune des cartes de contrôle, il faudrait porter le pourcentage de réduction dans la réponse sur l'axe vertical, et la date ou le numéro de l'essai, sur l'axe horizontal (annexe H). On devrait examiner chaque nouveau point de données pour le toxique de référence afin de déterminer s'il se trouve dans les limites de contrôle de 95 % (± 2 ET des valeurs obtenues lors d'essais comparables antérieurs utilisant le même toxique de référence et la même méthode d'essai) (EC, 2004a, 2005a, 2013a, 2014a, annexe H). On doit préparer et mettre à jour une carte de contrôle distincte pour chaque variante opératoire (p. ex., autre toxique de référence) et paramètre. On devrait comparer chaque nouveau point de donnée pour le toxique de référence aux limites établies sur la carte; le résultat lié au toxique de référence est jugé acceptable s'il se trouve à l'intérieur des limites de contrôle de 95 %.

Dans le cas des essais de toxicité de référence à concentrations multiples, on doit se servir du logarithme de la concentration (y compris de la CI50) pour tous les calculs des moyennes et des écarts types et pour tous les diagrammes. On s'assure ainsi que chaque CI50 a été estimée en fonction des logarithmes des concentrations. On peut construire la carte de contrôle en reportant la moyenne et la valeur ± 2 ET en tant que logarithme, ou en convertissant ces données en valeurs arithmétiques et en portant ces dernières sur l'échelle logarithmique de concentration. Différentes approches pour établir une carte de contrôle (p. ex., Levey-Jennings, moyenne mobile) sont acceptables. Dans le cas des concentrations témoins positives, on peut construire la carte de contrôle en reportant la moyenne et la valeur ± 2 ET liée au pourcentage de réduction dans la reproduction par rapport au témoin sur une échelle arithmétique.

Pour chaque paramètre successif du toxique de référence, on devrait recalculer la moyenne des paramètres connus ainsi que les limites de contrôle de 95 % supérieure et inférieure (± 2 ET) jusqu'à ce que les statistiques se stabilisent (EC, 1995, 2004a, 2005a, 2013a, 2014a, annexe H). Les cartes de contrôle peuvent servir à dégager des tendances au fil du temps. Des exemples de tendances qui pourraient être observés sont notamment les suivants : une tendance ascendante ou descendante, plusieurs points successifs d'un côté de la moyenne, des changements qui sont observés à différents moments de l'année et des valeurs successives des points de données situées à l'extérieur des limites de contrôle de 95 % ± 2 ET. Si un point de donnée particulier tombe à l'extérieur de ces limites, il convient de mettre en doute la sensibilité des organismes expérimentaux, de même que l'exécution et la précision de l'essai. Étant donné que cette situation peut se produire dans 5 % des cas par le seul jeu du hasard, un point de donnée aberrante n'est pas nécessairement un signe de sensibilité anormale de l'élevage ou d'une précision insatisfaisante des données toxicologiques. Ce serait plutôt un avertissement. On doit alors procéder à un examen approfondi de tous les modes opératoires et de toutes les conditions d'élevage et d'essai, ainsi que de l'efficacité technique. Selon les constatations, on pourrait devoir reprendre l'essai toxicologique de référence ou la concentration témoin positive, établir un nouvel élevage, choisir des acariens provenant d'un autre élevage ou se procurer une nouvelle population d'organismes expérimentaux d'une source extérieure avant d'entreprendre d'autres essais de toxicité d'un sol.

Le fait que les résultats soient tous à l'intérieur des limites de contrôle de 95 % n'est pas nécessairement un gage de la cohérence des résultats obtenus par le laboratoire. Un laboratoire qui a produit des données historiques extrêmement variables pour un toxique de référence donné aurait des limites importantes; ainsi, un nouveau point de donnée simple pourrait se trouver à l'intérieur des limites, tout en représentant une variation indésirable des résultats de l'essai. Environnement Canada (EC, 1995, 2005b) propose comme limite raisonnable un CV de ≤ 30 %, de préférence de ≤ 20 %, pour la moyenne des valeurs de log (CI50) connues (v. paragraphe précédent). Aux fins de la présente méthode d'essai biologique, on devrait adopter un CV de ≤ 30 % pour les données

historiques moyennes dérivées d'essais toxicologiques de référence ou de témoins positifs avec de l'acide borique.

Une CI50 ou un témoin positif qui tombe à l'extérieur des limites témoins (moyenne \pm 3 ET) révèle presque à coup sûr que l'essai est inacceptable et qu'il devrait être repris après un examen attentif de tous ses aspects. Si les paramètres se situent entre les limites témoins et les limites de contrôle plus de 5 % du temps, cela révélerait une détérioration de la précision. Encore là, l'essai le plus récent devrait être repris après un examen attentif des modes opératoires, des conditions et des calculs.

Les concentrations du toxique de référence (y compris les concentrations uniques utilisées comme témoin positif) dans toutes les solutions mères peuvent être mesurées au moyen d'analyses chimiques appropriées [p. ex., méthodes d'analyse faisant intervenir la spectrophotométrie d'émission atomique à l'aide d'un plasma induit par haute fréquence (SEA/PIHF), pour la concentration du bore]. Pour préparer les concentrations d'essai du toxique de référence dans un sol, on ajoute une quantité mesurée de solution mère au sol témoin négatif⁵⁷ et on mélange soigneusement⁵⁸. Une fois les mélanges de toxique de référence et de sol préparés, il faudrait prélever des aliquotes au moins du sol témoin négatif et des concentrations faible, moyenne et élevée, ou de la concentration unique

utilisée pour un témoin positif⁵⁹. Chaque aliquote devrait être soit analysée immédiatement, soit conservée en vue d'une analyse ultérieure (à la fin de l'essai), si la CI50 28 jours ou la réponse du témoin positif calculée en fonction des concentrations nominales se situe en dehors des limites de contrôle. Le cas échéant, les aliquotes doivent être entreposées dans l'obscurité à 4 ± 2 °C. Ces aliquotes devraient être analysées peu de temps après la fin de l'essai toxicologique de référence. Le calcul de la CI50 28 jours (pour les essais de toxicité de référence à concentrations multiples) ou le pourcentage de réduction dans la réponse par rapport au témoin (pour les concentrations témoins positives) devrait se fonder sur les concentrations mesurées si celles-ci sont passablement différentes (soit ≥ 20 %) des valeurs nominales et si la précision des analyses chimiques est satisfaisante.

Si on utilise de l'acide borique comme toxique de référence pour un essai de toxicité de référence ou un témoin positif, la méthode d'analyse décrite ci-après s'applique (MEE0, 1996).

Un sous-échantillon de 1-5 g de sol enrichi avec de l'acide borique est mis à sécher à 105 °C jusqu'à obtention d'un poids constant. On extrait ensuite une aliquote de 1 g à l'aide d'une solution de CaCl₂ 0,01 M en faisant bouillir une suspension de sol dans 50 mL de cette solution d'extraction et en ajoutant une quantité supplémentaire de cette solution pour

⁵⁷ On trouvera en 6.2, Préparation des mélanges d'essai, un exemple des quantités d'eau d'essai et d'acide borique qui doivent être ajoutées au sol artificiel pour préparer un traitement donné en vue d'un essai toxicologique de référence ou un témoin positif avec une concentration donnée d'acide borique dans un sol artificiel. Les calculs indiqués dans cet exemple montrent la quantité d'eau nécessaire pour ajuster la teneur en humidité du sol artificiel à un pourcentage donné (70 %) de la CRE du sol, en tenant compte du volume de solution mère d'acide borique utilisé dans l'ajustement global de la teneur en humidité du sol.

⁵⁸ Une méthode reconnue consiste à ajouter un volume calculé au préalable de solution mère (à l'aide de pipettes volumétriques ou graduées) dans un flacon Erlenmeyer, à diluer jusqu'à un trait de jauge avec de l'eau désionisée et à ajouter ensuite au sol un volume mesuré de cette préparation. On rince ensuite le flacon 3 fois à l'eau désionisée et on ajoute la rinçure au sol, après quoi on

amalgame soigneusement (pendant ~ 3 min) le mélange de sol et de solution mère à l'aide d'un agitateur mécanique (p. ex., un malaxeur à main avec des fouets en acier inoxydable) jusqu'à obtention d'un sol d'aspect homogène quant à la couleur, à la texture et à la teneur en humidité. Pendant le mélange, le sol que contient le bol du malaxeur devrait être brassé par intermittence à l'aide d'une grosse cuillère en acier inoxydable afin de faciliter l'homogénéisation.

⁵⁹ Si la CI50 de chaque essai avec un toxique de référence doit être fondée 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 d'essai. Toutefois, si la CI50 de chaque essai est fondée sur les concentrations nominales, il est recommandé de prélever et d'analyser, à tout le moins, des aliquotes des concentrations faible, moyenne et élevée.

rajuster le volume final à 50 mL. L'extrait de 50 mL est ensuite filtré à travers un filtre Whatman n° 4, puis dilué jusqu'à obtention d'un volume final de 100 mL. Un échantillon témoin est préparé de la même manière. On analyse ensuite le filtrat par la méthode SEA/PIHF afin de doser le bore élémentaire. On calcule la concentration d'acide borique dans le sol à l'aide de l'équation suivante :

acide borique $\left(\frac{\text{mg}}{\text{mg/kg de poids sec}} \right) =$

$$\frac{\frac{\mu\text{g B}}{\text{mL}}(\text{mesuré}) \times \text{volume final (mL)} \times \frac{\text{PMacide borique}}{\text{PMbore}}}{1\,000 \times \text{poids de l'échantillon (mg poids sec)}} \times 10^6$$

Dans la plupart des cas, le seuil de détection pour l'acide borique dans le sol est de 1 mg d'acide borique par kilogramme de sol (poids sec) (Stephenson, 2003).

Section 5

Modes opératoires particuliers pour la mesure de la toxicité d'un sol ou d'une matière particulaire semblable prélevés sur le terrain

La présente section contient des directives particulières sur la préparation et la mise à l'essai d'échantillons de sol (de site) ou de matière particulaire semblable prélevés sur le terrain. Ces directives s'ajoutent à celles énoncées à la section 4.

Des instructions détaillées sur le prélèvement, la manipulation, le transport, l'entreposage et la préparation d'échantillons de sol aux fins d'essais biologiques sont fournies dans EC (2012). Ce document décrit les modes opératoires généraux applicables aux préparatifs entourant l'échantillonnage, dont les suivants : établissement des objectifs de l'étude; délimitation de la zone d'étude; collecte de données documentaires; levés du site, levés pédologiques et classification écologique du sol; choix des stratégies et des lieux d'échantillonnage; détermination du nombre et de la taille des échantillons à prélever; établissement de procédures adéquates d'*assurance* et de *contrôle de la qualité* (AQ/CQ); facteurs à prendre en considération en matière d'environnement, de santé et de sécurité; conception de plans d'échantillonnage. Des indications y sont également fournies quant au choix des échantillonneurs, au prélèvement d'échantillons par horizon ou en fonction de la profondeur, à la manipulation des échantillons in situ, au choix des récipients à échantillon et au transport des échantillons. On trouve aussi dans EC (2012) les procédures que doit suivre le personnel lors de la réception, de la préparation (séchage, humectation, tamisage, broyage, homogénéisation, reconstitution, caractérisation) et de l'entreposage d'échantillons de sol destinés à des essais biologiques. On y indique également la marche à suivre et les points à examiner en fonction de la nature des contaminants (comme des composés volatils ou instables), des exigences des essais biologiques et des objectifs de l'étude. Des conseils sont fournis sur l'échantillonnage, la manipulation, le transport, l'entreposage et la préparation d'échantillons de sol d'écozones de la forêt boréale, de la taïga et de la toundra, de même que de sols organiques et de sols

prélevés dans des milieux humides. On devrait consulter EC (2012) et suivre les indications qui y sont fournies (en plus de celles que renferme le présent document) lorsqu'on prélève sur le terrain des échantillons de sol et qu'on les prépare en vue d'essais toxicologiques avec des acariens, conformément à la présente méthode.

5.1 Prélèvements d'échantillons

On trouvera dans EC (2012) de nombreux conseils sur les plans d'échantillonnage et les techniques de prélèvement d'échantillons sur le terrain. Ces conseils partent du principe selon lequel on dispose de données sur la caractérisation des propriétés chimiques et pédologiques du lieu à l'étude. Les études sur le terrain de la toxicité d'un sol au moyen d'essais biologiques avec des organismes associés au sol (p. ex., EC, 2004a, 2005a, 2013a, 2014a) font souvent partie d'examen plus vastes englobant l'évaluation et l'assainissement de lieux contaminés (Stephenson et coll., 2008; EC, 2012). Ces examens incluent fréquemment une *batterie d'essais* au cours desquels on évalue la toxicité d'un sol en faisant appel à plus d'un type d'essai et plus d'une espèce expérimentale et qu'on assortit d'essais sur la bioaccumulation de contaminants, d'analyses chimiques, de relevés biologiques de l'épifaune ou de l'endofaune et, parfois, d'une compilation de données géologiques et hydrographiques. Cette approche intégrée peut fournir de l'information plus exacte sur le risque associé à la contamination du sol aux fins de l'évaluation du risque écologique et de la gestion des lieux contaminés (EC, 2012). On peut améliorer les corrélations statistiques des évaluations et réduire les coûts en prélevant simultanément tous les échantillons requis pour ces divers essais, analyses et collectes de données.

On pourrait prélever les échantillons de sol qui seront utilisés dans la présente méthode d'essai biologique (section 4) selon une fréquence régulière (trimestrielle, semestrielle ou annuelle) sur un certain nombre de sites contaminés ou susceptibles d'être

contaminés, aux fins de surveillance et de vérification de la *conformité* aux règlements. Les échantillons pourraient aussi être prélevés en une seule fois ou à diverses occasions, dans le cadre d'études sur le terrain, pour définir la qualité spatiale (horizontale ou verticale) ou temporelle du sol. Les essais biologiques (de toxicité) servent de plus en plus à tous les niveaux de l'évaluation du risque. Selon les objectifs précis de cette évaluation et l'état d'un lieu contaminé, on peut utiliser les données toxicologiques propres à un site pour combler différents besoins, dont les suivants :

- repérer, au moyen d'une analyse préalable du sol, les zones hautement toxiques ou présentant une toxicité sublétales;
- identifier un sol de site (par suite de la détermination de la concentration du ou des contaminants de ce sol) ayant un impact toxique;
- évaluer les effets toxiques létaux ou sublétaux d'un sol contaminé;
- cerner les caractéristiques du sol qui modifient la biodisponibilité;
- établir (en partie) des normes ou des objectifs d'assainissement propres au site;
- évaluer l'efficacité des techniques de biorestauration ou d'assainissement du site;
- surveiller à long terme un lieu assaini (EC, 2012).

EC (2012) renferme d'autres conseils concernant l'application des essais biologiques dans l'évaluation des lieux contaminés, de même que de nombreuses indications sur la définition des objectifs des études et sur l'établissement d'un plan d'étude intégrant des essais biologiques dans l'évaluation et la gestion d'un lieu contaminé.

Un plan d'étude précise les méthodes et stratégies d'échantillonnage ainsi que la marche à suivre pour satisfaire à tous les *objectifs de qualité des données* (OQD). Il renferme notamment les renseignements suivants : OQD; définition de la zone d'étude; collecte de données documentaires; choix et emplacement des lieux d'échantillonnage; choix des

stratégies d'échantillonnage; procédures d'AQ/CQ; facteurs à prendre en considération en matière d'environnement, de santé et de sécurité. La stratégie d'échantillonnage (c.-à-d. le processus par lequel on détermine le type d'échantillons à prélever, le lieu du prélèvement et la méthode de prélèvement) repose avant tout sur les objectifs de l'étude et, accessoirement, sur les caractéristiques du site (pour plus de détails, v. EC, 2012).

Le nombre de lieux d'échantillonnage et le nombre de réplicats à prélever dans chacun sont propres à chaque étude. Le nombre d'échantillons à prélever dépend des objectifs de l'étude, des OQD, du degré souhaité de certitude et de facteurs propres au site. En outre, le nombre de réplicats à prélever est fonction du schéma expérimental applicable aux essais biologiques et, dans la plupart des cas, de contraintes logistiques et budgétaires (p. ex., temps et coûts). On peut recueillir divers types d'échantillons (*ponctuels*, *composites* et *en vrac*), selon les objectifs de l'étude.

Dans le cas des essais biologiques, on prélève habituellement des *échantillons de sol perturbé* – dans ce type d'échantillonnage, les particules du sol se dissocient pendant le prélèvement. Par contre, lorsqu'on prélève des *échantillons de sol intact* (c.-à-d. des *carottes*), les particules de sol et la structure des pores demeurent inchangées. La marche à suivre pour le prélèvement d'échantillons de sol intact aux fins d'essais biologiques est décrite dans EC (2012). Il convient toutefois de préciser que les indications fournies ici s'appliquent principalement au prélèvement d'*échantillons de sol perturbé*.

EC (2012) décrit les modes opératoires propres à la collecte, à la manipulation et à la préparation des échantillons de sol contaminé par des composés volatils ou instables, de même que les modifications applicables à la collecte, au transport, à l'entreposage et à la préparation de ces échantillons et aux analyses de leurs contaminants. En se conformant à ces modes opératoires, on réduira au minimum la perte de ces contaminants, que ce soit pendant l'échantillonnage et la manipulation des sols sur le terrain, le transport des échantillons au laboratoire d'essais toxicologiques ou la période précédant les essais (c.-à-d. pendant l'entreposage, la manipulation ou la préparation des échantillons). Les

questions connexes aux procédures d'AQ/CQ sont également abordées dans EC (2012).

Pour certaines activités de surveillance et d'application réglementaire, on devrait prélever des répliquats multiples (c.-à-d. 5 répliquats ou sous-échantillons d'échantillons ponctuels ou en vrac provenant du même endroit) à chaque lieu d'échantillonnage, y compris dans un ou des lieux de référence. Ces répliquats⁶⁰ fournissent des renseignements sur la variation de la toxicité ou de la biodisponibilité des contaminants du lieu à l'étude et permettent d'établir des comparaisons statistiques sur la toxicité du sol de plus d'un site (EC, 2005b). On peut mesurer la toxicité, pour des acariens, de chacun de ces « vrais répliquats » de sol en tant que répliquat de laboratoire individuel (un seul récipient d'essai par répliquat) ou multiple (plus d'un récipient d'essai par répliquat; v. 5.6.1). Le recours à l'analyse de puissance (v. 5.6.2) à partir des valeurs des paramètres obtenues dans des essais antérieurs de même type, effectués sur des échantillons provenant du même site ou de sites similaires, permettra de déterminer le nombre de répliquats (prélevés sur le terrain ou de laboratoire) à mettre à l'essai. Certains

tests statistiques requièrent un nombre minimal de répliquats. Dans d'autres situations (p. ex., des études préliminaires ou exhaustives sur la répartition spatiale de la toxicité), le plan expérimental pourrait exiger un seul répliquat par lieu d'échantillonnage, auquel cas l'échantillon (y compris le sol de référence ou le sol témoin) doit être homogénéisé et réparti dans 5 récipients de répétition (ou répliquats de laboratoire)⁶¹. Cette dernière approche ne permet pas d'établir la toxicité moyenne en un lieu d'échantillonnage donné, de sorte qu'on ne peut déterminer si un lieu d'échantillonnage est différent du lieu témoin ou de référence, ou de tout autre lieu d'échantillonnage. Cela dit, lorsqu'on utilise les tests statistiques appropriés (v. 5.6.1), on peut comparer statistiquement la toxicité de l'échantillon en question à celle de l'échantillon témoin ou de référence, ou à celle d'échantillons provenant d'autres endroits. Il est important de retenir que toute conclusion au sujet de possibles différences, établie à partir de l'évaluation d'échantillons distincts non assortis de répliquats prélevés sur le terrain, ne doit pas servir à tirer d'autres conclusions concernant les lieux d'échantillonnage.

⁶⁰ Un répliquat est un échantillon prélevé sur le terrain à un même lieu d'échantillonnage afin d'obtenir une estimation de l'erreur d'échantillonnage ou pour améliorer la justesse de l'estimation. Lorsqu'un seul échantillon de sol est prélevé, il est traité comme un répliquat. Les échantillons additionnels provenant du même lieu d'échantillonnage sont considérés comme des répliquats supplémentaires – ils doivent être traités de la même façon, mais entreposés dans des récipients à échantillon distincts (ils ne sont pas regroupés).

⁶¹ L'analyse de puissance effectuée sur les données de reproduction générées à l'aide de cette méthode (v. 5.6.2) a indiqué que, pour cinq répliquats de laboratoire, une taille d'effet de 40 % ou plus peut être détectée de manière fiable (puissance ≥ 80 %). Pour détecter une taille d'effet de 30 % avec la même puissance, huit répliquats sont recommandés. On peut également prévoir un plus grand nombre de répliquats pour satisfaire à des objectifs particuliers de l'étude, comme ceux définis pour le volet I (c.-à-d. les essais préliminaires sur un sol de site) dans le cadre recommandé pour les évaluations toxicologiques à l'appui de l'établissement d'objectifs donné d'assainissement d'un sol renfermant des hydrocarbures pétroliers (GCTÉco, 2006). Ce cadre, qui vise l'évaluation de la toxicité de lieux contaminés, comporte

deux volets; le premier comprend des essais préliminaires sur un sol de site à l'aide d'échantillons de sol non dilués représentatifs du lieu à l'étude. Les essais préliminaires visent les buts suivants : 1) déterminer rapidement si un effet toxique est associé à une exposition à court terme (*toxicité aiguë*) des organismes expérimentaux; 2) en l'absence de *toxicité aiguë*, poursuivre l'essai pour évaluer la *toxicité chronique* associée à une exposition prolongée des organismes au sol de site. L'expérimentateur peut donc choisir d'appliquer le plan d'expérience aux essais à concentration unique décrits dans la présente méthode et préparer des répliquats supplémentaires afin de relever d'éventuelles réactions aiguës (c.-à-d. la mortalité des adultes) tôt dans l'essai. Cette méthode ne sert qu'à déterminer si une réaction aiguë est possible. Elle ne convient pas à la définition des objectifs de décontamination ou d'assainissement. Le volet II du cadre fait appel à des essais à concentrations multiples pour déterminer le degré de toxicité. Comme il est indiqué en 4.1, un essai préliminaire peut s'avérer utile – il est recommandé dans le cadre – pour déterminer la plage des concentrations avec effet (c.-à-d. réduire la plage des concentrations à employer pour un essai définitif de toxicité sublétales).

Quels que soient les objectifs de l'étude, on devrait échantillonner un ou des *sols de référence* (qu'on présume non contaminés) parallèlement à chaque échantillonnage de sol de site (v. 3.5)⁶². Les échantillons de sol de référence devraient être prélevés là où le sol présente des propriétés géochimiques semblables à celles du sol du site à l'étude. Voici certaines des plus importantes propriétés physicochimiques qui devraient être appariées pour ces deux types de sols : granulométrie, teneur en COT, TMO, pH et conductivité. De plus, on pourrait appairer d'autres propriétés, comme la CEC, le carbone inorganique total, le *potentiel d'oxydoréduction* et la CRE (EC, 2012). Dans les cas où la *pollution* (attribuable, p. ex., à des boues d'épuration ou industrielles) est responsable de la teneur élevée en carbone organique des sols d'essai, il pourrait ne pas être indiqué d'appairer la teneur en COT ou la TMO. Pour faciliter le choix des sites d'échantillonnage d'un sol de référence approprié, il est utile de procéder à des études préliminaires afin d'évaluer la toxicité et les propriétés géochimiques du sol de la ou des régions préoccupantes et de lieux voisins. On trouvera dans EC (2012) d'autres conseils sur l'échantillonnage d'un sol de référence aux fins d'essais biologiques, de même que les procédures à suivre lorsqu'on ne peut trouver un tel sol.

On peut recueillir des échantillons de boues ménagères ou industrielles (p. ex., boues d'épuration, stériles miniers égouttés ou biosolides d'un clarificateur industriel ou d'un bassin de décantation) pour en évaluer les effets toxiques sur les acariens et effectuer des analyses des contaminants ou des propriétés géochimiques. On peut également prélever des échantillons d'autres déchets particuliers dont on envisage l'épandage sur le sol, afin d'en évaluer la toxicité et les propriétés physicochimiques. EC (2012) renferme des indications sur les points précis à prendre en considération en vue de l'échantillonnage d'amas de déchets.

Un plan d'échantillonnage constitue un élément essentiel du plan d'étude. On y décrit les procédures détaillées à suivre pour prélever, manipuler et préparer les échantillons in situ (au besoin) et pour les emballer, les étiqueter, les entreposer (le cas échéant) et les transporter. Avant l'échantillonnage, il est important d'avoir en main une description complète du sol à échantillonner. De plus, les sols devraient être décrits en détail à l'échelle du site à l'étude. Au Canada, les sols sont classés selon le Système canadien de classification des sols (SCCS). Ceux échantillonnés aux fins d'essais biologiques devraient être classés au moins jusqu'à l'échelle du sous-groupe du SCCS, conformément aux indications fournies dans EC (2012). On trouvera à l'annexe E de EC (2012) des informations détaillées sur le SCCS et sur les éléments fondamentaux de l'identification taxinomique des sols.

Les modes de prélèvement d'échantillons (ponctuels, en vrac ou composites) dépendent des objectifs de l'étude et de la nature du sol (ou autre matière particulière semblable) à échantillonner. On utilise fréquemment une pelle, une tarière ou un carottier (de préférence en acier inoxydable) pour prélever les échantillons. Les pelles et les truelles sont les outils le plus couramment utilisés pour prélever d'importants volumes de sol; toutefois, il faut s'assurer que l'échantillon est représentatif et exempt de biais (p. ex., les prélèvements doivent se faire à la même profondeur ou dans le même horizon). Les carottiers, emporte-pièce, cadres de coupe et échantillonneurs cylindriques sont des instruments plus précis, mais ils conviennent moins à l'extraction d'importants volumes de sol. Pour prélever des échantillons en profondeur, il serait plus efficace et moins exigeant en main-d'œuvre d'utiliser une tarière. Les dispositifs d'échantillonnage les plus courants et les procédures qu'il faudrait suivre pour échantillonner un sol sont décrits dans EC (2012).

Au Canada, la plupart des sols des écozones forestières ou non agricoles sont fortement stratifiés en horizons pédologiques. La structure et la chimie

⁶² Idéalement, les échantillons de sol de référence sont prélevés près du ou des sites préoccupants. Ce sol devrait posséder des caractéristiques géochimiques (p. ex., texture, teneur en COT, TMO, pH) semblables à celles du ou des sols d'essai prélevés sur le terrain, mais être exempt de contaminants anthropiques. Il n'est pas rare

que les sites de référence adjacents soient eux aussi contaminés, jusqu'à un certain point, par des substances chimiques anthropiques. Le sol de référence peut parfois se révéler toxique ou être inutilisable dans un essai de toxicité d'un sol à cause de ses propriétés physiques, chimiques ou biologiques naturelles.

de ces horizons peuvent varier grandement et influencer différemment sur la biodisponibilité et la toxicité des contaminants pour la pédofaune. La couche supérieure (horizon A) est celle qui est le plus souvent échantillonnée aux fins d'essais biologiques. Elle renferme le plus de matière organique et c'est là que se déroule la plus grande partie de l'activité biologique des sols minéraux. Selon les objectifs de l'étude, on peut aussi prélever des échantillons de litière (*horizon L*), de matières fulviques/humiques (*horizons F et H*) (p. ex., un terrain boisé) ou de matière organique superficielle (horizon O) des sols minéraux (p. ex., dans la toundra), le cas échéant. Pourraient également être échantillonnés l'horizon subsuperficiel B et (quoique moins fréquemment) l'horizon C. Dans la mesure du possible, les sols échantillonnés dans les écozones de la région boréale et de la taïga pour évaluer leurs effets sur les acariens (décrits dans le présent document) doivent être prélevés par horizon pédologique distinct. Il est recommandé d'échantillonner en fonction de la profondeur des sols dont les horizons pédologiques sont indistincts (p. ex., dont les horizons superficiels ont été mélangés ou perturbés par des activités anthropiques). Avant d'échantillonner un sol par horizon, la classification du profil pédologique du site doit d'abord avoir été établie, comme il est indiqué plus haut et dans EC (2012). Lorsqu'on échantillonne un sol par horizon, il faudrait éviter toute dilution de la contamination, en particulier lorsque celle-ci ne s'étend verticalement que dans une partie d'un horizon. Dans un tel cas, l'horizon peut être échantillonné jusqu'à une certaine profondeur seulement ou faire l'objet de deux échantillonnages à deux profondeurs différentes (EC, 2012).

EC (2012) renferme d'autres indications détaillées sur le prélèvement d'échantillons aux fins d'essais toxicologiques. Avant le prélèvement, il faut d'abord délimiter le lieu d'échantillonnage. La surface de l'endroit où chaque échantillon de sol sera prélevé devrait ensuite être débarrassée des débris tels que brindilles, feuilles, pierres, chaume et litière (sauf si l'échantillonnage de l'horizon L est prévu dans le plan de l'étude). Si la surface est recouverte de graminées ou d'autres plantes herbacées, celles-ci devraient être coupées au ras du sol et enlevées avant le prélèvement de l'échantillon. La végétation devrait être éliminée de manière à enlever le moins possible de particules du sol avec les racines. Dans

le cas où la masse racinaire est dense (p. ex., en présence de graminées), il faudrait arracher les racines et les secouer vigoureusement afin de libérer les particules de sol qui y adhèrent. Les échantillons destinés à des essais toxicologiques et à des analyses chimiques devraient être prélevés à une ou plusieurs profondeurs représentatives de la ou des couches préoccupantes (p. ex., couche superficielle ou couches plus profondes de sol ou de sous-sol si on pense que d'anciens dépôts de contaminants peuvent poser des problèmes). Lorsque les sols présentent des horizons distincts (p. ex., sols forestiers non perturbés), on doit les échantillonner par horizon après avoir creusé une fosse (EC, 2012).

Le volume minimal (ou la masse minimale) de sol nécessaire à un essai est fonction des objectifs de l'étude, des conditions du site et du type d'essai à exécuter. Il varie selon le schéma expérimental (p. ex., essai à concentration unique ou à concentrations multiples), les caractéristiques physiques du sol (p. ex., masse volumique apparente, teneur en humidité, quantité de débris dans le sol), la nature des analyses chimiques à exécuter et la distribution des contaminants dans le sol (p. ex., distribution verticale). Avant d'entreprendre un programme d'échantillonnage, on devrait calculer le volume de sol requis par échantillon. Ce calcul devrait tenir compte des quantités exigées pour préparer les répliqués de laboratoire destinés aux essais de toxicité du sol, pour déterminer la granulométrie, la teneur en COT, la TMO et la teneur en humidité et pour procéder à des analyses chimiques particulières. On trouvera dans EC (2012) des recommandations quant au volume de sol à prélever pour des types précis d'essais biologiques. Pour obtenir le volume requis, il est souvent nécessaire de combiner des sous-échantillons prélevés à l'aide du dispositif d'échantillonnage choisi. On devrait suivre les conseils donnés dans EC (2012) pour le regroupement de sous-échantillons sur le terrain. Il faudrait appliquer la même méthode de prélèvement à tous les lieux d'échantillonnage. Les échantillons de chaque horizon doivent être transférés et entreposés dans des récipients distincts, sauf si le profil pédologique a été perturbé par suite de mesures d'assainissement du site.

On peut commencer à préparer les échantillons in situ, avant leur expédition au laboratoire d'essais. Cette préparation peut inclure l'enlèvement à la

main des débris ou des organismes, le séchage à l'air, le tamisage et l'homogénéisation des échantillons. Toutes ces procédures sont décrites en détail dans EC (2012).

5.2 *Étiquetage, transport, entreposage et analyse des échantillons*

Les récipients de transport et d'entreposage des échantillons de sol ou d'une autre matière particulière prélevés sur le terrain doivent être faits d'un matériau inerte non toxique. Le choix du récipient dépend du volume et de l'usage prévu de l'échantillon, de même que du type et de la nature de la contamination du sol. Les récipients doivent être propres et refermables hermétiquement, et ils devraient être faciles à manipuler et suffisamment résistants pour supporter le poids de l'échantillon (EC, 2012). On emploie couramment des sacs en plastique épais [p. ex., 4 mils (~100 µm)] pour le transport et l'entreposage des échantillons. Si on utilise des sacs en plastique, il est recommandé de placer chacun dans un récipient opaque propre (p. ex., une glacière ou un seau en plastique muni d'un couvercle) afin d'éviter que le sac se déchire ou éclate sous l'effet du poids de l'échantillon et pour garder ce dernier dans l'obscurité pendant le transport (ASTM, 2004). Les contenants ou doublures en plastique ne devraient pas être utilisés s'il y a des risques que le plastique altère les caractéristiques du sol (p. ex., risques de lixiviation de composants de la matière plastique dans le sol). L'annexe H de EC (2012) renferme une liste des récipients recommandés pour le transport et l'entreposage des échantillons de sol.

Après l'ajout des échantillons, l'espace occupé par l'air dans le récipient utilisé pour le transport et l'entreposage des échantillons devrait être réduit au minimum (p. ex., en comprimant le sac rempli ou partiellement rempli et en le fermant avec du ruban adhésif). Tout de suite après avoir rempli les récipients, on doit les fermer hermétiquement et les étiqueter ou les coder. Les étiquettes et les documents d'accompagnement préparés à ce moment-là doivent indiquer (que ce soit sous forme de code ou de description) au moins le type d'échantillon (p. ex., ponctuel, en vrac, composite), la date et l'heure du prélèvement, le site d'échantillonnage et son emplacement exact, l'état

de l'échantillon, son numéro d'identification (y compris le numéro du réplikat, le cas échéant) et le volume de l'échantillon. Le nom et la signature de la ou des personnes ayant effectué le prélèvement devraient aussi être inclus. Il faudrait également que ces personnes consignent en détail les éléments ci-dessous :

- la nature, l'aspect et le volume de chaque échantillon;
- le dispositif et la méthode de prélèvement;
- les méthodes utilisées *in situ* pour regrouper ou subdiviser les échantillons de sol en vrac ou les *échantillons ponctuels*;
- toute forme de préparation (p. ex., tamisage, séchage) *in situ*;
- le nombre de réplikats par lieu d'échantillonnage;
- le calendrier des prélèvements;
- le type et le nombre de récipients utilisés pour le transport des échantillons;
- toute mesure (p. ex., température, pH, teneur en humidité du sol, masse volumique apparente) effectuée sur le lieu d'échantillonnage;
- la caractérisation des horizons pédologiques;
- tout test réalisé *in situ* (p. ex., sac de litière, exposition de vers de terre, bandes appâtées);
- les méthodes et conditions connexes au refroidissement et au transport des échantillons;
- les observations relatives aux conditions environnementales au moment de l'échantillonnage (p. ex., pluie);
- les observations relatives à la pédofaune et à la végétation du lieu d'échantillonnage et tout prélèvement de spécimens;
- la durée et les conditions d'entreposage des échantillons avant leur arrivée au laboratoire;
- des renseignements sur le mode de transport des échantillons.

Le tableau 10 de EC (2012) renferme d'autres recommandations quant aux observations et mesures effectuées *in situ*.

Pendant leur transport et leur entreposage, les échantillons de sol devraient être conservés au froid et il faudrait éviter de les exposer au gel ou à une chaleur excessive. On devrait utiliser au besoin des blocs réfrigérants, de la glace ordinaire ou tout autre moyen de réfrigération pour maintenir les échantillons au froid (p. ex., 7 ± 3 °C) pendant le

transport. Il est recommandé de conserver les échantillons dans l'obscurité (dans des contenants opaques tels que des glacières ou des seaux en plastique munis d'un couvercle) durant le transport, surtout s'ils risquent de contenir des HAP ou d'autres substances chimiques susceptibles de réagir à la lumière ou d'être altérés s'ils sont exposés à la lumière solaire. La documentation appropriée doit accompagner tous les envois d'échantillons, notamment le formulaire de chaîne de conservation et tout document réglementaire lié au transport de matières contaminées (v. EC, 2012 pour d'autres indications sur le transport des échantillons).

La date de réception des échantillons au laboratoire doit être consignée. La température et la teneur en humidité des échantillons à l'arrivée au laboratoire doivent également être mesurées et notées. On devrait aussi examiner chaque échantillon de sol d'essai ou d'horizon pédologique prélevé séparément sur le terrain et consigner une description qualitative des éléments suivants : couleur, texture, indications sommaires sur la teneur en humidité, présence d'eau surnageante, d'invertébrés indigènes, de champignons ou de matière végétale, toute odeur forte (EC, 2012). Les échantillons qu'on prévoit entreposer pour un usage ultérieur doivent être conservés dans des conditions permettant de maintenir les caractéristiques et la qualité du sol pour son utilisation prévue (EC, 2012). Si le sol renferme des contaminants volatils ou particulièrement préoccupants, on devrait purger tout espace libre du récipient au moyen d'azote gazeux avant de fermer le récipient hermétiquement. Les échantillons ne devraient pas geler, même partiellement, pendant le transport ou l'entreposage (sauf si on les a prélevés à l'état congelé) et on ne doit pas les laisser se déshydrater. Cela dit, si un ou des échantillons sont saturés d'eau en excès à leur arrivée au laboratoire (p. ex., s'ils ont été prélevés pendant une forte pluie), on peut les transférer sur une toile en plastique pendant un court laps de temps (p. ex., ≥ 1 h) afin que l'eau en excès puisse s'écouler ou s'évaporer. Les échantillons devraient ensuite

être transférés de nouveau dans le ou les récipients de transport ou dans un ou des récipients étanches à l'air avant d'être entreposés. Il est recommandé d'entreposer les échantillons dans l'obscurité à une température de 4 ± 2 °C⁶³. Ces conditions d'entreposage sont obligatoires lorsque le sol renferme des HAP ou d'autres contaminants photosensibles, ou si on sait que les échantillons contiennent des composés volatils instables préoccupants.

On recommande de procéder aux essais sur les échantillons de sol ou de matière particulaire semblable le plus rapidement possible après le prélèvement. Les effets que peuvent avoir la durée et la température d'entreposage sur la toxicité et les propriétés du sol dépendent des contaminants présents et des caractéristiques du sol. Les essais toxicologiques devraient débuter dans les deux semaines suivant le prélèvement, de préférence dans la première, mais obligatoirement dans les six semaines, sauf s'il a été établi que les contaminants du sol sont anciens ou météorisés et, donc, jugés stables. D'autres points à prendre en considération concernant l'entreposage d'échantillons de sol contaminé sont mentionnés dans EC (2012), et on devrait se conformer aux indications fournies dans ce document.

Au laboratoire, chaque échantillon de sol ou d'horizon pédologique distinct prélevé sur le terrain devrait être soigneusement mélangé (v. 5.3), après quoi on en prélève des sous-échantillons en vue de leur caractérisation physicochimique. Chaque échantillon de sol ou d'horizon pédologique qui sera soumis à un essai (y compris tous les échantillons de sol témoin négatif et de sol de référence connexes) doit être caractérisé au moyen d'analyses effectuées sur un sous-échantillon et portant au moins sur les paramètres suivants :

- granulométrie (pourcentage de sable, de limon et d'argile)
- teneur en carbone organique total (COT)⁶⁴

⁶³ Le séchage à l'air du sol constitue une autre option pratique pour préserver les sols naturels ou les sols contenant des contaminants non volatils ou sensibles à la lumière, car il permet une réhydratation rapide et plus précise ainsi que le stockage des échantillons à température ambiante. On trouvera en 3.10.3.1 de EC

(2012) des conseils sur le séchage à l'air des sols.

⁶⁴ On peut calculer le COT d'après la TMO en multipliant cette dernière par une constante du sol (AES, 2001). Toutefois, comme la relation entre le COT et la matière organique varie légèrement d'un sol à un autre, la teneur

- TMO⁶⁴
- pH
- conductivité
- teneur en humidité
- capacité de rétention d'eau (CRE)
- capacité d'échange cationique (CEC)

On devrait aussi procéder aux analyses suivantes :

- anions et cations majeurs (Na⁺, K⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Al³⁺, S²⁻, S²⁻, Cl⁻)
- azote total, nitrate (NO₃⁻), nitrite (NO₂⁻) et ammonium (NH₄⁺)
- phosphore phytodisponible ou total
- potassium phytodisponible ou total
- ratio C/N

D'autres analyses pourraient être effectuées :

- masse volumique apparente
- carbone inorganique total
- solides volatils totaux
- demande biochimique en oxygène
- demande chimique en oxygène
- potentiel d'oxydoréduction
- sels solubles
- rapport d'adsorption du sodium
- contaminants préoccupants
- caractéristiques de la contamination (p. ex., odeur, coloration, débris, présence de carburant ou de solvant)

À moins d'indication contraire, on devrait procéder aux mêmes analyses chimiques, physiques et toxicologiques sur un sous-échantillon représentatif de chaque réplicat de sol ou d'horizon pédologique prélevé sur le terrain (y compris le sol de référence) en vue d'une étude donnée de la qualité du sol, de même que sur un ou des sous-échantillons de sol témoin négatif.

5.3 Préparation des échantillons en vue des essais

Les échantillons de sol ou de déchets particuliers prélevés sur le terrain ne doivent pas être tamisés par voie humide, car on éliminerait ainsi les contaminants qui sont présents dans l'eau de porosité

ou dont la sorption sur la matière particulaire est faible. De façon générale, il faudrait enlever les gros graviers (ou pierres), débris et macro-invertébrés indigènes ou la matière végétale à l'aide de pincettes ou à la main gantée. Si un échantillon contient beaucoup de débris grossiers indésirables (p. ex., matière végétale, copeaux de bois, verre, plastique, gros graviers) ou de gros macro-invertébrés, on peut les retirer en faisant passer doucement le sol à travers un tamis à grosses mailles (p. ex., 4-10 mm; EC, 2012). On pourrait aussi procéder à un tamisage par voie sèche afin de s'assurer que la structure de l'échantillon (agrégation, matière organique ou distribution de l'argile) se prête aux essais. Il ne faudrait pas tamiser au laboratoire les échantillons qui l'ont déjà été sur le terrain ou qui présentent une texture grumeleuse optimale pour les essais (p. ex., grumeaux de 1-3 mm). Les échantillons constitués de sol subsuperficiel argileux humide sont très cohésifs et, souvent, on ne peut les tamiser ou les homogénéiser directement. Ces échantillons devraient d'abord être fractionnés à la main, puis séchés avant leur tamisage et leur homogénéisation, conformément aux indications données dans EC (2012). En règle générale, on devrait éviter de broyer les échantillons de sol, mais le broyage pourrait être nécessaire dans certains cas (p. ex., sols argileux) ou si on souhaite une plus grande homogénéité que celle obtenue par tamisage. Tout comme dans le cas des procédures d'échantillonnage et d'entreposage, il faudrait documenter adéquatement les procédures de préparation du sol (c.-à-d. *prétraitement*) et, obligatoirement, les consigner.

Il faudra peut-être reconstituer les composants de l'échantillon avant l'essai si, pendant la préparation du sol, l'eau que celui-ci contenait s'est décantée ou si des portions (p. ex., chaume, racines ou autre matière organique) qu'on a enlevées de l'échantillon doivent être mises à l'essai avec le sol (EC, 2012). Les horizons pédologiques prélevés comme composants distincts de l'échantillon de sol doivent être mis à l'essai séparément, c'est-à-dire en tant qu'échantillons individuels. Si on a confirmé la présence de contaminants préoccupants dans un seul horizon pédologique (p. ex., l'horizon organique supérieur) à partir d'analyses antérieures ou d'essais de toxicité, il faut alors, selon les objectifs de l'étude, déterminer si l'essai toxicologique portera

en COT devrait être déterminée également au moyen

d'analyses de laboratoire.

sur cet horizon seulement ou sur les horizons additionnels provenant du lieu d'échantillonnage.

À moins d'indication contraire dictée par les objectifs particuliers de la recherche ou de l'étude, chaque échantillon ou horizon de sol perturbé prélevé sur le terrain devrait être homogénéisé au laboratoire avant de servir aux essais (USEPA, 1989)⁶⁵. Tout liquide séparé de l'échantillon pendant son transport ou son entreposage doit, si possible, être réincorporé dans l'échantillon. Ce mélange peut cependant avoir une incidence sur la concentration et la biodisponibilité des contaminants présents dans le sol; c'est pourquoi l'homogénéisation pourrait ne pas être souhaitable dans tous les cas. Pour homogénéiser l'échantillon, on transfère une quantité (calculée au préalable) de sol d'essai ou de référence dans un récipient rigide propre (p. ex., un gros bol en acier inoxydable ou en plastique) ou, pour de plus grandes quantités de sol, sur des toiles en plastique propres étalées sur le plancher. L'échantillon devrait être mélangé manuellement (à la main gantée ou à l'aide d'un ustensile non toxique, comme une cuillère en acier inoxydable) ou mécaniquement (p. ex., avec un malaxeur à main ménager réglé sur basse vitesse ou un fouet utilisé pour battre les œufs) jusqu'à obtention d'une texture et d'une couleur uniformes. Un certain nombre de méthodes d'homogénéisation d'échantillons de sol (p. ex., pliage, mélange, mise en cône) sont décrites en détail dans EC (2012). Pendant l'homogénéisation, il faudrait veiller à réduire au minimum l'impact de l'opération sur la structure du sol et à ne pas détruire complètement cette structure. Il faudrait arrêter de mélanger l'échantillon dès qu'il semble y avoir une couleur et une texture uniformes.

Les conditions de mélange, notamment la durée et la température, doivent être aussi semblables que possible pour chaque échantillon de sol ou d'horizon pédologique inclus dans un essai. Si on doute de l'efficacité de la méthode utilisée, il faudrait prélever des sous-échantillons du sol mélangé et les analyser séparément afin de déterminer leur homogénéité (granulométrie, substances chimiques étudiées et autres caractéristiques).

Comme il est indiqué en 3.6, un ou des échantillons de sol d'essai ou d'horizon pédologique prélevés sur le terrain pourraient être soumis à des essais toxicologiques à concentration unique (sol ou horizon non dilué) ou à concentrations multiples. Dans ce dernier cas, on prépare les concentrations en mélangeant des quantités mesurées du sol d'essai ou de l'horizon pédologique avec un sol témoin négatif ou un sol de référence. On trouvera en 6.2 des conseils sur d'autres séries de concentrations susceptibles de convenir ou d'être plus appropriées, de même que des indications sur la préparation de mélanges qui pourraient aussi être utilisés dans des essais à concentrations multiples sur un ou des échantillons de sol prélevés sur le terrain. On trouvera en 4.1 d'autres conseils au sujet du choix des concentrations d'essai. Dans tous les cas, l'essai doit comprendre un traitement constitué seulement d'un sol témoin négatif (v. 3.3).

Comme il est indiqué en 4.1 pour les sols échantillonnés par horizon, chaque horizon doit être mis à l'essai séparément dans des essais définitifs individuels. Pour un essai à concentrations multiples, il faudrait mélanger chaque horizon de sol d'essai avec l'horizon correspondant du sol témoin négatif ou du sol de référence aux concentrations expérimentales prévues (0 %, 6,25 %, 12,5 %, 25 %, etc.). Dans certains cas, il pourrait être impossible de prélever les mêmes horizons de sol témoin négatif et de sol d'essai, par exemple, lorsque le site a fait l'objet de mesures d'assainissement préliminaires et que les horizons naturels ont été perturbés ou mélangés. On peut alors utiliser pour l'essai un sol mixte, c'est-à-dire une quantité de sol d'essai et une autre de l'horizon disponible (il peut y en avoir plus d'un) du sol témoin négatif aux concentrations voulues. Les objectifs de l'essai doivent tenir compte du profil pédologique du sol de référence et de l'emplacement ou de la mobilité des contaminants du sol d'essai, le but étant d'apparier si possible les horizons équivalents du sol de référence et du sol contaminé.

La structure du sol est un important facteur qui influence la reproduction des acariens, et la teneur en humidité joue un rôle décisif dans la

⁶⁵ L'homogénéisation des échantillons permet notamment de réintégrer dans le sol l'eau de porosité remontée à la surface pendant le transport et l'entreposage et de

redistribuer les composants qui se sont tassés ou séparés en couches (selon la taille des particules) pendant le transport et l'entreposage.

détermination de cette structure. Il existe une méthode qualitative, appelée « test de compression » ou « test d'expression de l'humidité », permettant de déterminer si un échantillon de sol d'essai a atteint sa teneur optimale en humidité. En prévision des essais de toxicité, l'expérimentateur pourrait trouver utile d'appliquer cette méthode lors du rajustement de la teneur en humidité de chaque échantillon de sol d'essai à un pourcentage donné de la CRE de l'échantillon (v. les paragraphes qui suivent). Après avoir enfilé un gant, il suffit de prélever au hasard un petit sous-échantillon (p. ex., une « pincée ») représentatif du sol d'essai, puis de le comprimer légèrement entre le pouce et l'index. Si le sol exprime une petite quantité d'eau, c'est que sa teneur en humidité est acceptable. S'il n'exprime pas d'eau, il est probablement trop sec. Et s'il exprime une quantité notable d'eau, il est probablement trop humide (OCDE, 2016). Au fur et à mesure de l'essai, il faudrait peser les récipients d'essai pour déterminer la perte d'eau (v. 4.6).

La teneur en humidité d'un échantillon donné de sol d'essai prélevé sur le terrain devrait être normalisée pendant la préparation de l'échantillon. Pour ce faire, on détermine la CRE du sol, puis on hydrate celui-ci jusqu'à obtention d'une teneur optimale en humidité correspondant à un pourcentage de la CRE. Le pourcentage optimal de la CRE pour chaque échantillon de sol prélevé sur le terrain doit être déterminé avant la préparation de l'échantillon et la mise en route de l'essai. À cette fin, on doit établir la teneur en humidité de chaque échantillon homogénéisé (c.-à-d. chaque échantillon de sol d'essai, y compris le sol témoin négatif) (v. 4.1 et 4.6). On doit ensuite déterminer la CRE de chaque

échantillon en appliquant une méthode normalisée reconnue (des explications sont données dans les trois paragraphes qui suivent). Enfin, il faudrait hydrater un sous-échantillon de chacun jusqu'à obtention d'une consistance grumeleuse homogène, avec des grumeaux de ~1-3 mm de diamètre. La teneur en humidité, la CRE et le pourcentage optimal de la CRE de chaque horizon pédologique doivent être déterminés séparément. On peut s'attendre à ce que les horizons pédologiques présentant une TMO plus élevée aient une CRE également plus élevée que les horizons minéraux, de sorte qu'il faudra une plus grande quantité d'eau pour obtenir une texture humide et grumeleuse. À partir de la teneur en humidité initiale et de la CRE de l'échantillon, de même que du volume d'eau ajouté pour obtenir un sol de la consistance voulue, on peut calculer la teneur optimale en humidité, exprimée sous forme de pourcentage de la CRE pour chaque sol⁶⁶. Une fois ce pourcentage cible (ou optimal) déterminé, on peut normaliser la teneur en humidité de chaque échantillon de sol d'essai (y compris le sol témoin négatif) selon la teneur en humidité choisie (propre à l'échantillon). On devrait ajouter de l'eau d'essai (désionisée ou distillée⁶⁷) à chaque échantillon dont la teneur en humidité est inférieure au pourcentage optimal préalablement établi de sa CRE, jusqu'à obtention de cette teneur⁶⁸ (AquaTerra, 1998). Si l'échantillon est trop humide, il devrait être étalé en une couche fine sur une toile en plastique propre (p. ex., un sac à déchets neuf ou un pare-vapeur en plastique) ou sur un plateau propre fait d'un matériau non réactif (p. ex., acier inoxydable ou plastique) et laissé à sécher à l'air par

⁶⁶ Pour les sols à forte teneur en tourbe (c.-à-d. ayant une CRE extrêmement élevée), la méthode de détermination du pourcentage de CRE décrite ici pourrait être inappropriée et donner des résultats trompeurs. Dans de tels cas, la teneur optimale en humidité peut être estimée à l'œil (l'échantillon est hydraté jusqu'à obtention d'une consistance grumeleuse homogène, avec des grumeaux de ~1-3 mm de diamètre), et la teneur en humidité est déterminée par la suite et consignée comme telle (plutôt que sous forme de pourcentage de CRE).

⁶⁷ L'utilisation d'eau purifiée (désionisée ou traitée par osmose inverse) pour hydrater un sol permet d'éviter l'introduction de cations, d'anions ou de métaux traces dans le sol (EC, 2012).

⁶⁸ Certains expérimentateurs utilisent parfois une autre méthode qui consiste à normaliser (et ajuster) la teneur en humidité de chaque échantillon de sol prélevé sur le terrain jusqu'à obtention d'une concentration fixe, comme 35-45 % de son poids sec (ASTM, 2004). Cependant, cette méthode n'est pas recommandée du fait que certains échantillons de sol prélevés sur le terrain peuvent sembler très humides et être surmontés d'eau surnageante après hydratation à seulement 35-45 % de leur poids sec, tandis que d'autres sols de site pourront sembler beaucoup plus secs après un même degré d'hydratation (ASTM, 2004). Par conséquent, l'utilisation de cette autre approche n'est pas recommandée ici.

évaporation à la température ambiante (~20 °C)⁶⁹; il faudra peut-être réhydrater l'échantillon jusqu'à obtention du pourcentage optimal (prédéterminé) de sa CRE. Une fois la teneur en humidité de l'échantillon ajustée au pourcentage désiré de sa CRE, cette teneur doit être déterminée, et sa valeur ainsi que le pourcentage de la CRE doivent être consignés.

La CRE (et son pourcentage optimal pour les essais biologiques) d'un sol donné est généralement caractéristique du type de sol ou d'horizon. En dernière analyse, elle est le résultat de l'interaction de nombreuses variables associées à la structure du sol (p. ex., micro/macro-agrégation, porosité, masse volumique apparente, texture, TMO). Il existe un certain nombre de méthodes pour déterminer la CRE, mais elles exigent pour la plupart que les mesures soient effectuées sur un échantillon de sol intact (p. ex., une carotte de sol) prélevé de façon à préserver ses caractéristiques (agrégations structurales, porosité, masse volumique apparente, texture et TMO). L'USEPA (1989) a mis au point une méthode qui convient aux essais toxicologiques sur des matières non consolidées (comme des échantillons de sol prélevés sur le terrain, qui ont été séchés, tamisés et homogénéisés, ou des échantillons de sol préparés en laboratoire à partir de divers constituants)⁷⁰. Cette méthode est résumée ci-après.

Pour commencer, on dépose ~130 g (poids humide)⁷¹ de l'échantillon sur un plateau en aluminium ou dans une boîte de Petri (15 cm × 1 cm) qu'on fait sécher à 105 °C jusqu'à obtention d'un poids constant (il faut compter habituellement ≥24 h). On refroidit le sol dans un dessiccateur pendant ≥20 min, après quoi on en transfère 100 g dans un bécher en verre de 250 mL et on ajoute 100 mL d'eau distillée ou désionisée. Il faut ensuite mélanger soigneusement la suspension avec une tige en verre. On plie un papier filtre (papier crêpé Fisherbrand^{MC}, de porosité grossière P8 et de 185 mm de diamètre, n° 09-790-12G au catalogue) qu'on place dans un entonnoir en verre (diamètre intérieur supérieur de 100 mm et longueur de tige de 95 mm) de telle sorte que le papier filtre plié coïncide avec le bord supérieur de l'entonnoir. À l'aide d'une pipette, il faudrait mouiller le papier filtre sur toute sa surface en ajoutant lentement jusqu'à 9 mL d'eau distillée ou désionisée, puis peser l'entonnoir et le papier filtre mouillé. Pour obtenir le poids initial de l'ensemble entonnoir, papier filtre mouillé et sol sec (« I » dans l'équation 1 ci-après), on ajoute le poids du sol sec (100 g) à celui de l'entonnoir et du papier filtre mouillé.

On place ensuite l'entonnoir dans un flacon Erlenmeyer de 500 mL et on verse lentement la suspension de sol sur le papier filtre mouillé⁷². Tout sol restant sur les parois du bécher ou sur la tige en

⁶⁹ Si on se préoccupe de la volatilisation des toxiques éventuellement présents ou d'altérations de la nature du toxique d'intérêt en raison de cet assèchement, on peut se tourner vers d'autres méthodes d'assèchement du sol ou examiner les effets de cet assèchement sur la toxicité du sol.

⁷⁰ Des participants à un atelier sur les essais de toxicité des sols organisé par Environnement Canada à Vancouver (Colombie-Britannique), en février 2003, considéraient que la méthode consistant à déterminer la CRE et un pourcentage de celle-ci était la plus appropriée pour exprimer la teneur en humidité du sol (EC, 2004b). Un programme expérimental a donc été mis sur pied pour comparer deux méthodes différentes d'estimation de la CRE du sol [soit la méthode décrite à l'annexe C d'ISO (1999) et la méthode présentée dans USEPA (1989)] et pour évaluer une méthode légèrement différente dans laquelle la teneur en humidité du sol est exprimée sous forme de pourcentage de l'espace interstitiel du sol rempli

d'eau. Selon les résultats de cette étude, chaque méthode présente des avantages et des inconvénients particuliers. Cela dit, c'est la méthode de l'USEPA (1989) qui a été recommandée pour mesurer la CRE dans les méthodes d'essai de toxicité des sols d'Environnement Canada comportant l'ajustement (le cas échéant) de la teneur en humidité des échantillons de sol (Becker-van Slooten et coll., 2004).

⁷¹ Un plus gros volume (p. ex., dans le cas d'un sol très organique) pourrait être nécessaire pour obtenir 100 g de sol (poids sec).

⁷² Dans les sols très organiques, où l'hydrophobie des composés humiques retarde l'absorption de l'eau, la CRE peut être sous-estimée, à moins que la période de saturation du sol ne soit prolongée.

verre est rincé dans l'entonnoir avec la plus petite quantité d'eau nécessaire pour que toute la matière solide soit entraînée sur le filtre. Il faut ensuite bien couvrir l'entonnoir avec une feuille d'aluminium et laisser l'eau s'écouler pendant 3 h à la température ambiante. On pèse ensuite l'entonnoir contenant le papier filtre mouillé et le sol humide. Le poids obtenu représente le poids final de l'ensemble entonnoir, papier filtre mouillé et sol (humide) (« F » dans l'équation 1).

La CRE du sous-échantillon de sol que contient l'entonnoir, exprimée sous forme de pourcentage du poids sec du sol, est calculée comme suit :

$$CRE = \frac{F - I}{S} \times 100 \quad [1]$$

Où :

CRE = capacité de rétention d'eau
 F = poids final de l'ensemble entonnoir, papier filtre mouillé et sol humide
 I = poids initial de l'ensemble entonnoir, papier filtre mouillé et sol sec
 S = 100 g (poids sec du sol)

La CRE de chaque échantillon de sol d'essai devrait faire l'objet d'une triple détermination, à l'aide de trois sous-échantillons. Le pourcentage d'eau (P_E) ajouté à un échantillon de sol prélevé sur le terrain pour obtenir l'hydratation désirée (soit le pourcentage optimal de la CRE) peut être calculé comme suit⁷³ :

⁷³ L'exemple suivant illustre les calculs relatifs à l'hydratation d'échantillons de sol contaminé prélevés sur le terrain et d'un sol témoin négatif, associés à la préparation d'une concentration d'essai de 25 % en vue d'un essai sur la reproduction d'acariens comportant cinq répétitions par traitement.

Hypothèses

Sol n° 1 : sol témoin négatif (tn)

H_{tn} = 2,4 g
 S_{tn} = 1,9 g
 CRE_{tn} = 80,3 %
 $P_{CRE_{tn}}$ = 60,0 %
 TH_{tn} = 26,3 %
 $P_{E_{tn}}$ = 21,9 %
 $P_{S_{tn}}$ = 93,7 g (poids sec)
 $V_{E_{tn}}$ = 20,5 mL
 $P_{H_{tn}}$ = 118,4 g (poids humide)

Sol n° 2 : sol contaminé (c)

H_c = 7,1 g
 S_c = 5,6 g
 CRE_c = 77,1 %
 P_{CRE_c} = 40,0 %
 TH_c = 26,8 %
 P_{E_c} = 4,04 %
 P_{S_c} = 31,3 g (poids sec)
 V_{E_c} = 1,3 mL
 P_{H_c} = 39,7 g (poids humide)

$$TH = [(H - S)/S] \times 100 \quad [1]$$

$$P_E = [CRE \times (P_{CRE}/100)] - TH \quad [2]$$

$$V_E = (P_E \times P)/100 \quad [3]$$

$$P_H = (P_S \times H)/S$$

H = poids humide du substrat (g)
 S = poids sec du substrat (g)
 CRE = capacité de rétention d'eau (% du poids sec)
 P_{CRE} = pourcentage souhaité de la CRE
 TH = teneur en humidité initiale du substrat
 P_E = pourcentage d'eau à ajouter au sol
 P_S = poids total de sol exigé pour l'essai (exprimé sous forme de poids sec)
 V_E = volume d'eau à ajouter au sol (mL)
 P_H = poids total de sol exigé pour l'essai (exprimé sous forme de poids humide, d'après la TH initiale)

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

Aux fins du présent exemple, on suppose qu'un poids total de 125 g (poids sec) de sol suffit pour satisfaire aux exigences relatives à chaque traitement [soit 20 g (poids sec) par répétition × 5 répétitions + 25 g (poids sec) de surplus pour la détermination du pH, de la conductivité, etc.]. Pour simplifier les calculs, on suppose dans cet exemple que 20 g (poids sec) de l'un ou l'autre type de sol suffit pour obtenir le volume de sol de 20 mL qui doit être ajouté à chaque récipient d'essai.

$$P_E = [CRE \times (P_{CRE}/100)] - TH \quad [2]$$

Où :

P_E = pourcentage d'eau à ajouter au sol
 P_{CRE} = pourcentage souhaité de la CRE
 CRE = capacité de rétention d'eau
 TH = teneur en humidité initiale du sol

Le volume d'eau (V_E) qu'il faudrait ajouter à un échantillon de sol prélevé sur le terrain pour obtenir l'hydratation souhaitée (soit le pourcentage optimal de la CRE de l'échantillon) peut être calculé comme suit (v. la note de bas de page n° 73) :

$$V_E = (P_E \times P)/100 \quad [3]$$

Où :

V_E = volume d'eau à ajouter au sol (mL)
 P_E = pourcentage d'eau à ajouter au sol
 P = poids total de sol requis pour l'essai (poids sec)⁷⁴

On trouvera dans EC (2012) la description de divers modes opératoires applicables aux échantillons de sol qui ne peuvent pas être soumis aux essais dans l'état dans lequel ils ont été prélevés et qu'il faut conditionner pour satisfaire aux objectifs de l'étude ou aux OQD. Ces modes opératoires incluent les suivants : lavage, vieillissement/météorisation, ajustement du pH, amendement, ajustement de la *fertilité* du sol, réduction du nombre de micro-organismes indigènes (EC, 2012). En règle générale, les échantillons de sol prélevés sur le terrain ne doivent faire l'objet d'aucun ajustement ou

Pour obtenir une concentration de 25 % de sol contaminé dans le sol témoin négatif, il faut que 25 % du poids total de sol (poids sec) consiste en sol contaminé :

$$= 125,0 \text{ g (poids sec)} \times (25/100) \\ = 31,3 \text{ g (poids sec) de sol contaminé}$$

Le reste du sol d'essai (75 %) requis pour préparer ce traitement consistera en sol témoin négatif :

$$= 125,0 \text{ g (poids sec)} \times (75/100) \\ [\text{ou } 125,0 \text{ g (poids sec)} - 31,3 \text{ g (poids sec)}] \\ = 93,7 \text{ g (poids sec) de sol témoin négatif}$$

Le poids total final de sol requis, fondé sur le poids humide, est donc de 138,9 g [118,4 g (poids humide) à la teneur en humidité initiale du sol (P_{Htn}) + 20,5 mL d'eau] pour le sol témoin négatif, et de 41,0 g [39,7 g (poids humide) à la teneur en humidité initiale du sol (P_{Hc}) + 1,3 mL d'eau] pour le sol contaminé.

La teneur en humidité finale pour chaque sol serait de 48,2 % $\{[(138,9 - 93,7)/93,7] \times 100\}$ pour le sol témoin négatif, et de 31 % $\{[(41,0 - 31,3)/31,3] \times 100\}$ pour le sol contaminé.

La teneur en humidité finale du sol témoin négatif (48,2 %) représente 60 % de la CRE de ce sol ($48,2 \div 80,3 = 0,60$). La teneur en humidité finale du sol contaminé (31,0 %) représente 40 % de la CRE de ce sol ($31,0 \div 77,1 = 0,40$).

⁷⁴ Dans le cas des essais sur des échantillons de sol prélevés sur le terrain, la quantité de sol à ajouter dans un flacon en verre de 30 mL (v. 3.2.2) est basée sur le poids

humide de ce sol, ce qui équivaut à un volume de ~20 mL (épaisseur de sol de ~4 cm). Lorsque le pourcentage optimal de la CRE du sol est déterminé, il faudrait déterminer le poids humide équivalent (de ~20 mL dans le récipient d'essai) et analyser l'échantillon pour déterminer le poids sec. On peut ensuite déterminer le poids total requis par répétition et la concentration d'essai, en se basant sur le poids sec équivalent. « P » (soit le poids total de sol requis pour l'essai) est exprimé sous forme de poids sec dans la formule utilisée pour calculer le volume d'eau à ajouter à un échantillon de sol prélevé sur le terrain pour obtenir l'hydratation souhaitée (v. équation 3). Un simple calcul permet de déterminer la quantité de sol (poids sec) requis par récipient d'essai. Par exemple, supposons que, pour un échantillon donné, les poids humide et sec d'un sous-échantillon de ce sol, déterminés auparavant pour le calcul de la CRE de l'échantillon, sont de 4,2 g et 2,8 g, respectivement. Le poids sec équivalent à un poids humide de 30 g de cet échantillon de sol peut être calculé comme suit :

$$(30 \text{ g} \times 2,8 \text{ g}) \div 4,2 \text{ g} = 20,0 \text{ g}$$

Par conséquent, dans cet exemple, le poids de l'échantillon de sol requis pour chaque répétition (poids sec) est de 20 g. Pour calculer le poids total (« P »), il suffit de multiplier le poids sec requis pour chaque répétition (dans le cas présent, 20 g) par le nombre de répétitions qui seront utilisées dans l'essai (dans cet exemple, 5 répétitions).

conditionnement, sauf si les essais toxicologiques sont réalisés aux fins de recherche et visent à déterminer l'effet d'un conditionnement particulier sur la toxicité de l'échantillon. Les horizons pédologiques très organiques (p. ex., *horizons LFH*) pourraient toutefois exiger un double cycle de gel-dégel pour que les invertébrés indigènes puissent en être retirés avant les essais (v. 5.6.6 de EC, 2012)⁷⁵. Si on souhaite examiner l'effet d'un conditionnement (p. ex., ajustement du pH) sur la toxicité d'un échantillon de sol, il faudrait effectuer deux essais en parallèle, dont un comportant une ou des séries de traitements avec ajustement et un autre, sans ajustement. Tout conditionnement doit être consigné en détail.

Immédiatement après l'hydratation (ou la déshydratation) et le mélange des échantillons, on doit prélever les sous-échantillons dont on a besoin pour l'essai toxicologique et pour les analyses physicochimiques. On doit placer les premiers dans des récipients d'essai étiquetés (v. 4.1) et les seconds, dans des récipients d'entreposage étiquetés également. Toute portion restante de l'échantillon homogénéisé dont on pourrait avoir besoin pour des essais toxicologiques supplémentaires avec des acariens ou d'autres organismes expérimentaux (p. ex., selon EC, 2004a, 2005a, 2013a, 2014a) devrait aussi être transférée dans des récipients étiquetés. Tous les sous-échantillons entreposés en vue d'essais toxicologiques ultérieurs devraient être conservés dans des récipients fermés hermétiquement et comportant le moins d'air possible; ils doivent être entreposés dans l'obscurité à une température de 4 ± 2 °C (v. 5.2) jusqu'à ce qu'ils soient mis à l'essai. Ces conditions d'entreposage sont obligatoires pour les sous-échantillons destinés à des analyses physicochimiques. Juste avant les essais ou les analyses, chaque sous-échantillon doit être amené à la température ambiante et bien mélangé de nouveau afin d'en assurer l'homogénéité.

5.4 Éléments particuliers à prendre en considération dans la collecte, la manipulation et la préparation de sol de diverses écozones du Canada

Des indications précises sur l'échantillonnage, la manipulation, le transport, l'entreposage et la préparation de sol de diverses écozones du Canada sont fournies dans EC (2012).

Environnement Canada a publié diverses méthodes (EC, 2004a, 2005a) permettant d'évaluer des sols dont le pH est neutre ou presque neutre et dont la TMO peut varier de 3 % à 12 % environ. Ces deux propriétés sont généralement caractéristiques des horizons Ah des sols agricoles du Canada, de même que des sols des écorégions de forêts de feuillus mixtes du sud-est du pays (p. ex., écozone des prairies et écozone des plaines à forêts mixtes). De nombreux autres types de sols répandus au Canada ont des propriétés qui ne sont pas considérées comme typiques dans les méthodes normalisées qu'Environnement Canada a déjà publiées, et ces sols exigent des procédures spéciales d'échantillonnage, de manipulation, de transport, d'entreposage et de préparation. Il s'agit notamment des sols de la forêt boréale, des sols minces/pierreux, des sols organiques, des sols cryosoliques et des sols des milieux humides, qui se prêtent tous aux essais décrits dans la présente édition révisée de la méthode d'essai biologique avec des acariens. Étant donné que ces types de sols couvrent la plus grande partie de la masse terrestre du Canada et que certaines activités anthropiques (p. ex., exploitation minière, foresterie, production pétrolière et gazière) se déroulant dans ces écozones ont donné lieu ou peuvent donner lieu à la contamination des terres, on trouve dans EC (2012) des conseils précis sur leur prélèvement, leur manipulation, leur transport, leur entreposage et leur préparation. On trouve aussi dans ce document des indications sur la variation des sols de chacun des écosystèmes décrits, de même que les éléments à prendre en considération quant au choix des espèces expérimentales convenant aux essais sur ces sols (EC, 2012).

⁷⁵ Pour déclencher un cycle de gel-dégel, on met l'échantillon au congélateur (température de ≤ -20 °C) pendant ≥ 3 jours. On sort l'échantillon du congélateur et on le laisse décongeler à >20 °C pendant 7 jours. On répète

l'opération au moins une autre fois avant la mise en route de l'essai (C. Fraser, Environnement Canada, comm. pers, 2013).

5.5 Observations et mesures

Au moment du démarrage de l'essai, il faudrait procéder à une description qualitative de chaque matière d'essai prélevée sur le terrain. Cette description pourrait inclure des observations relatives à la couleur, à la texture et à l'homogénéité de la matière d'essai, de même qu'à la présence de plantes ou de macro-invertébrés. Toute modification de l'aspect de la matière d'essai observée au cours de l'essai ou à la fin devrait être notée et consignée.

On trouvera en 4.6 les marches à suivre et les exigences connexes aux observations et mesures à effectuer au début, au cours ou à la fin de l'essai. Ces observations et mesures s'appliquent aux essais de toxicité décrits ici sur un ou des échantillons de sol de site et sont donc obligatoires.

Selon le schéma expérimental et les objectifs de l'essai, on pourrait préparer des récipients d'essai supplémentaires au début de l'essai (v. 4.1) dans le but de surveiller la composition chimique du sol. Ces récipients feraient l'objet d'un échantillonnage destructif au cours et à la fin de l'essai. On pourrait ajouter ou non des organismes expérimentaux dans ces récipients d'essai supplémentaires, selon les objectifs de l'étude. Pour établir la composition chimique du sol que contiennent ces récipients, on peut en prélever des aliquotes aux fins des diverses analyses (v. 5.2).

5.6 Paramètres et calculs

L'interprétation des résultats des essais sur un ou des échantillons de sol d'essai prélevés sur le terrain se résume toujours à une comparaison des effets biologiques observés dans le sol d'essai (sol de site) et dans le sol de référence. Dans la mesure du possible, on devrait se servir d'un échantillon de sol de référence aux fins de comparaison, car cela permet d'évaluer la toxicité d'un lieu donné (EC, 2004a, 2005a, 2013a, 2014a). Cela dit, il arrive parfois que le sol de référence ne convienne pas à cet usage en raison de sa toxicité ou de ses caractéristiques physicochimiques atypiques. Dans de tels cas, on devrait plutôt comparer le sol d'essai et un sol témoin négatif. Les résultats obtenus avec ce dernier aideront à distinguer les effets causés par les contaminants de ceux causés par des propriétés

physicochimiques du sol telles que la granulométrie, la teneur en COT et la TMO. Qu'on utilise un sol de référence ou un sol témoin négatif pour les comparaisons statistiques, on doit toujours se servir des résultats obtenus avec le sol témoin négatif pour juger de la validité et de l'acceptabilité de l'essai (v. 4.4).

Le paramètre exigé pour les essais avec des acariens est le succès de la reproduction (mesure quantitative) à la fin de l'essai. Ces deux mesures étant de nature différente, il faut recourir à des approches statistiques différentes également, et celles-ci sont affinées pour refléter les objectifs de l'essai et le schéma expérimental. La présente sous-section renferme des conseils d'ordre statistique pour les essais à concentration unique (c.-à-d. sur des échantillons de sol provenant de lieux d'échantillonnage multiples et mis à l'essai à la concentration maximale seulement). Le schéma le plus simple consiste à comparer le lieu d'échantillonnage à l'étude avec un lieu d'échantillonnage de référence, tandis qu'un schéma plus complexe pourrait comporter la comparaison de plusieurs lieux d'échantillonnage à l'étude, soit entre eux, soit avec un lieu d'échantillonnage de référence. La présente sous-section ne renferme que des indications générales relatives à l'analyse du paramètre lié au succès de la reproduction, étant donné qu'on peut trouver ailleurs de plus amples détails (EC, 2005b). En règle générale, les méthodes statistiques ordinaires suffisent pour analyser les résultats. Il faudrait consulter la section 3 de EC (2005b) pour obtenir des conseils au sujet de la comparaison, à l'aide de tests paramétriques et non paramétriques, des résultats d'essais à concentration unique sur des sols provenant de lieux d'échantillonnage multiples. Comme toujours, on devrait demander l'avis d'un statisticien versé dans le domaine de la *toxicologie* pour établir des plans d'étude et analyser les résultats des essais.

On devrait se conformer aux lignes directrices de la section 6 du présent document (y compris celles de la sous-section 6.2 en ce qui a trait aux essais préliminaires; v. aussi 4.8 et 6.4 pour le calcul des paramètres de l'essai) si on entreprend un essai à concentrations multiples sur un ou des échantillons de sol prélevés sur le terrain et dilués avec un sol témoin négatif ou un sol de référence non contaminé. On devrait consulter la section 9 de EC

(2005b) lorsqu'on veut comparer de telles estimations ponctuelles de la toxicité de multiples échantillons de sol prélevés sur le terrain.

5.6.1 Variantes du plan d'étude et des analyses

On trouvera dans EC (2005b) des indications détaillées sur l'analyse statistique des données quantiques recueillies dans le cadre de divers plans d'expérience comportant des lieux d'échantillonnage multiples. Le choix du test statistique se fonde sur plusieurs considérations, notamment :

- le type de comparaison à établir (p. ex., une série complète de comparaisons par paires entre tous les lieux d'échantillonnage ou une comparaison de la réponse obtenue pour chaque lieu et pour le lieu de référence seulement);
- l'existence prévue d'un gradient chimique ou d'un gradient dans la réponse biologique⁷⁶;
- le nombre et le type de réplicats (de laboratoire ou prélevés sur le terrain).

On trouvera dans EC (2005b)⁷⁷ des conseils pouvant être appliqués facilement aux données sur la reproduction des acariens (c.-à-d. le nombre de descendants vivants à la fin de l'essai) dans un scénario comportant des lieux d'échantillonnage multiples. Si on doit comparer les résultats obtenus pour le seul lieu d'échantillonnage à l'étude avec ceux obtenus pour un lieu d'échantillonnage de référence, un test t ⁷⁸ convient habituellement à l'analyse statistique (v. 3.2 dans EC, 2005b). Lorsque plus d'un lieu d'échantillonnage (traitement) est à l'étude et que l'expérimentateur souhaite comparer de nombreux lieux

d'échantillonnage entre eux ou avec le lieu d'échantillonnage de référence, il peut avoir recours à des ANOVA et à des tests de comparaisons multiples (et équivalents non paramétriques) (v. 3.3 dans EC, 2005b). Le choix du test se fonde sur les trois éléments décrits ci-dessus, de même que sur la satisfaction des hypothèses de normalité et d'homoscédasticité.

Une étude très préliminaire peut n'employer qu'un seul échantillon de sol d'essai (sol de site contaminé ou susceptible d'être contaminé) et un échantillon de sol de référence, sans répétition. Il suffit souvent d'examiner les résultats ainsi obtenus pour concevoir des études plus approfondies. En théorie, on pourrait effectuer une évaluation préliminaire à partir d'échantillons provenant d'un grand nombre de lieux d'échantillonnage, mais sans réplicats prélevés sur le terrain ou sans réplicats de laboratoire (intra-échantillons), dans le but, notamment, de repérer un nombre réduit de lieux d'échantillonnage méritant une étude plus approfondie. Dans ce cas, les possibilités d'analyse statistique seraient limitées (EC, 2005b).

Une étude de sol plus traditionnelle supposerait le prélèvement de réplicats en plusieurs endroits et de manière identique, puis la comparaison des résultats pour ces réplicats et pour ceux d'un seul sol de référence ou sol témoin négatif. Il existe plusieurs pistes d'analyse, selon le type et la qualité des données. Dans les études portant sur des lieux multiples, le type de réplicats (prélevés sur le terrain ou de laboratoire) influencerait sur l'interprétation des résultats. Si des réplicats prélevés sur le terrain et des réplicats de laboratoire (répétitions) ont été mis à l'essai, on devrait consulter un statisticien pour connaître les choix d'analyse. Si l'essai portait

⁷⁶ Dans un tel cas, on détermine le gradient pendant la mise au point du schéma expérimental (donc, a priori) et non après la collecte des données. On trouvera aux sous-sections 3.3 de EC (2005b) des indications relatives aux gradients d'effet. Au besoin, on devrait demander à un statisticien des conseils sur les analyses de données lorsqu'on prévoit l'existence d'un gradient.

⁷⁷ Pour l'analyse des données sur la reproduction, il faudrait consulter les sous-sections 3.2 et 3.3 de EC (2005b), qui renferment des indications sur l'analyse de mesures quantitatives pour un seul lieu d'échantillonnage et de mesures quantitatives pour des lieux

d'échantillonnage multiples, respectivement. Il faudrait aussi consulter la sous-section 7.5 de EC (2005b), qui présente d'autres détails sur les tests de comparaisons multiples aux fins des tests d'hypothèse; toutefois, le calcul de la CSEO ou de la CMEQ n'est pas recommandé ici.

⁷⁸ Le test t suppose une égalité des variances entre les groupes, mais on peut le modifier pour tenir compte d'une inégalité des variances (EC, 2005b).

seulement sur des répliqués de laboratoire, il serait difficile de tirer des conclusions statistiquement robustes au sujet des écarts dus aux lieux d'échantillonnage (v. 5.1). Les répliqués de laboratoire n'indiqueraient que les différences éventuelles, entre échantillons, qui seraient supérieures à la variation de base dans les procédures intralaboratoires de préparation et d'exécution de l'essai. La variation associée au lieu d'échantillonnage ne serait pas vraiment évaluée dans l'analyse statistique, mais elle contribuerait aux différences éventuelles dans les résultats de l'essai connexes au lieu d'échantillonnage.

Si on souhaite comparer les résultats obtenus avec les répliqués prélevés à chaque lieu d'échantillonnage à ceux obtenus avec le sol de référence, divers essais sont recommandés, selon que les échantillons présentent un gradient d'effet ou non et que le nombre de répliqués est égal ou inégal (v. section 3 dans EC, 2005b).

Dans une étude comportant des lieux d'échantillonnage multiples, l'expérimentateur pourrait vouloir savoir quels échantillons provenant de divers lieux d'échantillonnage ont produit des résultats statistiquement différents, soit entre eux, soit par rapport à l'échantillon ou aux échantillons de sol témoin négatif ou de référence. Cela peut être le cas lorsque les échantillons provenant de divers lieux sont prélevés à des distances de plus en plus grandes d'une source ponctuelle de contamination et que l'expérimentateur souhaite savoir quels lieux d'échantillonnage présentent une toxicité passablement plus élevée (d'après les échantillons) et nécessitent donc plus particulièrement une

décontamination. Il faudrait suivre les conseils fournis dans les sous-sections 3.1, 3.3 et 7.5 de EC (2005b), où l'on trouve par ailleurs d'autres détails, des tests de rechange et des tests non paramétriques.

5.6.2 Analyse de puissance

La possibilité d'obtenir de faux positifs (soit de conclure qu'un site non contaminé est contaminé – erreur de type I) ou de faux négatifs (soit de conclure qu'un site contaminé est non contaminé – erreur de type II) constitue un aspect important à prendre en compte dans l'analyse des essais de toxicité des sols. Les chercheurs, habituellement prudents quand ils choisissent le degré de signification statistique pour tolérer les faux positifs (erreurs de type I), le fixent généralement à $p = 0,05$ ou $0,01$. Le plus souvent, lorsqu'ils se conforment à un plan d'expérience précis, ils ne tiennent pas compte du lien entre puissance, variation et amplitude de l'effet et omettent de préciser la valeur de l'erreur de type II (β). Plusieurs facteurs peuvent avoir une incidence sur la puissance statistique, notamment :

- la variation entre les répliqués représentant le même traitement;
- α (c.-à-d. la probabilité de commettre une erreur de type I);
- l'amplitude de l'effet (l'objet même de l'essai);
- n (le nombre d'échantillons ou de répétitions utilisé dans l'essai et, dans certains cas, leur affectation⁷⁹).

On trouvera de plus amples explications et des conseils au sujet des erreurs de type I et II dans EC (2005b).

⁷⁹ Si le schéma expérimental exige la comparaison des échantillons de sol d'essai et de l'échantillon de sol de référence seulement (p. ex., au moyen du test de Dunnett ou du test de Williams), on obtient une puissance optimale pour le paramètre de la reproduction en affectant un nombre plus élevé de répliqués au traitement de référence (Dunnett, 1955; Williams, 1972; OCDE, 2006). En règle générale, le nombre de répliqués de sol référence (n_0) peut être corrélé comme suit au nombre de lieux d'échantillonnage à l'étude (k) et au nombre de répliqués de sol d'essai (n) : $n_0 = n\sqrt{k}$ pour le test de Dunnett (OCDE, 2006). On recommande la version modifiée suivante si le test de Williams est employé : \sqrt{k} est remplacé par une plage comprise entre $1,1\sqrt{k}$ et $1,4\sqrt{k}$ (Williams, 1972). Dans la présente méthode, il faudrait

prélever ≥ 5 répliqués par lieu d'échantillonnage. Si l'expérimentateur souhaite utiliser un nombre de répliqués supérieur à ce minimum, il devrait affecter des répliqués supplémentaires aux échantillons de référence afin de maximiser la puissance et de réduire au minimum l'erreur de type II. Prenons l'exemple suivant, qui fait appel au test de Dunnett : l'étude comporte un lieu d'échantillonnage de référence, quatre lieux d'échantillonnage à l'étude et cinq répliqués par lieu d'échantillonnage. Pour maximiser la puissance, le nombre optimal de répliqués à prélever au lieu d'échantillonnage de référence serait de $n_0 = n\sqrt{k} = 5 \times \sqrt{4} = 10$ répliqués.

Dans les domaines scientifiques fondés sur la recherche, l'analyse de puissance est particulièrement utile au moment de l'établissement du plan d'expérience préliminaire (Hoenig et Heisey, 2001; Lenth, 2007; Newman, 2008). Ainsi, on exécute un essai exploratoire afin de déterminer l'écart type approximatif (variation) et de diagnostiquer les problèmes qui risquent de surgir dans l'exécution de l'essai en général. D'autres facteurs de l'analyse de puissance, comme l'amplitude de l'effet et le nombre de répétitions, peuvent ensuite être envisagés en regard de l'écart type en vue d'optimiser le plan d'expérience définitif (p. ex., le nombre de réplicats nécessaires pour détecter un effet d'une certaine amplitude).

Dans la mise au point de méthodes d'essai normalisées, l'analyse de puissance a pour objectif premier l'optimisation du plan d'expérience ou du moins l'estimation de la puissance du plan en cours⁸⁰. Toutefois, il faudrait généralement prendre en considération un ensemble de données nettement plus étoffé qu'une seule estimation de la variation et de l'amplitude de l'effet. Par exemple, les spécialistes des méthodes d'essai pourraient recueillir un certain nombre d'estimations de la variation auprès de différents laboratoires et à partir de différents scénarios de contamination (Thursby et coll., 1997; Van der Hoeven, 1998; Denton et coll., 2011). Les essais normalisés sont souvent employés aux fins de surveillance ou d'application de programmes réglementaires, lesquels peuvent préciser l'amplitude de l'effet (p. ex., 25 %) à détecter (MEA, 2007).

Les données des essais de validation interlaboratoires (ECCC, 2019) ont servi à estimer la puissance permettant de détecter une réduction du nombre de descendants ayant survécu (L. Van der Vliet, Environnement et Changement climatique Canada, comm. pers., 2019). Les estimations liées à la variabilité ont été recueillies dans sept laboratoires, quatre types de sols différents et trois séries d'essais. Les données les plus complètes étaient disponibles pour les sols

artificiels; l'analyse de puissance a donc été axée sur ce type de sol. Si l'on fait la moyenne de tous les laboratoires, la variabilité entre les répétitions témoins a diminué par rapport à la première série (CV moyen = 38 %) à la troisième série (CV moyen = 26 %), ce qui indique qu'à mesure que les laboratoires ont acquis de l'expérience, la variabilité a diminué. Le CV de la troisième série a été utilisé dans l'analyse de puissance, car on suppose que le personnel de laboratoire a été formé et a effectué les premiers essais (v. 3.2.1). Les estimations de la variabilité n'étaient disponibles que pour les récipients de répétition (réplicats de laboratoire); la variabilité entre les réplicats (réplicats prélevés sur le terrain) devrait être plus élevée, et cette augmentation prévue aurait une incidence sur l'analyse de puissance. On a utilisé des amplitudes d'effet d'une réduction de 30 %, 40 % et 50 % du nombre de descendants ayant survécu. On a supposé un *test t* à une face avec des variances égales et $\alpha = 0,05$.

L'analyse de puissance a montré que, compte tenu des conditions énumérées, pour cinq répétitions, une amplitude d'effet de 40 % ou plus peut être détectée de manière fiable (puissance ≥ 80 %). Cela appuie l'exigence d'avoir ≥ 5 récipients de répétition. Si les exigences du projet ou du programme ont mentionné une amplitude d'effet inférieure, il est recommandé d'effectuer plus de répétitions. Par exemple, avec une amplitude d'effet ciblée de 30 %, huit répétitions sont recommandées. Cela signifie qu'avec huit répétitions, une amplitude d'effet de 30 % peut être détectée de manière fiable (puissance ≥ 80 %).

⁸⁰ En 2010, l'USEPA a mis au point une approche d'analyse des données appelée test de toxicité significative (TTS) (USEPA, 2010). Un TTS permet de tester une hypothèse d'après la bioéquivalence, une notion largement utilisée dans la mise au point et l'évaluation de

médicaments. Le TTS est évoqué ici parce que l'analyse de puissance et le TTS ont certains buts communs (p. ex., expression a priori des erreurs des types I et II) et un contexte semblable (application d'essais normalisés).

Section 6

Modes opératoires particuliers pour la mesure de la toxicité d'un sol enrichi avec une substance chimique

La présente section renferme des recommandations et des instructions sur la préparation et la mise à l'essai d'un sol témoin négatif enrichi en laboratoire avec une ou des substances chimiques. Ces recommandations et instructions s'appliquent à la méthode d'essai biologique décrite dans la section 4. Les conseils présentés dans EC (1995) pour enrichir (doper) un sédiment témoin négatif et réaliser des essais toxicologiques avec des mélanges de substances chimiques et de sédiment sont également pertinents dans le cas d'un sol enrichi avec une substance chimique. Il pourrait s'avérer nécessaire d'évaluer et de normaliser davantage les méthodes d'enrichissement (v. 6.2) avant d'exécuter des essais toxicologiques avec des acariens ou d'autres organismes endogés pour évaluer des mélanges particuliers de sol et de substances chimiques à des fins réglementaires.

On peut examiner expérimentalement la ou les causes de la toxicité du sol et les interactions toxiques de substances chimiques en association avec un sol par ailleurs non contaminé en enrichissant un sol témoin négatif (v. 3.3) avec ces substances. L'enrichissement peut être effectué à l'aide d'une ou de plus d'une substance chimique. Aux fins des essais toxicologiques avec des acariens, effectués selon les modes opératoires décrits dans la présente méthode, on peut aussi enrichir un sol de référence (v. 3.5) ou un sol d'essai (v. 3.6). Les échantillons d'horizons pédologiques prélevés séparément doivent être traités comme des échantillons distincts (v. 4.1 et 5.3). Il faut aussi les caractériser et les préparer (c.-à-d. les hydrater et les enrichir) séparément avant de les soumettre à un essai (v. 6.2). On peut avoir recours à des essais toxicologiques sur un sol enrichi avec une ou des substances chimiques à diverses concentrations pour

déterminer la valeur d'autres paramètres statistiques d'après les concentrations seuils ayant des *effets sublétaux* précis (v. 4.8.1).

La sous-section 6.2 décrit les modes de préparation des mélanges destinés aux essais sur un sol enrichi. La sous-section 6.3 traite des observations et des mesures à effectuer en cours d'essai et à la fin de l'essai. La sous-section 6.4 explique comment estimer les paramètres dans des essais à concentrations multiples (v. aussi 4.8). Les modes opératoires décrits ici s'appliquent également au mélange de concentrations multiples d'un sol d'essai prélevé sur le terrain (y compris des déchets particuliers tels que les boues ou d'autres déblais de dragage destinés à l'épandage sur le sol) avec un sol témoin négatif ou un sol de référence, à la réalisation d'essais à concentrations multiples et à la détermination des paramètres statistiques relatifs à ces mélanges (v. 4.8 et 5, en particulier la sous-section 5.6). Les essais à concentrations multiples sur un sol témoin positif (v. 3.4) ou avec un ou des toxiques de référence ajoutés à un sol témoin négatif (v. 4.9) sont aussi exécutés selon les modes opératoires et les méthodes statistiques décrits dans la présente section, tout comme les essais toxicologiques exécutés sur des sols enrichis en vue de déterminer l'influence des caractéristiques physicochimiques d'un sol témoin négatif naturel ou artificiel sur la toxicité des substances chimiques.

6.1 Propriétés, étiquetage et entreposage des échantillons

On devrait se renseigner sur les propriétés de la ou des substances chimiques qui seront utilisées pour enrichir un sol témoin négatif en laboratoire⁸¹. On

⁸¹ Certaines études pourraient exiger l'enrichissement (mélange) d'un sol témoin négatif ou d'un sol de référence avec une ou des concentrations de substance chimique ou de sol d'essai (p. ex., échantillons de sol ou de boues résiduelles contaminés ou potentiellement contaminés, prélevés sur le terrain). Dans d'autres cas,

c'est plutôt le sol d'essai qu'il faudra enrichir. Pour tout essai sur des échantillons de sol ou de matière particulière semblable contaminé (p. ex., boues ménagères ou industrielles), on devrait suivre les instructions relatives à la caractérisation des échantillons données en 5.2. Des échantillons de sol témoin négatif, de sol de référence, de

devrait également disposer d'information au sujet des caractéristiques suivantes de chaque substance chimique (p. ex., pesticides ou autres préparations commerciales) : teneur en ingrédients « actifs » et impuretés d'importance, solubilité dans l'eau, pression de vapeur, stabilité chimique, constantes de dissociation, coefficients d'adsorption, toxicité pour les humains et pour les organismes terrestres, biodégradabilité. Lorsque la solubilité dans l'eau est douteuse ou problématique, on devrait faire des recherches sur les modes opératoires acceptables déjà utilisés pour préparer des solutions aqueuses de la ou des substances chimiques et consigner ces modes. En l'absence de méthode éprouvée pour dissoudre la ou les substances chimiques d'essai dans l'eau, on devrait procéder à des essais préliminaires de dissolution dans l'eau d'essai ou un solvant non aqueux et confirmer analytiquement la solubilité de la ou des substances. On devrait également obtenir et consigner tous les autres renseignements disponibles tels que la formule structurelle, la nature et le pourcentage des impuretés notables, la présence et la quantité d'additifs et le coefficient de partage *n*-octanol-eau. Enfin, on devrait se procurer et examiner toute fiche signalétique pertinente.

La substance chimique (il peut y en avoir plus d'une) à soumettre aux essais devrait au moins être de qualité « réactif », sauf si un essai sur une préparation commerciale ou une substance chimique de qualité technique est exigé. Les récipients contenant la substance doivent être fermés hermétiquement et codés ou étiquetés dès leur arrivée au laboratoire. L'information exigée (nom de la substance, fournisseur, date de réception, personne chargée des essais, etc.) devrait figurer sur l'étiquette ou être consignée sur une feuille de données réservée à l'échantillon, selon ce qui convient le mieux. Les conditions d'entreposage (p. ex., température, protection contre la lumière) sont souvent dictées par la nature de la substance.

sol contaminé ou de déchets particuliers prélevés sur le terrain et destinés à être évalués dans le cadre d'essais de toxicité du sol dopé devraient être prélevés, étiquetés, transportés, entreposés et analysés conformément aux instructions fournies aux sections 5.1 et 5.2.

⁸² Toutefois, si on prévoit que la ou les substances

6.2 Préparation des mélanges d'essai

La veille de la mise en route de l'essai (jour -1), le ou les mélanges de substances chimiques et de sol témoin négatif devraient être préparés, transférés dans les récipients d'essai et conservés en l'état avant l'ajout des organismes expérimentaux le lendemain (jour 0) (v. 4.1). Dans le cas de certaines substances chimiques (p. ex., celles qui sont très volatiles, qui se dégradent facilement ou qui pourraient être métabolisées), l'ajout d'organismes expérimentaux peut être effectué immédiatement après la préparation du sol d'essai. Les dates de préparation du sol d'essai et d'ajout d'organismes expérimentaux doivent être consignées et signalées. On devrait préparer une quantité suffisante de chaque lot de sol d'essai représentant un traitement (concentration) donné, et ce, pour obtenir toutes les répétitions d'essai de ce traitement (concentration) et toutes les répétitions ou quantités additionnelles requises aux fins d'analyses physicochimiques (v. 4.6 et 6.3) ou d'autres essais de toxicité d'un sol avec des acariens ou d'autres organismes pédofauniques (p. ex., essais effectués conformément à EC, 2004a, 2005a, 2013a ou 2014a).

Le fait d'utiliser un sol artificiel (v. 3.3.2) pour préparer chaque mélange d'essai constitue une approche uniforme et normalisée permettant de comparer les résultats obtenus avec d'autres substances chimiques soumises à des essais semblables dans le même laboratoire ou dans d'autres laboratoires (p. ex., selon USEPA, 1989; Wiles et Krogh, 1998; ISO, 1999; OCDE, 2009). Si on se sert d'un sol artificiel, on devrait suivre le mode de préparation décrit en 3.3.2. La quantité de sol artificiel requise pour les essais devrait être préparée, hydratée jusqu'à obtention d'une teneur en humidité de ~20 % (ce qui correspond à ~28 % de la CRE du sol), traitée au besoin afin que son pH se situe dans la plage de 6,0-7,5⁸², laissée à vieillir

chimiques d'essai modifieront le pH du sol et que le but de l'étude est d'empêcher cet effet, on devrait ajuster le pH (aqueux) de chaque lot (concentration) à une valeur standard (p. ex., pH 6,5) après l'ajout de la ou des substances en question. Les études effectuées pour déterminer la mesure dans laquelle une substance d'essai acide ou alcaline modifie la toxicité d'un sol enrichi avec

pendant ≥ 3 jours et entreposée jusqu'à ce qu'on en ait besoin (v. 3.3.2). La teneur en humidité finale (y compris l'humidité due à l'ajout d'une aliquote mesurée d'une substance chimique d'essai dissoute dans l'eau d'essai, avec ou sans solvant organique) de tout sol enrichi avec une substance chimique préparé à l'aide d'un sol artificiel devrait

correspondre à ~ 70 % de la CRE du mélange final (v. 3.3.2), pour chaque traitement (concentration), ou à celle qui produit la texture de sol optimale pour l'essai (c.-à-d. une consistance grumeleuse homogène avec des grumeaux de $\sim 1-3$ mm de diamètre; v. 5.3)⁸³. Tous les mélanges (traitements)

une gamme de concentrations de cette substance, en raison de l'effet du pH *en soi*, devraient comporter deux essais parallèles : dans l'un, on ajuste le pH de chaque concentration d'essai à une valeur standard (p. ex., 6,5) à l'aide de la quantité requise (variable selon la concentration) de CaCO_3 ; dans l'autre, on utilise une quantité identique de CaCO_3 pour chaque traitement, quantité qui permettra d'atteindre le pH « standard » (p. ex., 6,5) dans le traitement témoin négatif.

⁸³ L'exemple suivant illustre les calculs à effectuer pour déterminer les volumes d'eau (désionisée ou distillée) et de solution mère d'un toxique de référence (acide borique) qu'il faut ajouter à un échantillon de sol artificiel possédant une teneur en humidité donnée, afin d'obtenir un traitement présentant une teneur en humidité équivalant à 70 % de la CRE du sol artificiel. Les calculs tiennent compte, dans l'ajustement global de la teneur en humidité du sol, du volume de la solution mère d'acide borique ajouté lors de la préparation du traitement. Pour simplifier les calculs, on suppose dans cet exemple que 20 g (poids sec) de sol artificiel (SA) suffisent pour fournir l'aliquote de 20 mL de sol qui sera ajoutée à chaque récipient (c.-à-d. flacon en verre de 30 mL) dans un essai toxicologique avec des acariens, comportant cinq récipients d'essai de répétition par traitement.

Les équations présentées en 5.3 pour le calcul de la CRE et l'ajustement de la teneur en humidité du sol à un pourcentage donné de cette valeur s'appliquent également ici. Le présent exemple part des hypothèses suivantes (les équations et les définitions connexes sont présentées en 5.3).

Hypothèses :

Poids humide de SA = 3,2 g
 Poids sec de SA = 2,7 g
 Teneur en humidité (TH) du SA
 = $[(3,2 - 2,7)/2,7] \times 100$
 = 18,5 % (teneur en humidité initiale)
 CRE du SA = 72,1 %
 Pourcentage souhaité de la CRE (P_{CRE}) = 70,0 %
 Poids sec de SA requis pour l'essai (P_{S})
 = $[20,0 \text{ g par répétition} \times 5 \text{ répétitions}]$
 + 25,0 g additionnels
 = 125,0 g (poids sec)
 Poids humide de SA requis pour l'essai (P_{H})

$$= (125,0 \times 3,2)/2,7$$

$$= 148,1 \text{ g (poids humide)}$$

Calculs pour préparer un traitement constitué de 200 mg d'acide borique par kilogramme de sol artificiel (poids sec) :

La solution mère renferme 0,4 g d'acide borique (H_3BO_3) par 100 mL d'eau désionisée.

Quantité de H_3BO_3 requise (poids sec) :
 $\text{H}_3\text{BO}_3 = [(0,2 \text{ g de } \text{H}_3\text{BO}_3/1000 \text{ g de sol (poids sec)}] \times 125,0 \text{ g (poids sec)}$
 = 0,025 g H_3BO_3

Quantité de solution mère requise (volume) :
 $\text{H}_3\text{BO}_3 = 0,025 \text{ g de } \text{H}_3\text{BO}_3/(0,4 \text{ g de } \text{H}_3\text{BO}_3/100 \text{ mL d'eau})$
 = 6,2 mL de solution mère

Pourcentage d'eau (P_{E}) à ajouter à ce traitement pour obtenir le pourcentage désiré de la CRE (70 %) :
 $P_{\text{E}} = [\text{CRE} \times (P_{\text{CRE}}/100)] - \text{TH}$
 = $[72,1 \times (70,0/100)] - 18,5$
 = 32,0 %

Volume d'eau (V_{E}) à ajouter à ce traitement pour obtenir le pourcentage désiré de la CRE (70 %) :
 $V_{\text{E}} = (P_{\text{E}} \times P_{\text{S}})/100$
 = $[32,0 \times 125,00 \text{ g (poids sec)}]/100$
 = 40,0 mL d'eau

Toutefois, dans le volume requis, il faut ajouter 6,2 mL de solution mère pour le dosage; par conséquent, il suffira d'ajouter seulement 33,8 mL d'eau (40,0 mL d'eau - 6,2 mL de solution mère).

Le poids final total de sol requis (poids humide) serait donc de 188,1 g [148,1 g (poids humide) de sol à la teneur en humidité initiale (P_{H}) + 33,8 mL d'eau + 6,2 mL de solution mère], et la teneur en humidité finale du sol (poids sec) serait de 50,5 % $\{[(188,1 - 125,00)/125,00] \times 100\}$.

La teneur en humidité finale de ce traitement d'essai (50,5 %) représente 70 % de la CRE du sol d'essai (50,5 ÷ 72,1 = 0,70).

inclus dans un essai devraient présenter des teneurs en humidité finales aussi semblables que possible.

Les expérimentateurs peuvent choisir d'utiliser un sol témoin naturel (v. 3.3.1) plutôt qu'artificiel (v. 3.3.2) comme sol témoin négatif qui sera enrichi avec une ou des substances chimiques, de même que pour la préparation des répétitions correspondantes de sol témoin qui seront incluses dans l'essai. Les procédures décrites ici s'appliquent tout autant à un sol naturel, sauf que la teneur en humidité finale de chaque lot de sol enrichi avec une substance chimique (y compris les lots témoins) préparé à l'aide d'un sol prélevé sur le terrain devrait être ajustée, conformément aux indications fournies en 5.3, afin qu'elle corresponde au pourcentage optimal de sa CRE (pour ce faire, on hydrate ou déshydrate l'échantillon, selon le cas). S'il s'agit d'un sol naturel, le volume de sol dans chaque récipient d'essai pourrait également être différent en raison des écarts dans la masse volumique apparente de chacun des sols susceptibles d'être utilisés. Le mode opératoire à employer pour enrichir un sol en laboratoire dépend des objectifs de l'étude et de la nature de la substance d'essai qui est mélangée au sol témoin négatif ou à un autre sol. Très souvent, pour obtenir un mélange de sol et de substance chimique, on prépare une solution mère de ladite substance et on ajoute un ou des volumes mesurés à l'eau d'hydratation du sol témoin négatif artificiel ou naturel (v. 3.3)⁸⁴. Le solvant à privilégier pour la préparation des solutions mères est l'eau d'essai (eau désionisée ou distillée) pure à 100 %; à moins de nécessité absolue, on devrait éviter l'usage de tout autre solvant. Dans le cas de substances chimiques peu solubles dans l'eau d'essai, on peut utiliser une petite quantité d'un solvant organique miscible avec l'eau et peu toxique (p. ex., acétone, méthanol ou éthanol) pour faciliter leur dispersion dans l'eau (OCDE, 2009). On ne devrait pas employer de surfactifs.

Si on a recours à un solvant organique, l'essai doit comprendre deux séries de récipients d'essai de répétition, dont une ne renfermant que du sol témoin négatif (c.-à-d. un sol artificiel ou naturel non contaminé uniquement) et une autre, qu'un *témoin sol-solvant* (ISO, 1999; OCDE, 2009). À cette fin,

on doit préparer un lot de témoin sol-solvant contenant la même concentration d'agent solubilisant que l'échantillon de sol enrichi contenant la plus forte concentration de la ou des substances chimiques d'essai. Le solvant doit provenir du lot qui a servi à préparer la solution mère de la ou des substances d'essai. Cela dit, on devrait utiliser les solvants avec parcimonie, car ils pourraient contribuer à la toxicité du sol d'essai ainsi préparé. La concentration maximale de solvant dans le sol ne devrait pas influencer sur la survie ou la reproduction des acariens pendant l'essai. Si on ne connaît pas cette concentration, on devrait effectuer un essai préliminaire, avec solvant seulement, à diverses concentrations dans un sol témoin négatif, afin de déterminer la concentration avec effet de seuil du solvant qu'on prévoit utiliser dans l'essai définitif.

Lorsqu'il faut préparer des concentrations d'une substance chimique pour enrichir un sol artificiel et que cette substance est insoluble dans l'eau mais soluble dans un solvant organique, la quantité de substance d'essai requise pour préparer un volume donné d'une concentration d'essai particulière devrait être dissoute dans un petit volume d'un solvant organique approprié (p. ex., l'acétone). Ce mélange de substance chimique et de solvant devrait ensuite être pulvérisé sur une petite portion – ou mélangé avec cette petite portion – de la quantité finale de sable quartzueux fin dont on a besoin pour préparer chaque concentration d'essai constituée d'une quantité mesurée d'un mélange particulier de substance chimique et de solvant ajouté à un sol artificiel (v. 3.3.2). On élimine ensuite le solvant par évaporation en plaçant le contenant sous une hotte pendant ≥ 1 h, jusqu'à ce qu'aucune odeur résiduelle de solvant ne puisse plus être détectée. Une fois le solvant évaporé, on combine soigneusement le mélange de substance chimique et de sable avec la quantité restante du sable préhumidifié et des autres ingrédients nécessaires pour préparer le sol artificiel (v. 3.3.2). On ajoute alors au mélange sol-sable-tourbe la quantité d'eau d'essai requise pour obtenir une teneur en humidité finale équivalant à ~ 70 % de la CRE maximale de ce sol artificiel et on mélange le tout. Le sol enrichi avec une substance chimique peut maintenant être ajouté au récipient d'essai.

⁸⁴ L'ajout de solution mère à l'eau d'hydratation, puis au sol facilite l'homogénéisation et diminue le risque de

concentration du contaminant dans une très petite portion de sol.

Pour les essais dans lesquels le sol naturel est enrichi avec une substance chimique insoluble dans l'eau, on peut avoir recours au mode opératoire suivant (R. Kuperman, US Army Edgewood Chemical Biological Center, comm. pers., 2004). Après dissolution de la substance chimique dans un solvant (comme l'acétone), on verse cette solution sur une couche de sol de 2,5 cm d'épaisseur à l'aide d'une pipette afin d'obtenir la concentration voulue de chaque substance chimique dans le sol; il faut s'assurer que le volume ajouté n'excède jamais 15 % (ratio volume/poids) du poids sec du sol. Ce même volume de solution (substance chimique-solvant) à des concentrations différentes est ajouté à chaque traitement; il doit correspondre au volume dont on a besoin pour dissoudre la substance chimique à la concentration d'essai la plus élevée. On laisse le solvant se volatiliser (pendant ≥ 18 h, généralement) sous une hotte dépourvue d'éclairage afin d'empêcher la photolyse. Chaque échantillon de sol enrichi est mélangé jusqu'à ce qu'il soit homogène (p. ex., chaque échantillon est transféré dans un récipient en polyéthylène haute densité à revêtement fluorocarbure, puis mélangé pendant 18 h dans un agitateur rotatif tridimensionnel). D'autres méthodes de dissipation du solvant peuvent être utilisées selon la nature de la substance chimique d'essai ou du solvant.

L'échantillon de témoin sol-solvant à inclure dans l'essai doit être préparé de la même manière, mais sans l'ajout de la substance chimique d'essai. En outre, le témoin sol-solvant doit contenir une concentration de solvant aussi élevée que celle présente dans n'importe laquelle des concentrations de sol enrichi avec une substance chimique incluses dans l'essai.

Si la substance chimique qui doit être ajoutée au sol artificiel est insoluble à la fois dans l'eau et dans un solvant organique approprié (non toxique), on devrait préparer un mélange comprenant 2,5 g de sable quartzique industriel finement broyé et la quantité de substance chimique d'essai nécessaire pour obtenir la concentration d'essai souhaitée dans le sol. Les constituants restants du sol artificiel préhumidifié devraient ensuite être incorporés soigneusement dans le mélange. On ajoute enfin la quantité d'eau désionisée nécessaire pour obtenir une teneur en humidité finale de ~ 70 % de la CRE maximale, et on mélange le tout soigneusement. Le

mélange ainsi obtenu de sol enrichi avec une substance chimique peut alors être ajouté aux récipients d'essai.

Si la substance chimique d'essai qui doit être ajoutée au sol naturel est insoluble à la fois dans l'eau et dans un solvant organique approprié (non toxique), elle peut être ajoutée par mélange à sec. La procédure suivante peut être utilisée (Ritchie et coll., 2017; EC, 2014b). On mélange le sol naturel et la quantité de la substance chimique d'essai nécessaire pour obtenir la concentration souhaitée dans le sol. Ce mélange est d'abord combiné à l'aide d'un batteur électrique, puis mélangé pendant plusieurs heures (p. ex., 16 h), à l'aide d'un agitateur mécanique ou d'un batteur (p. ex., mélangeur rotatif) jusqu'à homogénéité. Le *sol enrichi* peut être mélangé avec de l'eau d'essai (p. ex., jusqu'à 50 % de sa teneur en humidité optimale), avant de l'enrichir avec une substance chimique. Chaque concentration peut être mélangée à sec indépendamment. On peut aussi préparer un mélange de la substance chimique d'essai et d'une portion de sol non contaminé à la concentration d'essai la plus élevée, dans un volume suffisant pour répondre aux exigences d'un essai, en diluant le sol enrichi avec du sol non contaminé, après l'enrichissement initial et le mélange. L'efficacité des méthodes de mélange à sec devrait être évaluée par l'analyse chimique d'aliquotes de sol.

Les concentrations de la ou des substances chimiques dans le sol sont habituellement calculées, mesurées et exprimées en milligrammes de substance d'essai par kilogramme de sol (poids sec) (ou en microgrammes par gramme) (ISO, 1999; OCDE, 2009). Les paramètres d'évaluation (p. ex., les CIP) sont également exprimés en fonction du poids sec (v. 4.8 et 6.4).

Les conditions de mélange, y compris le ratio solution/sol, de même que les durées et les températures de brassage et de conservation, doivent être uniformes d'un traitement à un autre dans un essai donné. La durée de mélange d'un sol enrichi devrait être suffisante pour assurer une répartition homogène de la substance chimique, ce qui pourrait prendre de quelques minutes à 24 h. Pendant le mélange, on devrait maintenir la température assez basse pour réduire au minimum l'activité microbienne et l'altération des caractéristiques

physicochimiques du mélange. Il est conseillé d'analyser des sous-échantillons afin de déterminer le degré de mélange et d'homogénéité obtenu.

Certaines études pourraient n'exiger qu'une concentration d'un mélange de sol témoin négatif (ou autre) et de substance chimique, ou encore une seule concentration de sol contaminé ou de déchet particulaire dans un sol témoin négatif ou autre. Par exemple, un essai à concentration unique pourrait avoir pour objet de déterminer si une concentration donnée de substance chimique dans un sol non contaminé est toxique pour les organismes expérimentaux. Un tel essai pourrait servir à la recherche ou à des fins réglementaires (p. ex., « essai limite »).

On devrait exécuter, dans des conditions normalisées, un essai à concentrations multiples sur un sol témoin négatif (ou autre) enrichi afin de déterminer le ou les paramètres souhaités (p. ex., la CIp; v. 4.8 et 6.4). Un essai à concentrations multiples sur un sol témoin négatif enrichi avec un déchet particulaire donné pourrait aussi convenir. Il faut alors prévoir ≥ 7 concentrations d'essai plus le ou les traitements témoins appropriés; on peut toutefois en préparer un plus grand nombre (≥ 10 plus des témoins) (v. 4.1 et 4.8). Si un essai préliminaire est effectué avant l'essai définitif, on peut utiliser moins de concentrations dans l'essai définitif, car on disposera de plus de données sur la gamme de concentrations/dilutions avec effet. Dans ce cas, au moins cinq concentrations d'essai doivent être utilisées. Pour choisir les concentrations d'essai, il faudrait utiliser une série de dilutions géométriques et les choisir de manière à ce que chaque concentration de substance chimique dans le sol corresponde au moins à la moitié de la précédente dans la série (p. ex., 40, 20, 10, 5, 2,5, 1,25, 0,63 mg/kg). On peut aussi employer des dilutions logarithmiques (v. annexe F), ou encore se fonder sur les résultats d'essais toxicologiques préliminaires. On trouvera en 4.1 d'autres conseils au sujet du choix des concentrations d'essai.

Pour choisir la plage de concentrations qui convient, il pourrait être utile de réaliser un essai préliminaire englobant une plage de concentrations plus étendue. Dans un tel essai, on pourrait réduire le nombre de répétitions par traitement (v. 4.1) ou n'utiliser aucune répétition. Selon la variance prévue ou

démontrée (dans des études antérieures sur une substance d'essai identique ou semblable) entre les récipients d'essai d'un traitement, cette réduction pourrait s'appliquer aux tests biologiques préalables exécutés à des fins non réglementaires ou de recherche.

Selon les objectifs de l'essai, il pourrait être souhaitable de déterminer l'influence des caractéristiques du substrat (p. ex., granulométrie ou TMO) sur la toxicité des mélanges de sol et de substance chimique. Par exemple, on pourrait mesurer l'influence de la granulométrie du sol sur la toxicité de la substance chimique par des essais parallèles à concentrations multiples sur une série de mélanges de la substance chimique dans différentes fractions (c.-à-d. des grains de diverses tailles) ou dans divers types de sol témoin négatif naturel ou artificiel (v. 3.3). De même, on pourrait déterminer dans quelle mesure la teneur en COT ou la TMO du sol ou des horizons pédologiques peut modifier la toxicité de la substance chimique en exécutant des essais parallèles à concentrations multiples sur différents mélanges de substance chimique et de sol préparés avec une série de sols témoins négatifs enrichis avec une matière organique. On devrait intégrer dans l'essai, en tant que témoin distinct, chaque fraction ou préparation de sol témoin négatif naturel ou artificiel utilisée pour préparer ces mélanges.

Selon les objectifs et le plan de l'étude, certains essais de toxicité d'un sol avec des acariens pourraient être effectués avec des échantillons de sol témoin négatif ou de référence dans lesquels la ou les substances chimiques sont pulvérisées sur la surface du sol plutôt que mélangées au sol. La pulvérisation en surface peut se faire sur le terrain ou au laboratoire. Une des méthodes possibles consiste à utiliser un pulvérisateur calibré à rampe ou monté sur rails afin de répartir uniformément la substance chimique sur une surface donnée. La concentration de la substance chimique dans le sol peut être déterminée en fonction de la profondeur de pénétration, de l'aire pulvérisée ou de la largeur des bandes, de la taille des buses, de la pression et de la vitesse à laquelle le pulvérisateur couvre la surface (G. Stephenson, AquaTerra Environmental Ltd., comm. pers., 2001). On trouvera dans OCDE (2009) des indications au sujet de la pulvérisation de

substances d'essai sur la surface du sol en vue d'essais sur la reproduction d'acariens.

6.3 Observations et mesures

Au moment du démarrage de l'essai, il faudrait procéder à une description qualitative de chaque mélange de sol enrichi avec une substance chimique. Cette description pourrait inclure des observations relatives à la couleur, à la texture et à l'homogénéité apparente du mélange. Toute modification de l'aspect du mélange observée au cours de l'essai ou à la fin devrait être consignée.

On trouvera en 4.6 les marches à suivre et les exigences connexes aux observations et mesures à effectuer au début, au cours et à la fin de l'essai. Ces observations et mesures s'appliquent aux essais sur un sol enrichi avec une substance chimique, tels qu'ils sont décrits ici, et doivent donc être effectuées. Dans le cas de sols échantillonnés par horizon, les mesures doivent porter sur chaque horizon.

Selon le schéma expérimental et les objectifs de l'essai, on pourrait préparer des récipients d'essai supplémentaires le jour -1 de l'essai (v. 4.1) dans le but de surveiller la composition chimique du sol. Ces récipients feraient l'objet d'un échantillonnage destructif au cours de l'essai (c.-à-d. le jour 0 et, dans certains cas, d'autres jours à mesure que l'essai se déroule) ou à la fin de l'essai. Ces récipients de surveillance seraient installés le jour 0 si l'essai est démarré (c.-à-d. si des organismes sont ajoutés aux récipients d'essai) immédiatement après la préparation du sol d'essai en raison de préoccupations concernant la volatilisation, la dégradation ou le métabolisme des contaminants ou des substances chimiques dans les sols d'essai (v. 6.1). On pourrait ajouter ou non des organismes expérimentaux dans ces récipients supplémentaires, selon les objectifs de l'étude. Pour mesurer les concentrations de la ou des substances chimiques dans le sol de ces récipients d'essai, on pourrait en prélever des aliquotes aux fins des différentes analyses au début, au cours ou à la fin de l'essai, selon la nature du toxique et les objectifs de l'essai.

Des mesures de la qualité (c.-à-d. le pH et la teneur en humidité du sol) de chaque mélange de sol enrichi soumis à l'essai (y compris le sol témoin négatif) doivent être effectuées et consignées au début et à la fin de l'essai, comme il est expliqué en 4.6. Si on dispose de la capacité d'analyse voulue, il est recommandé d'analyser la ou les solutions mères en parallèle avec un ou des sous-échantillons de chaque mélange de sol enrichi afin de mesurer les concentrations de la ou des substances chimiques et de déterminer si le sol a été enrichi de manière satisfaisante. Ces échantillons devraient être conservés, entreposés et analysés selon des méthodes convenables et éprouvées.

Pour tout essai toxicologique dans lequel on a dosé les substances chimiques dans chaque mélange de sol enrichi, on devrait calculer et exprimer les résultats en fonction de ces dosages, à moins d'avoir de bonnes raisons de croire qu'ils ne sont pas exacts. On devrait au moins prélever des aliquotes des échantillons représentatifs des concentrations élevée, moyenne et faible au début et à la fin de l'essai⁸⁵; les valeurs des paramètres seraient alors calculées en fonction des valeurs nominales (v. 4.8 et 6.4). Tous les dosages devraient être comparés, consignés et analysés sous l'angle de leur degré d'écart par rapport aux valeurs nominales. Si on se sert de ces valeurs pour exprimer les résultats d'un essai toxicologique, on doit l'indiquer explicitement dans le rapport d'essai (v. 7.1.6).

6.4 Paramètres et calculs

Les essais à concentrations multiples sur des mélanges de sol enrichi sont caractérisés par des paramètres statistiques qui leur sont propres (v. 4.8). Des conseils relatifs au calcul de la CIp (à partir de données montrant une inhibition de la reproduction) sont fournis en 4.8.1. Les indications présentées en 5.6 au sujet du calcul et de la comparaison des paramètres pour les essais à concentration unique sur des échantillons de sol prélevés sur le terrain s'appliquent également aux essais à concentration unique sur des mélanges de sol enrichi. Pour en savoir plus au sujet des méthodes statistiques

⁸⁵ Il peut avoir été démontré que certaines substances chimiques sont stables dans les conditions particulières de l'essai et que leur concentration est peu susceptible de

changer au cours de l'essai. Dans ce cas, l'expérimentateur pourrait choisir d'analyser seulement des échantillons prélevés au début de l'essai.

paramétriques (ou non paramétriques) applicables aux paramètres de l'essai, les expérimentateurs devraient consulter EC (2005b).

Dans tout essai incluant un témoin sol-solvant (v. 6.2), il faut examiner les résultats obtenus pour les acariens élevés dans ce témoin et dans le sol témoin négatif afin de déterminer s'ils sont respectivement conformes aux critères de validité de l'essai (v. 4.4). Si ces critères ne sont pas satisfaits pour l'un ou l'autre témoin, on doit considérer que les résultats de l'essai sont non valides. S'ils sont satisfaits dans les deux cas, les résultats du témoin sol-solvant devraient être utilisés dans l'analyse statistique⁸⁶. Toutefois, s'ils sont satisfaits dans les deux cas, mais que le taux de survie ou de reproduction diffère grandement entre les deux témoins, cela pourrait indiquer l'existence d'une

interférence possible du solvant, et on devrait alors procéder à une évaluation supplémentaire pour en mesurer l'incidence sur l'interprétation de l'essai. On trouvera dans USEPA (2008) des indications sur ce que pourrait inclure une telle évaluation : 1) degré de pertinence de la réponse dans le témoin sol-solvant (à savoir le pourcentage de changement par rapport à la réponse dans le sol témoin); 2) degré de signification statistique connexe à la différence entre les deux témoins (c.-à-d. écart hautement ou très peu significatif); 3) ampleur de l'interférence; 4) examen de toute autre cause potentielle de l'interférence observée dans le témoin sol-solvant; 5) incidence de cette interférence possible sur l'incertitude de l'estimation du risque.

⁸⁶ Les données recueillies à ce jour avec les organismes expérimentaux aquatiques (Hutchinson et coll., 2006) ont démontré que les solvants exercent rarement un effet direct sur l'organisme expérimental. Cependant, si le solvant avait un effet sur l'organisme expérimental, ces effets seraient presque toujours cumulatifs par rapport à la substance d'essai, et l'utilisation du témoin sol-solvant compense cela (Green, 2014). De plus, il pourrait y avoir

une interaction entre la substance d'essai et le solvant qui modifie la toxicité. Il est difficile de démontrer de manière définitive que cette interaction est absente ou présente, car la substance d'essai n'est pas évaluée en l'absence du solvant. Pour cette raison, le témoin sol-solvant est le choix approprié pour les comparaisons (OCDE, 2006).

Section 7

Rapports à produire

Le rapport relatif à chaque essai doit mentionner tout écart par rapport aux *exigences* exposées dans les sections 2 à 6 de la présente méthode et, le cas échéant, fournir des précisions. Le lecteur doit pouvoir déterminer, à partir de ce rapport, si les conditions et les modes opératoires préalables et expérimentaux ont rendu les résultats valides et acceptables pour l'usage qu'on entend en faire.

La sous-section 7.1 ci-après énumère les renseignements à inclure dans le rapport relatif à chaque essai. Les renseignements à inclure dans le rapport d'essai, fournis séparément dans un rapport général ou conservés pendant ≥ 5 ans, sont précisés en 7.2. Des programmes particuliers de surveillance, des protocoles expérimentaux connexes ou des règlements pourraient exiger de faire figurer dans le rapport d'essai ou de *conserver dans les dossiers* les renseignements énumérés en 7.2 (p. ex., précisions sur la substance ou matière d'essai ou sur les conditions et modes opératoires relatifs au prélèvement, à la manipulation, au transport et à l'entreposage des échantillons).

On peut citer les conditions et modes opératoires communs à une série d'essais courants (p. ex., les essais de toxicité exécutés régulièrement aux fins de surveillance ou de conformité aux règlements) et satisfaisant aux exigences de la présente méthode; on peut aussi joindre un rapport général exposant dans ses grandes lignes la pratique ordinairement suivie en laboratoire.

Les précisions concernant la conduite et les résultats de l'essai qui ne sont incluses ni dans le rapport d'essai ni dans un rapport général doivent être consignées et conservées par le laboratoire pendant ≥ 5 ans, de sorte qu'on puisse fournir l'information pertinente si l'essai doit faire l'objet d'une vérification (v. 7.2).

7.1 Exigences minimales pour le rapport d'essai

Voici la liste des renseignements à inclure dans le rapport relatif à chaque essai.

7.1.1 Substance ou matière d'essai

- Courte description du type d'échantillon (p. ex., boues résiduelles, sol de référence ou sol contaminé prélevé sur le terrain, horizon pédologique, sol témoin négatif) ou du codage de l'échantillon, tel qu'il a été fourni au personnel de laboratoire;
- renseignements sur l'étiquetage ou le codage de chaque échantillon;
- courte description des procédures d'échantillonnage, d'entreposage et de préparation (c.-à-d. de prétraitement) du sol;
- renseignements sur les horizons pédologiques, tels qu'ils ont été prélevés (nombre, profondeur relative de chacun) en tant que sol d'essai, sol de référence et sol témoin négatif, le cas échéant;
- type de sol témoin négatif (naturel ou artificiel) et, le cas échéant, sol de référence;
- date du prélèvement de chaque échantillon; date et heure de réception de chaque échantillon au laboratoire d'essais.
- température et teneur en humidité de l'échantillon dès sa réception au laboratoire d'essai.

7.1.2 Organismes expérimentaux

- Espèce et provenance du stock de géniteurs et des organismes expérimentaux;
- plage d'âge des organismes au début de l'essai;

- tout aspect, comportement ou traitement inhabituel des organismes, avant leur utilisation dans l'essai.

7.1.3 Installations d'essai

- Nom et adresse du laboratoire d'essais;
- la ou les personnes ayant exécuté l'essai (ou chacune des parties de celui-ci) et vérification des résultats.

7.1.4 Méthode d'essai

- Nom de la méthode d'essai biologique (à savoir celle décrite dans le présent document);
- plan d'étude et description de toute procédure spéciale (p. ex., manipulation des sols; préparation des mélanges de sol enrichi; préparation et emploi d'un solvant et, dans ce cas, du témoin sol-solvant) ou de toute modification apportée à la méthode normalisée;
- brève description de la fréquence et de la nature de toutes les observations et mesures effectuées au cours de l'essai;
- nom du ou des programmes et des méthodes employés pour calculer les paramètres statistiques et renvois à ces programmes et méthodes.

7.1.5 Conditions et modes opératoires

- Raison et description de tout écart ou de toute omission en regard des conditions et modes opératoires exposés dans le présent document;
- nombre d'échantillons distincts par traitement; nombre de répétitions par traitement; nombre et description des traitements de chaque essai, y compris le ou les témoins; concentrations d'essai (s'il y a lieu);
- quantité de sol (épaisseur du sol) par récipient d'essai;
- nombre d'organismes par récipient d'essai et par traitement;

- dates et heures de préparation des sols d'essai et des sols témoins, de début (c.-à-d. les organismes ajoutés aux sols d'essai et témoins) et de fin de l'essai;
- aliments et rations donnés aux organismes pendant l'essai;
- indication de l'aération du récipient d'essai et évaluation de l'humidité du sol pendant l'essai;
- pour chaque échantillon de sol : toutes les mesures relatives à la granulométrie, à la teneur en humidité, à la CRE, au pH, à la COT, à la TMO, à la CEC et à la conductivité;
- pour chaque échantillon composite de sous-échantillons prélevés au même moment dans toutes les répétitions de chaque traitement : ensemble des mesures relatives à la température (air et sol), au pH, à la teneur en humidité et à la CRE.

7.1.6 Résultats

- Pourcentage moyen (\pm ET) de survie des acariens adultes dans chaque traitement, y compris le ou les sols témoins et de référence le jour 28; nombre moyen (\pm ET) de descendants vivants dans chaque traitement, y compris le ou les sols témoins et de référence le jour 28;
- toute CIp (et ses limites de confiance à 95 %) qui a été déterminée d'après les données sur le succès de l'inhibition de la reproduction (nombre de juvéniles vivants dans chaque traitement à la fin de l'essai); précisions relatives à toute transformation des données et indication de la méthode statistique quantitative utilisée ou des procédures appliquées aux données;
- essai à concentrations multiples sur un sol enrichi avec une substance chimique : indication selon laquelle les résultats se fondent sur les concentrations nominales ou mesurées de la ou des substances chimiques; toutes les valeurs des concentrations mesurées et degré d'écart par rapport à la valeur nominale;

- résultats pour toute CI50 28 jours (et ses limites de confiance à 95 %) ou le pourcentage de réduction dans la production de descendants par rapport au témoin, dans le cas des essais à concentrations multiples ou concentrations témoins positives, respectivement, effectués avec le toxique de référence parallèlement à l'essai définitif de toxicité du sol; valeur de la moyenne géométrique (± 2 ET) pour le même toxique de référence, obtenue par le laboratoire dans des essais antérieurs avec le toxique de référence, exécutés selon les conditions et modes opératoires décrits ici pour les essais avec un toxique de référence;
- toute anomalie dans le déroulement de l'essai, tout problème observé et toute mesure corrective mise en œuvre.

7.2 Exigences supplémentaires

La présente section propose une liste des éléments qu'il faut soit inclure dans le rapport d'essai ou le rapport général, soit conserver dans les dossiers pendant ≥ 5 ans. Les renseignements déposés doivent inclure ce qui suit, le cas échéant :

- le formulaire de la chaîne de possession des échantillons prélevés sur le terrain ou autres, mis à l'essai aux fins de surveillance ou d'application d'un règlement;
- une copie du dossier d'acquisition de l'échantillon ou des échantillons;
- les résultats des analyses chimiques de l'échantillon ou des échantillons ne figurant pas dans le rapport d'essai;
- les notes de laboratoire sur les observations et les mesures effectuées au cours de l'essai;
- les notes de laboratoire et la ou les cartes de contrôle des essais toxicologiques de référence;
- des renseignements sur l'étalonnage de l'équipement et des instruments.

Le personnel de laboratoire effectuant les essais doit signer ou parapher les feuilles de données originelles et les dater.

7.2.1 Substance ou matière d'essai

- Nom de la ou des personnes qui ont prélevé ou fourni l'échantillon;
- fiches d'inscription de l'échantillon;
- apparence (p. ex., odeur, couleur) et état (p. ex., conservation dans l'obscurité, dans un récipient fermé hermétiquement) de l'échantillon à la réception au laboratoire et pendant l'entreposage;
- tout autre renseignement obtenu pour les échantillons prélevés sur le terrain (p. ex., les renseignements fournis ou conservés pendant le prélèvement des échantillons) ou les échantillons de substances chimiques (impuretés, additifs, formules structurales, etc.).

7.2.2 Organismes expérimentaux

- Renseignements et méthodes utilisés pour la confirmation taxonomique des espèces expérimentales;
- antécédents et âge du stock de géniteurs de tout élevage d'où proviennent les organismes expérimentaux;
- description des conditions et des modes opératoires d'élevage (ainsi que les élevages synchrones), y compris les éléments suivants : température, éclairage, type et quantité de substrat, détails sur le renouvellement périodique du substrat, méthodes et renseignements sur l'aération et l'hydratation du substrat; mesures et renseignements sur la qualité du substrat, densité de chargement des acariens, registres des conditions d'élevage, indices de santé et de performance; tout mode opératoire et toute condition d'acclimatation (p. ex., substrat et température), y compris le taux de changement;

- méthodes de préparation des élevages synchrones;
- techniques de dénombrement, de manipulation, de tri et de transfert des animaux; modes opératoires ayant servi à déterminer la mortalité, l'état, l'aspect et le comportement de ces derniers;
- origine et composition de la nourriture, méthodes de préparation et de conservation des aliments, méthode d'alimentation, fréquence des repas et rations.

7.2.3 Installations d'essai et appareillage

- Tous les résultats des essais initiaux sur un sol témoin négatif et avec un toxique de référence, entrepris par le laboratoire alors qu'il ne possédait pas d'expérience dans l'application de la méthode d'essai biologique décrite ici, avant tout rapport concernant les résultats d'un essai définitif (v. 3.2.1);
- description des systèmes d'éclairage et de régulation de la température dans l'installation d'essai;
- description des récipients d'essai et des couvercles;
- description des méthodes employées pour nettoyer ou rincer le matériel.

7.2.4 Sol témoin négatif ou sol de référence

- Modes opératoires de préparation (dans le cas d'un sol artificiel) ou prétraitement (dans le cas d'un sol naturel) du sol témoin négatif;
- provenance du sol naturel; historique de l'utilisation de pesticides ou d'autres contaminants et rapports d'analyses;
- préparation du sol artificiel, y compris les sources des constituants et les conditions et modes opératoires pour l'hydratation du sol et l'ajustement du pH;

- conditions et durée de l'entreposage avant l'utilisation.

7.2.5 Méthode d'essai

- Modes opératoires de mélange ou de manipulation des sols d'essai avant leur utilisation; temps écoulé entre la préparation des sols et la réalisation de l'essai;
- mode opératoire de préparation des solutions mères ou des solutions d'essai de substances chimiques; description et concentration de tout solvant utilisé;
- précisions sur le prélèvement, la préparation et l'entreposage d'aliqotes avant les analyses physicochimiques; information disponible au sujet des méthodes d'analyse employées (avec renvois);
- exécution et description de l'essai préliminaire.

7.2.6 Conditions et modes opératoires

- Photopériode et mesures de l'intensité lumineuse en un point adjacent à la surface du sol dans les récipients d'essai;
- mode opératoire employé pour transférer les organismes expérimentaux dans les récipients d'essai;
- aspect de chaque échantillon (ou mélange d'échantillons) dans les récipients d'essai; tout changement d'aspect observé pendant l'essai;
- données sur l'hydratation (avec l'eau d'essai) de la surface du sol de chaque récipient pendant l'essai pour en accroître l'humidité;
- données sur la croissance des bactéries ou des champignons, ainsi que sur la présence et la quantité estimée de tout aliment non consommé;
- description des modes opératoires utilisés pour l'extraction à la chaleur des organismes expérimentaux et données liées à l'heure et aux températures obtenues pendant l'extraction à la chaleur;

- modes opératoires utilisés pour évaluer et valider l'efficacité de la procédure d'extraction à la chaleur et données démontrant l'établissement et la surveillance continue de l'efficacité de l'extraction à la chaleur;
- toute autre analyse physicochimique (p. ex., analyses d'aliqotes provenant du même lot afin de déterminer l'homogénéité, la concentration des contaminants, les cations et les anions, l'azote, les nitrates, les nitrites, l'ammoniac, le phosphore, le potassium, le ratio C/N, la masse volumique apparente, les solides volatils totaux, la demande biochimique en oxygène, la demande chimique en oxygène, la teneur en carbone inorganique total, le potentiel d'oxydoréduction, les sels solubles, le rapport d'adsorption du sodium) effectuée avant et pendant l'essai sur la matière d'essai (y compris le sol témoin négatif et le sol de référence) et le contenu des récipients d'essai, y compris les analyses du sol entier et de l'eau de porosité;
- toute autre observation ou analyse faite sur la matière d'essai (y compris les échantillons de sol témoin négatif ou de sol de référence), par exemple, les données qualitatives ou quantitatives sur la macrofaune indigène ou les détritiques, ou les résultats d'analyses géochimiques;
- toute analyse chimique de la concentration de substance chimique dans la ou les solutions mères du toxique de référence et, le cas échéant, dans les concentrations d'essai.

7.2.7 Résultats

- Résultats de tout essai préliminaire;
- nombre d'acariens adultes vivants dans chaque récipient d'essai à la fin de l'essai; nombre de descendants vivants dans chaque récipient d'essai à la fin de l'essai; pour les analyses de régression, conserver dans les dossiers les données relatives au nombre d'échantillons (p. ex., nombre de répétitions par traitement), les valeurs estimatives des paramètres avec la variance, tout tableau ANOVA produit, les graphiques des valeurs ajustées et observées de tout modèle utilisé, les données de sortie du programme statistique (p. ex., SYSTAT);
- cartes de contrôle montrant les résultats les plus récents et les résultats antérieurs d'essais de toxicité de référence sur 28 jours ou des concentrations témoins positives effectués avec le toxique de référence; CV pour les données antérieures moyennes obtenues grâce aux essais de toxicité de référence ou concentrations témoins positives effectués avec le toxique de référence;
- représentation graphique des données.

Références

- [AAC] Agriculture et Agroalimentaire Canada. 1998. Le système canadien de classification des sols, troisième édition. Groupe de travail sur la classification des sols. Publication 1646. Ottawa (Ontario) : Presses scientifiques du CNRC. 196 p.
- Adamski, Z., Bloszyk, J., Bruin, J., Ziemnicki, K. 2007. Non-omnia Moriantur – Toxicity of Mancozeb on Dead Wood Microarthropod Fauna. *Experimental and Applied Acarology*, 42:47-53.
- [AESA] Alberta Environmentally Sustainable Agriculture Program. 2001. AESA Soil Quality Benchmark Study – Soil Organic Matter, Fact Sheet FS2001-ISQ, AESA Soil Quality Program. Edmonton (Alberta) : Direction de la conservation et du développement, ministère de l'Agriculture, de l'Alimentation et du Développement rural de l'Alberta. 4 p.
- Al-Assiuty, A.I.M., Khalil, M.A. 1995. The Influence of Insecticide-Pheromone Substitution on the Abundance and Distributional Pattern of Soil Oribatid Mites. *Experimental and Applied Acarology*, 19:399-410.
- Al-Assiuty, A.I.M., Khalil, M.A., Abdel-Lateif, H.M. 2000. Effects of Dry Sludge Application on Soil Microarthropod Communities in a Reclaimed Desert Ecosystem. *Pedobiologia*, 44:567-578.
- AquaTerra Environmental Ltd. 1998. Development of a Reproduction Toxicity Test with *Onychiurus folsomi* for Assessment of Contaminated Soils. Rapport préparé par AquaTerra Environmental, Ltd. (Orton, Ontario) pour Environnement Canada, Ottawa, Ontario. 253 p.
- [ASTM] American Society for Testing and Materials. 2004. Standard Guide for Conducting Laboratory Soil Toxicity or Bioaccumulation Tests with the Lumbricid Earthworm *Eisenia fetida* and the Enchytraeid Potworm *Enchytraeus albidus*. West Conshohocken (Pennsylvanie) : ASTM International. ASTM E1676-04. 27 p.
- ASTM. 2014. Standard Guide for Use of Lighting in Laboratory Testing. West Conshohocken (Pennsylvanie) : ASTM International. ASTM E1733-95(2014). 12 p.
- Battigelli, J.P., Spence, J.R., Langor, D.W., Berch, S.M. 2004. Short-term Impact of Forest Soil Compaction and Organic Matter Removal on Soil Mesofauna Density and Oribatid Mite Diversity. *Canadian Journal of Forest Research*, 34:1136-1149.
- Becker-van Slooten, K., Auroy, A., Stämpfli, C., Tarradellas, J. 2005. Further Research in Support of the Environment Canada Collembola Toxicity Test Method with *Folsomia candida* and *Folsomia fimetaria* for Assessment of Contaminated Soils and Soils Amended with Substances. Rapport préparé par le Laboratoire de chimie environnementale et écotoxicologie (CECOTOX), École polytechnique fédérale de Lausanne (EPFL), ENAC-ISTE (Lausanne, Suisse), pour Environnement Canada, Ottawa, Ontario. 36 p.
- Becker-van Slooten, K., Campiche, S., Tarradellas, J. 2003. 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 (Lausanne, Suisse), pour Environnement Canada, Ottawa, Ontario.
- Becker-van Slooten, K., Campiche, S., Tarradellas, J. 2004. Research in Support of the Environment Canada Soil Toxicity Test Methods: Consideration of Various Methods for Measuring Soil pH, Water Holding Capacity, and Water Filled Pore Space. Rapport préparé par le Laboratoire de chimie environnementale et écotoxicologie (CECOTOX), École polytechnique fédérale de Lausanne (EPFL), ENAC-ISTE (Lausanne, Suisse) pour Environnement Canada, Ottawa, Ontario. 29 p.

- Behan, V.M. 1978. Diversity, Distribution and Feeding Habits of North American Arctic Soil Acari. Thèse de doctorat, Université McGill. 428 p.
- Behan, V.M., Hill, S.B., Kevan, D.K.M. 1978. Effects of Nitrogen Fertilizers, as Urea, on Acarina and Other Arthropods in Quebec Black Spruce Humus. *Pedobiologia*, 18:249-263.
- Behan-Pelletier, V.M. 1999. Oribatid Mite Biodiversity in Agroecosystems: Role for Bioindication. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 74:411-423.
- Blakely, J.K., Neher, D.A., Spongberg, A.L. 2002. Soil Invertebrate and Microbial Communities, and Decomposition as Indicators of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Contamination. *Applied Soil Ecology*, 21:71-88.
- [Bonnell] Bonnell Environmental Consulting. 1994. Assessment of Soil Toxicity Test Species for Canadian Representativeness, Technical Report TS-28. Préparé par Bonnell Environmental Consulting pour Environnement Canada, Ottawa, Ontario.
- Cannon, R.J.C, Block, W. 1988. Cold Tolerance of Microarthropods. *Biological Reviews Cambridge Philosophical Society*, 63:23-77.
- Carter, M.R. (éd.). 1993. Soil Sampling and Methods of Analysis. Boca Raton (Floride) : Lewis Publishers, CRC Press Inc.
- Carter, M.R., Gregorich, E.G. (éd.). 2008. Soil Sampling and Methods of Analysis, Second Edition. Boca Raton (Floride) : Taylor & Francis Group, CRC Press.
- [CCME] Conseil canadien des ministres de l'environnement. 1994. A Framework for Ecological Risk Assessment at Contaminated Sites in Canada: Review and Recommendations. Scientific Series 199. Programme national relatif aux lieux contaminés, Direction générale de la conservation des écosystèmes, Direction de l'évaluation et de l'interprétation, Environnement Canada, Ottawa, Ontario. 108 p.
- CCME. 1996. Cadre pour l'évaluation du risque écotoxicologique : Orientation générale. Sous-comité du CCME sur les critères de qualité environnementale pour les lieux contaminés, Programme national d'assainissement des lieux contaminés, Winnipeg, Manitoba. 37 p.
- CCME. 1997. Cadre de travail pour l'évaluation du risque écotoxicologique : annexes techniques. Sous-comité du CCME sur les critères de qualité environnementale pour les lieux contaminés, Programme national d'assainissement des lieux contaminés, Winnipeg, Manitoba. 73 p.
- Coleman, D.C., Crossley, D.A. Jr, Hendrix, P.F. 2004. Fundamentals of Soil Ecology. Londres (Royaume-Uni) : Academic Press.
- Cortet, J., Gillon, D., Joffre, R., Ourcival, J.-M., Poinot-Balaguer, N. 2002. Effects of Pesticides on Organic Matter Recycling and Microarthropods in a Maize Field: Use and Discussion of the Litterbag Methodology. *European Journal of Soil Biology*, 38:261-265.
- Courchesne, F., Savoie, S., Dufresne, A. 1995. Effects of Air-Drying on the Measurement of Soil pH in Acidic Forest Soils of Quebec, Canada. *Soil Science*, 160:56-68.
- Crépin, J., Johnson, R.L. 1993. Soil Sampling for Environmental Assessment. In: *Soil Sampling and Methods of Analysis*, M.R. Carter (éd.). Boca Raton (Floride) : Lewis Publishers, CRC Press Inc., p. 5-18.
- Crossley, D.A. Jr, Bohnsack, K.K. 1960. Long-Term Ecological Study in the Oak Ridge Area: III. The Oribatid Mite Fauna in Pine Litter. *Ecology*, 41:628-638.
- de Lima e Silva, C., Brennan, N., Brouwer, J.M., Commandeur, D., Verweij, R.A., van Gestel, C.A.M. 2017. Comparative Toxicity of Imidacloprid and Thiacloprid to Different Species of Soil Invertebrates. *Ecotoxicology*, 26:555-564.

- Deitzer, G. 1994. Spectral Comparisons of Sunlight and Different Lamps. In : *Proceedings of International Lighting in Controlled Environments Workshop*, T.W. Tibbits (éd.), Madison, Wisconsin, p. 197-199.
- Denton, D., Diamond, J., Zheng, L. 2011. Test of Significant Toxicity: A Statistical Application for Assessing Whether an Effluent or Site Water is Truly Toxic. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30:1117-1126.
- Dunnett, C.W. 1955. A Multiple Comparison Procedure for Comparing Several Treatments with a Control. *Journal of the American Statistical Association*, 50:1096-1121.
- [EC] Environnement Canada. 1995. Document d'orientation sur la mesure de la précision des essais de toxicité sur sédiment de contrôle dopé avec un produit toxique de référence. Ottawa (Ontario) : Environnement Canada. Rapport SPE 1/RM/30. 74 p.
- EC. 1999. Guide des essais écotoxicologiques employant une seule espèce et de l'interprétation de leurs résultats. Ottawa (Ontario) : Environnement Canada. Rapport SPE 1/RM/34. 233 p.
- EC. 2004a. Méthode d'essai biologique : essais pour déterminer la toxicité de sols contaminés pour les vers de terre (*Eisenia andrei*, *Eisenia fetida* ou *Lumbricus terrestris*). Ottawa (Ont.) : Environnement Canada. Rapport SPE 1/RM/43. 163 p.
- EC. 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. Compte rendu de l'atelier tenu du 19 au 21 février 2003 au Centre des sciences environnementales du Pacifique, à North Vancouver, en Colombie-Britannique. Rapport publié par Environnement Canada, Ottawa, Ontario. 69 p.
- EC. 2005a. Méthode d'essai biologique : Essai de mesure de la levée et de la croissance de plantes terrestres exposées à des contaminants dans le sol. Ottawa (Ontario) : Environnement Canada. Rapport SPE 1/RM/45 (incluant les modifications de juin 2007). 155 p.
- EC. 2005b. Document d'orientation sur les méthodes statistiques applicables aux essais d'écotoxicité. Ottawa (Ontario) : Environnement Canada. Rapport SPE 1/RM/46. 306 p.
- EC. 2007a. Méthode d'essai biologique : Essai de reproduction et de survie du cladocère *Ceriodaphnia dubia*, deuxième édition. Ottawa (Ontario) : Environnement Canada. Rapport SPE 1/RM/21. 101 p.
- EC. 2007b. Méthode d'essai biologique : Essai de mesure de l'inhibition de la croissance de la plante macroscopique dulcicole *Lemna minor*, deuxième édition. Ottawa (Ontario) : Environnement Canada. Rapport SPE 1/RM/37. 140 p.
- EC. 2010. Development and Standardization of New Toxicity Test Methodologies and Guidance for Assessment and Remediation of Impacts from Hydrocarbon and Brine Contamination on Boreal Forest, Taiga and Northern Soil using Organisms Representative of the Eco-zone Regions, Five Year Technical Progress Report. Ottawa (Ontario) : Environnement Canada, 167 p.
- EC. 2011a. Méthode d'essai biologique : Essai sur la fécondation chez les échinides (oursins globuleux et oursins plats), deuxième édition. Ottawa (Ontario) : Environnement Canada. Rapport SPE 1/RM/27. 152 p.
- EC. 2011b. Méthode d'essai biologique : essai de croissance et de survie sur les têtes-de-boule, deuxième édition. Ottawa (Ontario) : Environnement Canada. Rapport SPE 1/RM/22. 108 p.
- EC. 2012. Guide d'échantillonnage et de préparation de sol contaminé aux fins d'essais biologiques. Ottawa (Ontario) : Environnement Canada. Rapport SPE 1/RM/53. 248 p.

- EC. 2013a. Méthode d'essai biologique : essai de croissance de plantes terrestres indigènes de la région boréale exposées à un sol contaminé. Ottawa (Ontario) : Environnement Canada. Rapport SPE 1/RM/56. 148 p.
- EC. 2013b. Development and Standardization of Toxicity Test Methodologies for Assessment of Impacts from Contamination using Species and Microbial Communities Representative of Canadian Boreal and Taiga Eco-Zones, Technical Report: 2010-2013. Ottawa (Ontario) : Environnement Canada. 245 p.
- EC. 2014a. Méthode d'essai biologique : Essai de mesure de la survie et de la reproduction de collemboles exposés à des contaminants dans le sol, deuxième édition. Ottawa (Ontario) : Environnement Canada. Rapport SPE 1/RM/47. 188 p.
- EC. 2014b. Estimation of Chemical Bioavailability to Soil Organisms with CMP Substances from the Medium Priority List: Comparison of the Toxicity of Zinc Moieties, Technical Report. Ottawa (Ontario) : Environnement Canada. 148 p.
- [ECCC] Environnement et Changement climatique Canada. 2018. Development of a New Environment Canada Test Method for Measuring Reproduction in Soil Using the Oribatid Mite, *Oppia nitens*, Technical Report. Ottawa (Ontario) : Environnement et Changement climatique Canada. 43 p.
- ECCC. 2019. Inter-Laboratory Validation of Environment and Climate Change Canada's New Test Method for Measuring Reproduction of Oribatid Mites Exposed to Contaminants in Soil, Technical Report. Ottawa (Ontario) : Environnement et Changement climatique Canada. 94 p.
- EcoDynamics Consulting Inc. 2007. Sampling in the Swan Hills and Peace River Areas of Alberta and the Torch River Area of Saskatchewan. Document préparé pour Environnement Canada, Ottawa, Ontario. 23 p.
- EcoDynamics Consulting Inc. 2011a. Ecological Description of the Ontario Reference Site. Document préparé pour Environnement Canada, Ottawa, Ontario.
- EcoDynamics Consulting Inc. 2011b. Soil Sampling and Ecological Description at the Newfoundland Reference Site. Document préparé pour Environnement Canada, Ottawa, Ontario. 8 p.
- Erstfeld, K.M., Snow-Ashbrook, J. 1999. Effects of Chronic Low-Level PAH Contamination of Soil Invertebrate Communities. *Chemosphere*, 39:2117-2139.
- Gainer, A., Cousins, M., Hogan, N., Siciliano, S.D. 2018. Petroleum Hydrocarbon Mixture Toxicity and a Trait-Based Approach to Soil Invertebrate Species for Site-Specific Risk Assessments. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 37:2222-2234.
- Gainer, A., Hogan, N., Siciliano, S.D. 2019. Soil Invertebrate Avoidance Behaviour Identifies Petroleum Hydrocarbon Contaminated Soils Toxic to Sensitive Plant Species. *Journal of Hazardous Materials*, 361:338-347.
- [GCTÉco] Groupe consultatif technique sur l'écologie. 2006. Five-Year Review of the Canada-Wide Standards for Petroleum Hydrocarbons (PHC CWS); Ecological, Direct Soil Contact Guidance, Report to the Canadian Council of Ministers of Environment Soil Quality Guidelines Task Group. 5 p.
- Gergócs, V., Hufnagel, L. 2009. Application of Oribatid Mites as Indicators: A Review. *Applied Ecology and Environmental Research*, 7:79-98.
- Green, J.W. 2014. Power and Control Choice in Aquatic Experiments with Solvents. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 102:142-146.
- Greenslade, P., Vaughan, G.T. 2003. A Comparison of Collembola Species for Toxicity Testing of Australian Soils. *Pedobiologia*, 47:171-179.

- Hansen, R.A. 2000. Effects of Habitat Complexity and Composition on a Diverse Litter Microarthropod Assemblage. *Ecology*, 81:1120-1132.
- Hausenbuiller, R.L. 1985. Soil Science –Principles and Practices, 3rd Edition. Dubuque (Iowa) : W.C. Brown Publisher.
- Heethoff, M., Laumann, M., Bergmann, P. 2007. Adding to the Reproductive Biology of the Parthenogenetic Oribatid Mite, *Archezogetes longisetosus* (Acari, Oribatida, Trhypochthoniidae). *Turkish Journal of Zoology*, 31:151-159.
- Hendershot, W.H., Lalonde, H., Duquette M. 1993. Soil Reaction and Exchangeable Acidity. In: *Soil Sampling and Methods of Analysis*, M.R. Carter (éd.). Boca Raton (Floride) : Lewis Publishers. p. 141-145.
- Heneghan, L., Coleman, D.C., Zou, X., Crossley, D.A. Jr, Haines, B.L. 1999. Soil Microarthropod Contributions to Decomposition Dynamics: Tropical-Temperate Comparisons of a Single Substrate. *Ecology*, 80:1873-1882.
- Hennessy, R. 2010. Boreal Invertebrate Testing Towards: Development of Tier 2 Soil Eco-Contact Guidelines for Field Wide Application using Boreal Forest Species. Rapport technique préparé pour WorleyParsons – Infrastructure & Environment, Calgary, Alberta. 46 p.
- Hoenig, J.M., Heisey, D.M. 2001. The Abuse of Power: The Pervasive Fallacy of Power Calculations for Data Analysis. *The American Statistician*, 55:19-24.
- Holst, R.W., Ellanger, T.C. 1982. Pesticide Assessment Guidelines. Subdivision J. Hazard Evaluation: Non-Target Plants, Office of Pesticides and Toxic Substances, United States Environmental Protection Agency, Washington, D.C., Report EPA-540/9-82-020. 60 p.
- Huguier, P., Manier, N., Owojori, O.J., Bauda, P., Pandard, P., Römbke, J. 2015. The Use of Soil Mites in Ecotoxicology: A Review. *Ecotoxicology*, 24:1-18.
- Hutchinson, T.H., Shillabeer, N., Winter, M.J., Pickford, D.B. 2006. Acute and Chronic Effects of Carrier Solvents in Aquatic Organisms: A Critical Review. *Aquatic Toxicology*, 76:69-92.
- [ISO] Organisation internationale de normalisation. 1995. Qualité du sol — Dosage du carbone organique et du carbone total après combustion sèche (analyse élémentaire). Genève (Suisse), ISO 10694. 7 p.
- ISO. 1999. Qualité du sol — Inhibition de la reproduction de Collembola (*Folsomia candida*) par des polluants du sol. Genève (Suisse), ISO 11267. 16 p.
- ISO. 2005. Qualité du sol — Vocabulaire. Genève (Suisse), ISO 11074. 83 p.
- ISO. 2019a. Qualité du sol — Identification des espèces par codes-barres ADN dans les essais d'écotoxicologie. Genève (Suisse), ISO 21286:2019. 21 p.
- ISO. 2019b. Qualité du sol — Inhibition de la reproduction de l'acarien prédateur (*Hypoaspis aculeifer*) par des contaminants du sol. Genève (Suisse), ISO 21285:2019. 23 p.
- ISO. 2019c. Qualité du sol — Essai de détermination de l'inhibition de la reproduction chez les acariens oribates (*Oppia nitens*) exposés aux contaminants dans le sol. Genève (Suisse), ISO 23266:2019.
- Johnston, J.M., Crossley, D.A. Jr. 2002. Forest Ecosystem Recovery in the Southeast US: Soil Ecology as an Essential Component of Ecosystem Management. *Forest Ecology and Management*, 155:187-203.
- Keddy, C., Greene, J.C., Bonnell, M.A. 1995. Review of Whole-Organism Bioassays: Soil, Freshwater Sediment, and Freshwater Assessment in Canada. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 30:221-251.

- Köhler, H.R., Alberti, G., Seniczak, S., Seniczak, A. 2005. Lead-Induced Hsp70 and Hsp60 Pattern Transformation and Leg Malformation During Postembryonic Development in the Oribatid Mite, *Archeogozetes longisetosus* Aoki. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 141:398-405.
- Lebrun, P., van Straalen, N.M. 1995. Oribatid Mites: Prospects for Their Use in Ecotoxicology. *Experimental and Applied Acarology*, 19:361-379.
- Lenth, R.V. 2007. Statistical Power Calculations. *Journal of Animal Science*, 85(Suppl. E.):E24-E29.
- Li, J., Verweij, R.A., van Gestel, C.A.M. 2018. Lanthanum Toxicity to Five Different Species of Soil Invertebrates in Relation to Availability in Soil. *Chemosphere*, 193:412-420.
- Luxton M. 1981. Studies on the Oribatid Mites of a Danish Beech Wood Soil IV. Developmental Biology. *Pedobiologia*, 21:312-340.
- Maraun, M., Scheu, S. 2000. The Structure of Oribatid Mite Communities (Acari, Oribatida): Patterns, Mechanisms and Implications for Future Research. *Ecography*, 23:374-383.
- [MEA] Ministère de l'Environnement de l'Alberta. 2007. Tier 2 Eco-contact Guideline Derivation Protocol, 13 juillet 2007 (version en ligne). 33 p.
- [MEEO] Ministère de l'Environnement et de l'Énergie de l'Ontario. 1996. Guidance on Sampling and Analytical Methods for Use at Contaminated Sites in Ontario – Section 8.3.7 Inorganics, Version 1.1, ISBN-0-7778-4056-1. Toronto (Ontario) : Imprimeur de la Reine. 158 p.
- Michael, A.D. 1884. *British Oribatidae*. Londres : Adlard and Son pour The Ray Society, p. 409411.
- Michereff-Filho, M., Guedes, R.N.C., Della-Lucia, T.M.C., Michereff, M.F.F., Cruz, I. 2004. Non-Target Impact of Chlorpyrifos on Soil Arthropods Associated with No-Tillage Corn Fields in Brazil. *International Journal of Pest Management*, 50:91-99.
- Minor, M.A., Norton, R.A. 2004. Effects of Soil Amendments on Assemblages of Soil Mites (Acari: Oribatida, Mesostigmata) in Short-Rotation Willow Plantings in Central New York. *Canadian Journal of Forest Research*, 34:1417-1425.
- Newman, M.C. 2008. What Exactly are you Inferring? A Closer Look at Hypothesis Testing. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27:1013-1126.
- [NERI] National Environmental Research Institute. 1993. Manual of SECOFASE: Development, Improvement and Standardization of Test Systems for Assessing Sublethal Effects on Chemicals on Fauna in the Soil Ecosystem, H. Løkke et C.A.M. van Gestel (éd.). Rapport d'un atelier tenu à Silkeborg, au Danemark, du 18 au 19 janvier 1993, 44 p.
- Norberg-King, T.J. 1993. A Linear Interpolation Method for Sublethal Toxicity: the Inhibition Concentration (ICp) Approach (Version 2.0). Rapport 03-93 du National Effluent Toxicity Assessment Center, U.S. Environmental Protection Agency, Environmental Research Laboratory, Duluth (Minnesota). 25 p.
- Norton, R.A. 1985. Aspects of the Biology and Systematics of Soil Arachnids, Particularly Saprophagous and Mycophagous Mites. *Quaestiones Entomologicae*, 21:523-541.
- Norton, R.A. 1994. Evolutionary Aspects of Oribatid Mites Life Histories and Consequences for the Origin of the Astigmata. In: *Mites: Ecological and Evolutionary Analyses of Life-History Patterns*, M.A. Houck (éd.). New York (New York) : Chapman & Hall. p. 99-135.
- Norton, R.A., Bonamo, P.M., Grierson, J.D., Shear, W.A. 1988. Oribatid Mite Fossils from a Terrestrial Devonian Deposit Near Gilboa, New York. *Journal of Paleontology*, 62:259-269.

- OCDE (Organisation de coopération et de développement économiques). 1984A. Essai n° 207 : Ver de Terre, Essais de Toxicité Aiguë. Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 2. Paris (France) : Éditions OCDE. 10 p.
- OCDE. 1984b. Essai n° 208 : Plantes terrestres, Essai de croissance. Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 2. Paris (France) : Éditions OCDE. 6 p.
- OCDE. 2005. Proposal for a New Guideline – Collembola Reproduction Test (*Folsomia fimetaria* and *Folsomia candida*). Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. 24 p.
- OCDE. 2006. Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application, Environment Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, n° 54, Paris (France). 147 p.
- OCDE. 2008. Essai n° 226 : Essai de reproduction d'un acarien prédateur (*Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*) dans le sol. Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 2. Paris (France) : Éditions OCDE.
- OCDE. 2009. Essai n° 232 : Essai de reproduction de collemboles dans le sol. Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Paris (France). 20 p.
- OCDE. 2016. Essai n° 222 : Essai de reproduction chez le ver de terre (*Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*). Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Paris (France). 21 p.
- Osler, G.H.R., Westhorpe, D., Oliver, I. 2001. The Short-Term Effects of Endosulfan Discharges on Eucalypt Floodplain Soil Microarthropods. *Applied Soil Ecology*, 16:263-273.
- Owojori, O.J., Siciliano, S.D. 2012. Accumulation and Toxicity of Metals (Copper, Zinc, Cadmium, and Lead) and Organic Compounds (Geraniol and Benzo[a]pyrene) in the Oribatid Mite *Oppia nitens*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31:1639-1648.
- Parmelee, R.W., Wentsel, R.S., Phillips, C.T., Checkai, R.T., Simini, M. 1993. Soil Microcosm for Testing the Effects of Chemical Pollutants on Soil Fauna Communities and Trophic Structure. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12:1477-1486.
- Princz, J., Jatar, M., Lemieux, H., Scroggins, R. 2018. Perfluorooctane Sulfonate in Surface Soils: Effects on Reproduction in the Collembolan, *Folsomia candida*, and the Oribatid Mite, *Oppia nitens*. *Chemosphere*, 208:757-763.
- Princz, J.I. 2014. Development of a New Test Suite of Ecologically-Relevant Species for the Assessment of Contaminants in Boreal Soils – Special Emphasis on Oribatid Mites. Thèse de doctorat, Université de la Saskatchewan. 140 p.
- Princz, J.I., Behan-Pelletier, V.M., Scroggins, R.P., Siciliano, S.D. 2010. Oribatid Mites in Soil Toxicity Testing – The Use of *Oppia nitens* (C.L. Koch) as a New Test Species. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29:971-979.
- Princz, J.I., Moody, M., Fraser, C., Van der Vliet, L., Lemieux, H., Scroggins, R., Siciliano, S.D. 2012. Evaluation of a New Battery of Toxicity Tests for Boreal Forest Soils: Assessment of the Impact of Hydrocarbons and Salts. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31:766-777.
- Prinzling, A., Kretzler, S., Badejo, A., Beck, L. 2002. Traits of Oribatid Mite Species that Tolerate Habitat Disturbance Due to Pesticide Application. *Soil Biology and Biochemistry*, 34:1655-1661.
- Proctor, H. 1998. Acariformes. The “Mite-Like” Mites. Version du 9 août 1998. [à partir du site Tree of Life Web Project]. Accès : <http://tolweb.org/Acariformes/2563/1998.08.09> (consulté en mai 2016).
- Ritchie, E., Boyd, P., Lawson-Halasz, A., Hawari, J., Saucier, S., Scroggins, R., Princz, J. 2017. The Ecotoxicity of Zinc and Zinc-Containing Substances in Soil with Consideration of Metal-Moiety Approaches and Organometal Complexes. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 36:3324-3332.

- Rocchini, R.J., Clark, M.J.R., Jordan, A.J., Horvath, S., McLeay, D.J., Servizi, J.A., Sholund, A., Singleton, H.J., Watts, R.G., Young, R.H. 1982. Provincial Guidelines and Laboratory Procedures for Measuring Acute Lethal Toxicity of Liquid Effluents to Fish. Ministère de l'Environnement de la Colombie-Britannique, Victoria (Colombie-Britannique). 18 p.
- Römbke, J., Aira, M., Backeljau, T., Breugelmans, K., Domínguez, J., Funke, E., Graf, N., Hajibabaei, M., Pérez-Losada, M., Porto, P.G., Schmelz, R.M., Vierna, J., Vizcaíno, A., Pfenninger, M. 2016. DNA Barcoding of Earthworms (*Eisenia fetida/andrei* Complex) From 28 Ecotoxicological Test Laboratories. *Applied Soil Ecology*, 104:3-11.
- Römbke, J., Jänsch, S., Scroggins, R. 2006. Identification of Potential Organisms of Relevance to Canadian Boreal Forest and Northern Lands for Testing of Contaminated Soils. *Environmental Reviews*, 14:137-167.
- Sager, J.C., McFarlane, J.C. 1997. Radiation. In: *Plant Growth Chamber Handbook*, R.W. Langhans et T.W. Tibbitts (éd.), North Central Regional Research Publication No. 340, Iowa Agriculture and Home Economics Experiment Station Special Report No. 99. Ames (IA) : Iowa State University of Science and Technology, p. 1-30.
- Sengbusch, H.G., Sengbusch, C.H. 1970. Post-Embryonic Development of *Oppia nitens* (Acarina: Oribatei). *Journal of the New York Entomological Society*, 78:207-214.
- Seniczak, A. 2006. The Effect of Density on Life-History Parameters and Morphology of *Archezogetes longisetosus* Aoki, 1965 (Acarina: Oribatida) in Laboratory Conditions. *Biological Letters*, 43:209-213.
- Seniczak, A., Ligocka, A., Seniczak, S., Paluszak, Z. 2009. The Influence of Cadmium on Life-History Parameters and Gut Microflora of *Archezogetes longisetosus* (Acarina: Oribatida) Under Laboratory Conditions. *Experimental and Applied Acarology*, 47:191-200.
- Seniczak, A., Seniczak, S. 2002. The Effect of Cadmium on *Archezogetes longisetosus* (Acarina, Oribatida) in Laboratory Conditions. *European Journal of Soil Biology*, 38: 315-317.
- Seniczak, A., Seniczak, S., Kobierski, M. 2006. Long-Term Effect of Cadmium on the Oribatid Mite *Archezogetes longisetosus* Aoki, 1965 in Laboratory Conditions. *Biological Letters*, 43:237-242.
- Seniczak, S. 1975. Morphology of Juvenile Stages of Some Oppiidae (Acarina, Oribatei) II. *Pedobiologia*, 15:262-275.
- Seniczak, S., Stefaniak, O. 1978. The Microflora of the Alimentary Canal of *Oppia nitens* (Acarina, Oribatei). *Pedobiologia*, 18:110-119.
- Sheppard, S.C., Evenden, W.G. 1998. An Approach to Defining a Control or Diluent Soil for Ecotoxicity Assays. In: *Environmental Toxicology and Risk Assessment*, E.E. Little, B.M. Greenberg et A.J. DeLonay (éd.), 7^e vol, ASTM STP 1333. Philadelphie (Pennsylvanie) : American Society for Testing and Materials, p. 215-226.
- Singh, M., Jain, K.L., Mathur, R.B., Dogra, D. 1996. Laboratory Study of Food Preferences of Some Cryptostigmatic Mites and Their Contribution in Litter Degradation and Mineralization in Soils. *Annals of Biology*, 12:335-343.
- Smit, C.E., Moser, T., Römbke, J. 2012. A New OECD Test Guideline for the Predatory Soil Mite *Hypoaspis aculeifer*: Results of an International Ring Test. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 82:56-62.
- [SPAC] Soil and Plant Analysis Council Inc. 1992. Soil Analysis Handbook of Reference Methods, Soil and Plant Analysis Council Inc., Georgia University Station, Athens (Géorgie), 202 p.

- Stämpfli, C., Becker-van Slooten, K., Campiche, S., Tarradellas, J. 2005. Research in Support of Environment Canada's Toxicity Test Method with *Folsomia fimetaria* for Assessment of Contaminated Soils. Rapport préparé par le Laboratoire de chimie environnementale et écotoxicologie (CECOTOX), École polytechnique fédérale de Lausanne (EPFL), ENAC-ISTE (Lausanne, Suisse), pour Environnement Canada, Ottawa, Ontario.
- Stark, J.D. 1992. Comparison of the Impact of a Neem Seed-Kernel Extract Formulation 'Margosan-O' and Chlorpyrifos on Non-Target Invertebrates Inhabiting Turf Grass. *Pesticide Science*, 36:293-299.
- Stefaniak, O., Seniczak, S. 1981. The Effect of Fungal Diet on the Development of *Oppia nitens* (Acari, Oribatei) on the Microflora of its Alimentary Tract. *Pedobiologia*, 21:202-210.
- Stephenson, G., Feisthauer, N., Bessie, K., Scroggins, R. 2008. Terrestrial Toxicity Testing in Support of Site-specific Risk Assessments: An Integrative Tool for Contaminated Site Management. Compte rendu de l'Atelier national sur les sites contaminés fédéraux tenu à Vancouver, en Colombie-Britannique, du 28 avril au 2 mai 2008. Atelier organisé par l'Institut des biens immobiliers du Canada.
- Stephenson, G.L. 2003. Données inédites. Stantec Consulting Ltd., Guelph, Ontario.
- Stephenson, G.L., Koper, N., Atkinson, G.F., Solomon, K.R., Scroggins, R.P. 2000. Use of Nonlinear Regression Techniques for Describing Concentration-Response Relationships of Plant Species Exposed to Contaminated Site Soils. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19:2968-981.
- Stephenson, G.L., Kuperman, R.G., Linder, G.L., Visser, S. 2002. Toxicity Tests for Assessing Contaminated Soils and Ground Water. In: *Environmental Analysis of Contaminated Sites*, G.I. Sunahara, A.Y. Renoux, C. Thellen, C.L. Gaudet et A. Pilon (éd.), Ecological and Environmental Toxicology Series. Chichester (Royaume-Uni) : John Wiley and Sons Ltd. p. 25-43.
- Sverdrup, L.E., Hagen, S.B., Krogh, P.H., van Gestel, C.A.M. 2007. Benzo[a]pyrene Shows Low Toxicity to Three Species of Terrestrial Plants, Two Soil Invertebrates, and Soil-Nitrifying Bacteria. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 66:362-368.
- Taberly, G. 1987. Recherches sur la parthénogenèse thélytoque de deux espèces d'acariens oribateïdes : *Trypochthonius tectorum* (Berlese) et *Platynothrus peltifer* (Koch). III. Étude anatomique, histologique et cytologique des femelles parthénogénétiques. *Acarologia*, 28:389-403.
- Thursby, G.B., Heltshe, J., Scott, K.J. 1997. Revised Approach to Toxicity Test Acceptability Criteria Using a Statistical Performance Assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16:1322-1329.
- TOXSTAT. 1996. Version 3.5, Lincoln Research Associates, Inc., PO Box 4276, Bisbee, Arizona 85603, États-Unis, 520-432-4092 (tél.), danlra@msn.com (courriel). [Programmes sur disquette, copie papier du manuel de l'utilisateur.]
- [USEPA] United States Environmental Protection Agency. 1989. Protocols for Short Term Toxicity Screening of Hazardous Waste Sites, Corvallis Environ. Research Lab., Corvallis, Oregon, Report EPA/600/3-88/029. 102 p.
- USEPA. 1995. Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to West Coast Marine and Estuarine Organisms, Office of Research and Development. Report EPA/600/R-95/136. Washington (D.C.) : USEPA. 661 p.

- USEPA. 2002. Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Marine and Estuarine Organisms, 4^e éd., Office of Water. Report EPA 821-R-02-014. Washington (D.C.) : USEPA. 464 p.
- USEPA. 2008. Guidance for the Use of Dilution-Water (negative) and Solvent Controls in Statistical Data Analysis for Guideline Aquatic Toxicology Studies, Memo from Statistics Workgroup and Aquatic Biology Technical Team to Donald Brady, Director, Environmental Fate and Effects Division. Office of Pesticides Programs, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention (OCSP), Washington, D.C.
- USEPA. 2010. National Pollutant Discharge Elimination System Test of Significant Toxicity Implementation Document, Office of Wastewater Management, Washington, D.C., Report EPA 833-R-10-003.
- van Dam, R.A., Harford, A.J., Warne, M. St.J. 2012. Time to Get Off the Fence: The Need for Definitive International Guidance on Statistical Analysis of Ecotoxicity Data, Debate and Commentary. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 8:242-245.
- Van der Hoeven, N. 1998. Power Analysis for the NOEC: What is the Probability of Detecting Small Toxic Effects on Three Different Species using the Appropriate Standardized Test Protocols? *Ecotoxicology*, 7:355-361.
- Van der Vliet, L., Taylor, L.N., Scroggins, R. 2012. NOEC: Notable Oversight of Enlightened Canadians: A Response to van Dam *et al.* 2012. [Lettre au rédacteur en chef]. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 8:397-398.
- van Gestel, C.A.M., Doornekamp, A. 1998. Tests on the Oribatid Mite *Platynothrus peltifer*. In: *Handbook of Soil Invertebrate Toxicity Tests*, H. Løkke et C.A.M. van Gestel (éd.). Chichester (Royaume-Uni) : John Wiley & Sons. p. 113-130.
- Walter, D.E. 1985. The Effects of Litter Type and Elevation on Colonization of Mixed Coniferous Litterbags by Oribatid Mites. *Pedobiologia*, 28:383-387.
- Walter, D.E., Gerald, K., Evert, L. 1996. Acari. The Mites. Version du 13 décembre 1996. [à partir du site Tree of Life Web Project]. Accès : <http://tolweb.org/Acari/2554/1996.12.13>. (consulté en mai 2016).
- Webb, N.R. 1989. Observations on the Life Cycle of *Steganacarus magnus* (Acari: Cryptostigmata). *Pedobiologia*, 33:293-299.
- Wiles, J.A., Krogh, P.H. 1998. Tests with the Collembolans *Isotoma viridis*, *Folsomia candida*, and *Folsomia fimetaria*. In: *Handbook of Soil Invertebrate Toxicity Tests*, H. Løkke et C.A.M. van Gestel (éd.). Londres (Royaume-Uni) : John Wiley. p. 131-156.
- Williams, D.A. 1972. The Comparison of Several Dose Levels with a Zero Dose Control. *Biometrics*, 28:519-532.
- Woodring JP, Cook EF. 1962. The Biology of *Ceratozetes cisalpinus* Berlese, *Schelorbitates laevigatus* Koch and *Oppia neerlandica* Oudemans (Oribatei) with Description of All Stages. *Acarologia*, 4:101-137.
- Yu, L., Berry, R.E., Croft, B.A. 1997. Effects of *Bacillus thuringiensis* Toxins in Transgenic Cotton and Potato on *Folsomia candida* (Collembola: Isotomidae) and *Oppia nitens* (Acari: Oribatidae). *Journal of Economic Entomology*, 90:113-118.
- Zajdlik and Associates Inc. 2010. Statistical Guidance for Ecotoxicological Data Derived Using Environment Canada Standardized Biological Test Methods. Rapport inédit préparé par Zajdlik and Associates Inc. (Rockwood, Ontario) pour Environnement Canada (Ottawa, Ontario). 136 p.

Annexe A

Méthodes d'essai biologique et documents d'orientation publiés par l'Unité de l'élaboration et de l'application des méthodes d'Environnement et Changement climatique Canada^a

Titre de la méthode d'essai ou du document d'orientation	Numéro du rapport	Date de publication	Modifications applicables
A. Méthodes d'essai biologique universelles			
Essai de létalité aiguë sur la truite arc-en-ciel	SPE 1/RM/9	Juillet 1990	Mai 1996 et mai 2007
Essai de létalité aiguë sur l'épinoche à trois épines (<i>Gasterosteus aculeatus</i>)	SPE 1/RM/10	Juillet 1990	Mars 2000
Essai de létalité aiguë sur <i>Daphnia</i> spp.	SPE 1/RM/11	Juillet 1990	Mai 1996
Essai de reproduction et de survie du cladocère <i>Ceriodaphnia dubia</i>	SPE 1/RM/21 2 ^e édition	Février 2007	–
Essai de croissance et de survie sur des larves de tête-de-boule	SPE 1/RM/22 2 ^e édition	Février 2011	–
Essai de toxicité sur la bactérie luminescente (<i>Photobacterium phosphoreum</i>)	SPE 1/RM/24	Novembre 1992	–
Essai d'inhibition de la croissance d'une algue d'eau douce	SPE 1/RM/25 2 ^e édition	Mars 2007	–
Essai de toxicité aiguë de sédiments chez des amphipodes marins ou estuariens	SPE 1/RM/26	Décembre 1992	Octobre 1998
Essai sur la fécondation chez les échinides (oursins globuleux et oursins plats)	SPE 1/RM/27 2 ^e édition	Février 2011	–
Essai de toxicité sur des salmonidés aux premiers stades de leur cycle biologique (truite arc-en-ciel)	SPE 1/RM/28 2 ^e édition	Juillet 1998	–
Essai de survie et de croissance des larves dulcicoles de chironomes (<i>Chironomus tentans</i> ou <i>Chironomus riparius</i>) dans les sédiments	SPE 1/RM/32	Décembre 1997	–

^a Ces documents sont vendus à l'adresse suivante : Catalogue des publications d'Environnement et Changement climatique Canada, Ottawa (Ontario) K1A 0H3, Canada. Pour en commander des copies papier, prière d'envoyer un courriel à ec.enviroinfo.ec@canada.ca. Il est également possible de les télécharger gratuitement en format PDF à partir de l'adresse suivante : <https://www.canada.ca/fr/environnement-changement-climatique/services/recherche-faune-science-paysage/publications-methodes-essai-biologique.html>. Pour obtenir de plus amples renseignements ou pour formuler des commentaires, prière de communiquer avec le chef de la Section de l'évaluation biologique et normalisation, Environnement et Changement climatique Canada, Ottawa (Ontario) K1A 0H3, Canada.

Titre de la méthode d'essai ou du document d'orientation	Numéro du rapport	Date de publication	Modifications applicables
A. Méthodes d'essai biologique universelles (suite)			
Essai de survie et de croissance de l'amphipode dulcicole <i>Hyalella azteca</i> dans les sédiments	SPE 1/RM/33 3 ^e édition	Septembre 2017	–
Essai de mesure de l'inhibition de la croissance de la plante macroscopique dulcicole <i>Lemna minor</i>	SPE 1/RM/37 2 ^e édition	Janvier 2007	–
Essai de survie et de croissance des vers polychètes spionides (<i>Polydora cornuta</i>) dans les sédiments	SPE 1/RM/41	Décembre 2001	–
Essais pour déterminer la toxicité de sols contaminés pour les vers de terre (<i>Eisenia andrei</i> , <i>Eisenia fetida</i> ou <i>Lumbricus terrestris</i>)	SPE 1/RM/43	Juin 2004	Juin 2007
Essai de mesure de la levée et de la croissance de plantes terrestres exposées à des contaminants dans le sol	SPE 1/RM/45	Février 2005	Juin 2007
Essai de mesure de la survie et de la reproduction de collemboles exposés à des contaminants dans le sol	SPE 1/RM/47 2 ^e édition	Février 2014	–
Essai de croissance de plantes terrestres indigènes de la région boréale exposées à un sol contaminé	SPE 1/RM/56	Août 2013	–
B. Méthodes de référence^b			
Méthode de référence pour la détermination de la létalité aiguë à l'aide de l'épinoche à trois épines	SPE 1/RM/10 2 ^e édition	Décembre 2017	–
Méthode de référence pour la détermination de la létalité aiguë d'effluents chez la truite arc-en-ciel	SPE 1/RM/13 2 ^e édition	Décembre 2000	Mai 2007 et février 2016
Méthode de référence pour la détermination de la létalité aiguë d'effluents chez <i>Daphnia magna</i>	SPE 1/RM/14 2 ^e édition	Décembre 2000	Février 2016
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 un essai en phase solide	SPE 1/RM/42	Avril 2002	–
Méthode de référence pour mesurer la toxicité des sédiments contaminés chez les embryons et les larves des échinides (oursins globuleux ou oursins plats)	SPE 1/RM/58	Juillet 2014	–
Méthode de référence pour la détermination de la létalité aiguë chez le copépode <i>Acartia tonsa</i>	DGST 1/RM/60	Juin 2019	–

^b Dans le présent contexte, on définit une méthode de référence comme étant une méthode d'essai biologique spécifique en vue de la réalisation d'un essai de toxicité, respectant une série de conditions expérimentales et de modes opératoires décrits avec précision dans un document écrit. Contrairement à d'autres méthodes d'essai biologique génériques (polyvalentes ou « universelles ») publiées par Environnement et Changement climatique Canada, les méthodes de référence sont souvent réservées aux essais associés à des règlements particuliers.

Titre de la méthode d'essai ou du document d'orientation	Numéro du rapport	Date de publication	Modifications applicables
C. Documents d'orientation			
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 physicochimique et d'essais biologiques	SPE 1/RM/29	Décembre 1994	–
Document d'orientation sur la mesure de la précision des essais de toxicité sur sédiment de contrôle dopé 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 2 ^e édition	Décembre 2016	–
Document d'orientation sur les méthodes statistiques applicables aux essais d'écotoxicité	SPE 1/RM/46	Mars 2005	Juin 2007
Procédure de stabilisation du pH pendant un essai de létalité aiguë d'un effluent d'eau usée chez la truite arc-en-ciel	SPE 1/RM/50	Mars 2008	–
Renseignements de base et conseils supplémentaires pour l'étude de la létalité aiguë d'un effluent d'eau usée pour la truite arc-en-ciel	–	Mars 2008	–
Guide d'échantillonnage et de préparation de sol contaminé aux fins d'essais biologiques	SPE 1/RM/53	Février 2012	–
Procédure de stabilisation du pH pendant un essai de létalité aiguë des effluents des fabriques de pâtes et papiers chez la truite arc-en-ciel	DGST 1/RM/59	Mars 2018	–
Conseils supplémentaires pour l'étude de la létalité aiguë des effluents des fabriques de pâtes et papiers due à l'ammoniac	–	Mars 2018	–

Annexe B

Environnement et Changement climatique Canada, laboratoires d'essai environnemental régionaux

Laboratoire des essais environnementaux de l'Atlantique

Immeuble des sciences de l'environnement
443, avenue Université, Université de Moncton
Moncton (Nouveau-Brunswick)
E1A 3E9

Laboratoire des essais environnementaux du Pacifique et du Yukon

Centre des sciences environnementales du Pacifique
2645, route Dollarton Hwy
North Vancouver (Colombie-Britannique)
V7H 1B1

Laboratoire des essais environnementaux du Québec

105, rue McGill
Montréal (Québec)
H2Y 2E7

Laboratoire des essais environnementaux des Prairies et du Nord

Northern Forestry Building
5320, 122 St NW
Edmonton (Alberta)
T6H 3S5

Pour obtenir les coordonnées actuelles des personnes-ressources du laboratoire régional, veuillez communiquer avec :

Unité de l'élaboration et de l'application des méthodes
Direction générale des sciences et de la technologie
Environnement et Changement climatique Canada
335, chemin River
Ottawa (Ontario)
K1A 0H3
Courriel : ec.methodes-methods.ec@canada.ca

Annexe C

Membres du Groupe intergouvernemental sur les essais écotoxicologiques (en juin 2019)

Gouvernement fédéral, Environnement et Changement climatique Canada

Suzanne Agius
Section des programmes de protection marine
Gatineau (Québec)

Adrienne Bartlett
Division de la recherche sur la protection des
écosystèmes aquatiques
Burlington (Ontario)

Lee Beaudette
Section de l'évaluation biologique et normalisation
Ottawa (Ontario)

Rene Beaulieu
Laboratoire des essais environnementaux des
Prairies et du Nord
Edmonton (Alberta)

Christian Blaise (émérite)
Centre St. Laurent
Montréal (Québec)

Patrick Boyd
Section de l'évaluation biologique et normalisation
Ottawa (Ontario)

Lorraine Brown
Laboratoire des essais environnementaux du
Pacifique et du Yukon
North Vancouver (Colombie-Britannique)

Joy Bruno
Laboratoire des essais environnementaux du
Pacifique et du Yukon
North Vancouver (Colombie-Britannique)

Julia Brydon
Section des programmes de protection marine
Gatineau (Québec)

Craig Buday
Laboratoire des essais environnementaux du
Pacifique et du Yukon
North Vancouver (Colombie-Britannique)

Melanie Camplin
Laboratoire des essais environnementaux des
Prairies et du Nord
Edmonton (Alberta)

Marshneil Chandra
Laboratoire des essais environnementaux des
Prairies et du Nord
Edmonton (Alberta)

Ajith Dias Samarajeewa
Section de l'évaluation biologique et normalisation
Ottawa (Ontario)

Heather Dillon
Laboratoire des essais environnementaux des
Prairies et du Nord
Edmonton (Alberta)

Ken Doe (chercheur émérite)
Laboratoire des essais environnementaux de
l'Atlantique
Moncton (Nouveau-Brunswick)

Tamzin El-Fityani
Bureau national des recommandations et des
normes
Ottawa (Ontario)

François Gagné
Recherche sur les écosystèmes fluviaux
Montréal (Québec)

Patricia Gillis
Division de la recherche sur la protection des
écosystèmes aquatiques
Burlington (Ontario)

Christina Heise
Laboratoire des essais environnementaux des
Prairies et du Nord
Edmonton (Alberta)

Natasha Hostal
Laboratoire des essais environnementaux des
Prairies et du Nord
Edmonton (Alberta)

Paula Jackman
Laboratoire des essais environnementaux de
l'Atlantique
Moncton (Nouveau-Brunswick)

Stephanie Kvas
Section de l'évaluation biologique et normalisation
Ottawa (Ontario)

Christopher Le
Laboratoire des essais environnementaux du
Pacifique et du Yukon
North Vancouver (Colombie-Britannique)

Heather Lemieux
Section de l'évaluation biologique et normalisation
Ottawa (Ontario)

Michelle Linssen-Sauvé
Laboratoire des essais environnementaux du
Pacifique et du Yukon
North Vancouver (Colombie-Britannique)

Matthew Meier
Section de l'évaluation biologique et normalisation
Ottawa (Ontario)

Danielle Milani
Division de la recherche sur les conséquences pour
les écosystèmes aquatiques
Burlington (Ontario)

Rachel Miliano
Laboratoire des essais environnementaux du
Pacifique et du Yukon
North Vancouver (Colombie-Britannique)

Joanne Parrott
Division de la recherche sur la protection des
écosystèmes aquatiques
Burlington (Ontario)

Linda Porebski
Section des programmes de protection marine
Gatineau (Québec)

Juliska Princz
Section de l'évaluation biologique et normalisation
Ottawa (Ontario)

Rick Scroggins
Section de l'évaluation biologique et normalisation
Ottawa (Ontario)

David Taillefer
Protection du milieu marin
Gatineau (Québec)

Sylvain Trottier
Laboratoire des essais environnementaux du
Québec
Montréal (Québec)

Graham van Aggelen
Laboratoire des essais environnementaux du
Pacifique et du Yukon
North Vancouver (Colombie-Britannique)

Leana Van der Vliet
Section de l'évaluation biologique et normalisation
Ottawa (Ontario)

Brian Walker
Laboratoire des essais environnementaux du
Québec
Montréal (Québec)

Peter Wells (chercheur émérite)
Service de la conservation de l'environnement
Dartmouth (Nouvelle-Écosse)

Gouvernement fédéral, Ressources naturelles Canada

Philippa Huntsman-Mapila
Programme Gestion du risque lié aux écosystèmes
Laboratoire des mines et des sciences minérales
CANMET, RNCan
Ottawa (Ontario)

Morgan King
Programme Gestion du risque lié aux écosystèmes
Laboratoire des mines et des sciences minérales
CANMET, RNCAN
Ottawa (Ontario)

Carrie Rickwood
Programme Gestion du risque lié aux écosystèmes
Laboratoire des mines et des sciences minérales
CANMET, RNCAN
Ottawa (Ontario)

Gouvernement provincial

Lisa Kennedy (co-présidente)
Ministère de l'Environnement, de la Protection de
la nature et des Parcs de l'Ontario
Etobicoke (Ontario)

Jennifer Koene-Fenton
Ministère de l'Environnement, de la Protection de
la nature et des Parcs de l'Ontario
Etobicoke (Ontario)

Heather Osachoff
Ministère de l'Environnement de la Colombie-
Britannique
Victoria (Colombie-Britannique)

David Poirier (chercheur émérite)
Ministère de l'Environnement, de la Protection de
la nature et des Parcs de l'Ontario
Etobicoke (Ontario)

Éloïse Veilleux
Centre d'expertise en analyse environnementale du
Québec
Ste-Foy (Québec)

Trudy Watson-Leung (co-présidente)
Ministère de l'Environnement, de la Protection de
la nature et des Parcs de l'Ontario
Etobicoke (Ontario)

Annexe D

Sols témoins négatifs artificiels et naturels utilisés pour la mise au point de la méthode et l'établissement des critères de validité des essais

Dans tout essai de toxicité d'un sol, les traitements expérimentaux doivent comprendre un sol témoin négatif. Ce sol doit être essentiellement exempt de tout contaminant susceptible de nuire à la performance des organismes expérimentaux pendant l'essai (v. 3.3). Avant de proposer la méthode d'essai décrite dans le présent document comme méthode normalisée recommandée par Environnement et Changement climatique Canada, il a fallu commencer par évaluer la performance d'organismes expérimentaux dans différents types de sols témoins négatifs représentatifs d'un éventail de sols non contaminés du Canada. Quatorze types de sol témoin négatif ont été employés pour mettre au point la première édition de la méthode d'essai biologique décrite ici et pour évaluer ensuite sa robustesse à l'aide d'échantillons de sol dont les caractéristiques physicochimiques étaient très variables (EC, 2010, 2013b, 2014b; Hennessy, 2010; Princz et coll., 2010, 2012, 2018; Princz, 2014; Ritchie et coll., 2017; ECCC, 2018, 2019). De ce nombre, on s'est également servi de 11 sols pour établir, d'après la performance des organismes dans le sol témoin, des critères raisonnables de validité des essais (ECCC, 2018). Les 11 sols mis à l'essai comprennent deux sols artificiels, quatre sols agronomiques naturels et cinq sols naturels provenant des écozones de la forêt boréale et de la taïga. Les caractéristiques physicochimiques des deux sols artificiels et des quatre sols agronomiques naturels sont résumées au tableau D-1 de la présente annexe, tandis que les cinq sols naturels de la forêt boréale et de la taïga sont caractérisés au tableau D-2.

Un des sols témoins artificiels employés dans la série d'études sur la performance des organismes expérimentaux en regard de divers types de sol était le même que celui préparé en laboratoire et recommandé dans la présente méthode (v. 3.3.2). Il était composé de tourbe *Sphagnum* sp. (10 %), de kaolin (20 %), de sable siliceux (70 %) et de CaCO₃ (10-30 g par kilogramme de tourbe). Pour préparer le sol, on a combiné soigneusement les ingrédients secs, ajouté graduellement de l'eau désionisée et mélangé de nouveau le tout jusqu'à obtention d'un sol de couleur, de texture et de teneur en humidité visiblement uniformes. Ce sol artificiel est très semblable à celui décrit dans ISO (1999) et dans OCDE (2005). Le deuxième sol artificiel est un sol sableux enrichi qui a été prélevé en 2013 chez Greely Sand and Gravel à Ottawa, en Ontario. Le sol est composé d'un mélange de compost de résidus de jardinage de la ville d'Ottawa et de sable rouge selon un rapport 80:20. Une fois recueilli, le sol a été séché, tamisé (maille de 2 mm) et homogénéisé. Une certaine condensation avait été observée à l'intérieur de certains des seaux entreposés ainsi qu'une odeur occasionnelle de moisissure, une situation courante dans une matrice composée de grandes quantités de feuilles mortes en décomposition. On a tenté de procéder à une aération et à une réhomogénéisation comme moyen d'interrompre la croissance d'organismes microbiens indésirables et d'éliminer la condensation. Les caractéristiques physicochimiques des deux sols artificiels sont présentées au tableau D-1.

Les quatre sols agronomiques employés comme sols témoins négatifs pour la mise au point de la présente méthode d'essai biologique et l'établissement des critères de validité de l'essai (v. 4.4) ne représentaient pas tous les types de sol canadiens. Cependant, en plus de posséder des caractéristiques physicochimiques très variables, ils comprenaient des sols agricoles de diverses textures. Ils provenaient de régions qui n'avaient pas fait l'objet d'un épandage direct de pesticides au cours des dernières années. Trois de ces sols ont été prélevés au Canada avec une pelle ou avec une rétrocaveuse, selon l'emplacement et la quantité de sol prélevée. La profondeur d'échantillonnage dépendait de la nature du sol et du site lui-même. LUFA Speyer (Allemagne) a fourni le quatrième sol (LUFA 2.2).

Deux des quatre sols agronomiques étaient des sols sablo-loameux. Le premier échantillon de sol sablo-loameux (loam sableux 1), classé comme un tchernoziome d'orthite brun foncé, a été prélevé en août 2014 dans une réserve de route non aménagée au sud-est de Vulcan, en Alberta. Le sol recueilli sous la couche superficielle a été prélevé à une profondeur d'environ 30 cm et placé dans des seaux de plastique de 20 L après l'enlèvement des grosses roches et des agrégats. Le sol a ensuite été expédié à Environnement et Changement climatique Canada (Ottawa, Ontario) où il a été conservé entre ~10 °C et 25 °C jusqu'à son emploi. Le deuxième échantillon de sol sablo-loameux (loam sableux 2) a été prélevé à Saint-Zotique, au Québec, en collaboration avec l'Université McGill; il est probablement caractérisé comme un gleysol. Le sol a été recueilli à une profondeur de 20-30 cm, séché à l'air, tamisé (mailles de 4 mm) et entreposé entre ~10 °C et 25 °C jusqu'à son emploi. Les caractéristiques physicochimiques des sols sont présentées au tableau D-1.

Le troisième sol agronomique était un échantillon de sol de limon argileux. Il a été recueilli en 2014 dans un champ agricole en jachère à Winchester, en Ontario; le champ était en jachère depuis au moins deux ans, mais avait été labouré avant la collecte. Le sol labouré a été recueilli dans des seaux de 20 L et expédié à Environnement et Changement climatique Canada (Ottawa, Ontario). En raison de sa composition riche en argile, des grumeaux de terre séchés à l'air ont été passés dans un broyeur de sol afin de faciliter le traitement. Par la suite, le sol a été tamisé (mailles de 4 mm) et entreposé entre ~10 °C et 25 °C jusqu'à son emploi. Les caractéristiques physicochimiques du sol sont présentées au tableau D-1.

Le quatrième sol agronomique était un sable limoneux (LUFA 2.2) de Hanhofen, dans l'État de Rheinland-Pflaz, en Allemagne (acheté par l'intermédiaire de LUFA Speyer, Allemagne). Le sol n'a pas fait l'objet d'épandage de pesticides, d'engrais biocides ou de fumier organique pendant ≥ 5 ans avant la collecte. Le sol a été échantillonné à une profondeur de 0 à 20 cm, et tamisé à l'aide d'un tamis à mailles de 2 mm. Le lot de sol spécifique a été acheté en 2017 et expédié à Environnement et Changement climatique Canada (Ottawa, Ontario), où il a été entreposé à ~23 °C jusqu'à son emploi. Les caractéristiques physicochimiques du sol sont présentées au tableau D-1.

Tableau D-1 : Caractéristiques physicochimiques des sols envisagés pour être employés comme sols témoins négatifs artificiels et naturels¹

Paramètre	Sol artificiel	Sol sableux – Artificiel	Loam sableux 1	Loam sableux 2	Loam argileux	LUFA	Méthode analytique
Source	préparé à partir de constituants	compost/sable rouge (80:20)	prélevé sur le terrain en Alberta	prélevé sur le terrain au Québec	prélevé sur le terrain en Ontario	sol standard d'Europe	–
Texture du sol	loam sableux fin	sol sableux	loam sableux	loam sableux	loam argileux	sable loameux	selon Hausenbuiller (1985); fondée sur la granulométrie
Sable (%)	77,3	90	77,0	60,5	39,8	77	granulométrie par gravimétrie
Limon (%)	7,8	4	12,0	25,5	28,3	17	granulométrie par gravimétrie
Argile (%)	14,9	6	11,0	14,0	31,9	5,9	granulométrie par gravimétrie
CRE (%)	71,5	65	46,3	61,9	76,8	47,9	analyse gravimétrique ³
pH (unités)	6	8,2	6,1	6,7	6,8	5,0	méthode du CaCl ₂ à 0,01 M
Carbone total (%)	4,5	– ²	1,5	–	–		méthode du four Leco
Carbone organique (%)	–	5,0	–	3,9	–	16000 (mg/kg)	méthode du four Leco
Matière organique (%)	9	8,4	2,6	4,4	15,2	4	oxydation au dichromate
CEC (Cmol+/kg)	19	30	11	14	34	< 10	méthode du chlorure de baryum
Azote total (%)	0,05	0,32	0,13	0,25	–	–	méthode de Kjeldahl
NH ₄ -N (mg/kg)	–	< 1	< 1	< 1 ⁴	–	–	méthode de Kjeldahl
NO ₃ -N (mg/kg)	–	30	< 1	3	–	78	méthode de Kjeldahl
NO ₂ -N (mg/kg)	–	< 1,0	< 1,0	< 1,0	–	–	méthode de Kjeldahl
Phosphore (mg/kg)	23	59	17	89	18	270	digestion par l'acide nitrique/perchlorique

Paramètre	Sol artificiel	Sol sableux – Artificiel	Loam sableux 1	Loam sableux 2	Loam argileux	LUFA	Méthode analytique
Potassium (mg/kg)	22	1693	395	310	140	360	extraction à l'acétate d'ammonium, analyse colorimétrique
Magnésium (mg/kg)	149	567	205	220	707	560	extraction à l'acétate d'ammonium, analyse colorimétrique
Calcium (mg/kg)	1848	4133	1300	2300	5467	1600	extraction à l'acétate d'ammonium, analyse colorimétrique
Sodium (mg/kg)	67	93	40	30	67	–	extraction à l'acétate d'ammonium, analyse colorimétrique

¹ Caractéristiques du sol témoin artificiel et des divers sols témoins négatifs utilisés pour mettre au point la méthode d'essai biologique définitive et les critères connexes à la validité des essais décrits ici (EC, 2010, 2013b, 2014b; Hennessy, 2010; Princz et coll., 2010, 2012, 2018; Princz, 2014; Ritchie et coll., 2017; ECCC, 2018, 2019).

² Non déterminé.

³ Déterminé selon USEPA (1989) à l'aide d'un papier filtre crêpé Fisherbrand^{MC} de porosité grossière P8 (v. 5.3).

⁴ NH₃-N (mg/kg).

Cinq types de sols témoins négatifs provenant des écozones boréales du Canada ont également été employés pour mettre au point la présente méthode d'essai biologique et pour évaluer ensuite sa robustesse à l'aide d'échantillons de sol dont les caractéristiques physicochimiques étaient très variables. On s'est également servi de ces sols pour établir, d'après la performance des acariens dans le sol témoin, des critères raisonnables de validité des essais. Les cinq sols naturels de la forêt boréale provenaient de Terre-Neuve (un), de l'Ontario (un), de la Saskatchewan (deux) et de l'Alberta (un). Les caractéristiques physicochimiques du sol artificiel préparé en laboratoire et des cinq sols forestiers (y compris les horizons pédologiques) sont résumées au tableau D-2.

Les cinq sols naturels employés comme sols témoins négatifs pour la mise au point de la présente méthode et l'établissement des critères de validité des essais (v. 4.4) ne représentaient pas tous les types de sols canadiens. Cependant, en plus de posséder des caractéristiques physicochimiques très variables, ils comprenaient des sols des écozones de la forêt boréale aux textures diversifiées (v. tableau D-2). Ils provenaient de régions qui n'avaient pas fait l'objet d'un épandage direct de pesticides au cours des dernières années. Les échantillons de *sol en vrac* ont été prélevés par horizon dans toute la mesure du possible. La profondeur d'échantillonnage dépendait de la nature du sol et du site lui-même. Après prélèvement, tous les échantillons de sol ont été séchés à l'air, tamisés (mailles de 4-8 mm), homogénéisés et entreposés à la température ambiante (23 °C) jusqu'à leur emploi.

Le sol provenant de Terre-Neuve (podzol NL) a été classé comme étant un podzol humo-ferrique gleyifié, formé sur un till glaciaire non calcaire pierreux, de loameux à sableux (EcoDynamics Consulting Ltd., 2011b). Les sapins baumiers (*Abies balsamea*) et des épinettes noires (*Picea mariana*) dispersées dominaient le couvert forestier du site. Le sous-étage était formé de kalmias à feuilles étroites (*Kalmia angustifolia*), de gaulthéries hispides (*Gaultheria hispidula*), d'arbres en régénération et de cornouillers du Canada (*Cornus canadensis*); on y trouvait aussi, en moins grands nombres, des dryoptères spinuleuses (*Dryopteris spinulosa*), des osmondes cannelle (*Osmunda cinnamomea*), des maïanthèmes du Canada (*Maianthemum canadense*) et des clintonies boréales (*Clintonia borealis*). La surface du sol était couverte principalement de mousses hypnacées [p. ex., hypne de Schreber (*Pleurozium schreberi*), hypne éclatante (*Hyloconium splendens*), hypne plumeuse (*Ptilium crista-castrensis*)]. Avant l'échantillonnage, on a enlevé les débris ligneux et la couche de feuilles mortes. Les échantillons des horizons organiques sous-jacents F et H ont été prélevés ensemble, puis on a échantillonné séparément les horizons Ahe (à une profondeur de 3 cm), Ae (à une profondeur de 25 cm) et Bf. Les quatre horizons ont été utilisés dans l'établissement des critères de validité des essais pour la présente méthode.

Le sol provenant de l'Ontario (podzol ON) a été classé comme étant un podzol humo-ferrique gleyifié, formé à même un dépôt fluvio-lacustre non calcaire (EcoDynamics Consulting Ltd., 2011a). Le site portait une forêt mixte à prédominance de conifères. La strate supérieure du couvert forestier englobait principalement des pins rouges (*Pinus resinosa*) et des pins blancs (*Pinus strobus*) entremêlés d'érables à sucre (*Acer saccharum*) épars; la strate inférieure était composée d'un mélange de bouleaux à papier (*Betula papyrifera*), de thuyas occidentaux (*Thuja occidentalis*), d'épinettes noires (*Picea mariana*), d'épinettes blanches (*Picea glauca*), d'érables rouges (*Acer rubrum*) et de pruches du Canada (*Tsuga canadensis*). Des espèces en régénération dominaient le sous-étage constitué d'aulnes rugueux (*Alnus incana*), de noisetiers à bec (*Corylus cornuta*), de dircas des marais (*Dirca palustris*), de viornes cassinoïdes (*Viburnum cassinoides*), d'airelles fausses-myrtilles (*Vaccinium myrtilloides*) et de linnées boréales (*Linnaea borealis*). Sur la surface du sol, on trouvait surtout des quatre-temps (*Cornus canadensis*) et des coptides du Groenland (*Coptis trifolia*). Trois horizons ont été échantillonnés après l'enlèvement de la litière forestière : Ahe (à une profondeur de 2 cm), Ae (à une profondeur de 7 cm) et Bf (à une profondeur de 20 cm). Seul l'horizon Ahe a été utilisé dans l'établissement des critères de validité des essais pour la présente méthode.

Le sol de l'Alberta (gleysol AB01) a été prélevé dans une tourbière. Il s'agissait d'un gleysol humique régosolique (phase tourbeuse) à drainage pauvre, dont la texture variait du loam au loam argileux près de la surface, et qui devenait riche en argile avec la profondeur (EcoDynamics Consulting Ltd., 2007). L'épinette noire (*Picea mariana*) constituait l'espèce dominante, tandis que les mousses *Sphagnum* spp. et *Polytrichum* spp. dominaient le sous-étage. Deux horizons ont été échantillonnés : un mélange des horizons Of/Oh et l'horizon Ahg (à une profondeur de 17 cm); toutefois, seule la couche Of/Oh a été utilisée pour établir les critères de validité des essais pour la présente méthode.

Deux types de sols ont été échantillonnés en Saskatchewan. Le premier (luvisol SK01) a été classé comme étant un luvisol gris foncé modérément à bien drainé, formé sur des matériaux glaciolacustres exempts de roches, de loameux à argileux (EcoDynamics Consulting Ltd., 2007). Le couvert forestier comportait un mélange d'épinettes blanches (*Picea glauca*) et de peupliers faux-trembles (*Populus tremuloides*), un sous-étage constitué de drageons de peupliers, de même que de rosiers (*Rosa* spp.), de saules (*Salix* spp.), de quatre-temps (*Cornus canadensis*) et de linnées boréales (*Linnaea borealis*). Trois horizons ont été échantillonnés : couches LFH (à une profondeur de 10 cm), Ahe (à une profondeur de 10 cm) et Bt (à une profondeur de 19 cm), mais seul l'horizon LFH a été utilisé pour établir les critères de validité des essais pour la présente méthode.

Le deuxième sol provenant de la Saskatchewan (brunisol SK02) a été classé comme étant un brunisol eutrique orthique à drainage rapide, formé sur des matériaux glaciolacustres sableux exempts de roches (EcoDynamics Consulting Ltd., 2007). Le couvert forestier était composé de peuplements purs de pins gris (*Pinus banksiana*), tandis que des peupliers faux-trembles (*Populus tremuloides*), des aulnes crispés (*Alnus crispa*), des raisins d'ours (*Arctostaphylos uva-ursi*) et des cladonies (*Cladina* spp.) dominaient le sous-étage. Après l'enlèvement de la couche de feuilles mortes, les couches FH ont été échantillonnées à une profondeur de ~6 cm; les horizons Ah et Bm ont été échantillonnés ensemble (à une profondeur de 25-30 cm), étant donné que l'horizon Ah était discontinu et mince (2 cm). Les deux horizons ont été utilisés dans l'établissement des critères de validité des essais pour la présente méthode.

Tableau D-2 Caractéristiques physicochimiques du sol artificiel et des sols et horizons pédologiques naturels de la forêt boréale envisagés comme sols témoins négatifs¹

		Type de sol :	Sol artificiel	Podzol NFLD01			
		Source :	Préparé en laboratoire	Terre-Neuve			
		Classification :	s.o.	Podzol humo-ferrique gleyifié			
		Horizon :	s.o.	LFH	Ahe	Ae	Bf
Paramètre	Unités	Méthode analytique					
Texture du sol ²		s.o. ³	LS	- ⁴	-	-	-
Sable	%	Granulométrie (bougie filtrante)	76	64	73	48	72
Limon	%		12	< 1	16	44	20
Argile	%		12	36	11	8	8
Capacité de rétention d'eau	%	EC (2005a)	79,0	275,0	108,5	48,2	41,9
Teneur optimale en humidité	%		62,5	92,5	70,0	50,0	55,0
pH	Unités	Méthode du ratio sol/eau de 1:1	7,4	3,9	3,6	3,7	4,2
Conductivité	mS/cm	Méthode de la pâte saturée	-	-	-	-	-
Carbone organique	%	Méthode du four Leco	5,5	-	-	-	-
Matière organique	%	Perte au feu	4,6	82,6	26,7	2,9	4,6
Capacité d'échange cationique	Cmol ⁺ /kg	Méthode du chlorure de baryum	11	32	33	21	
Azote total	%	Méthode de Kjeldahl	0,07	-	-	-	-
NH ₃	mg/kg	Extraction au KCl 2N	3	744	278	14	15
NO ₃ -N	mg/kg		5	< 10	< 10	< 10	< 10
NO ₂ -N	mg/kg		< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0
Phosphore (total)	%		0,03	0,08	0,04	0,04	0,04
Phosphore	mg/kg	Extraction au NaHCO ₃	9	20	17	8	4
Potassium	mg/kg	Extraction à l'acétate d'ammonium, analyse colorimétrique	11	160	90	20	20
Magnésium	mg/kg		77	110	90	20	20
Calcium	mg/kg		2000	400	300	100	< 100
Sodium	mg/kg		44	20	20	10	10
Rapport C/N			34	-	-	-	-
Rapport d'adsorption du sodium		Méthode de la pâte saturée	0,3	-	-	-	-

Type de sol :			Podzol ON			Gleysol AB01	
Source :			Ontario			Alberta	
Classification :			Podzol humo-ferrique gleyifié			Gleysol humique régosolique	
Horizon :			A	Ae	B	Of/Oh	Ahg
Paramètre	Unités	Méthode analytique					
Texture du sol ²		s.o. ³	SL	SL	SL	Tourbe	LS
Sable	%	Granulométrie (bougie filtrante)	82	88	86	s.o.	59
Limon	%		12	6	6		33
Argile	%		6	6	8		8
Capacité de rétention d'eau	%	EC (2005a)	41,0	181,9	40,9	248,1	73,9
Teneur optimale en humidité	%		65,0	52,5	47,5	100,0	70,0
pH	Unités	Méthode du ratio sol/eau de 1:1	4,6	4,6	5,8	3,9	4,3
Conductivité	mS/cm	Méthode de la pâte saturée	-	-	-	0,38	0,1
Carbone organique	%	Méthode du four Leco	32,1	1,6	1,0	34,6	11,3
Matière organique	%	Perte au feu	58,1	2,1	2,2	67,8	21,5
Capacité d'échange cationique	Cmol ⁺ /kg	Méthode du chlorure de baryum	26	9	12	27	39
Azote total	%	Méthode de Kjeldahl	0,96	0,06	0,05	2	0,63
NH ₃	mg/kg	Extraction au KCl 2N	128	4	2	114	9
NO ₃ -N	mg/kg		< 1	< 1	< 1	3	9
NO ₂ -N	mg/kg		< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
Phosphore (total)	%		-	-	-	-	-
Phosphore	mg/kg	Extraction au NaHCO ₃	16	2	< 2	28	33
Potassium	mg/kg	Extraction à l'acétate d'ammonium, analyse colorimétrique	143	23	16	53	81
Magnésium	mg/kg		151	31	40	66	108
Calcium	mg/kg		765	184	191	462	570
Sodium	mg/kg		57	35	21	57	28
Rapport C/N			33,4	26	20,6	17,3	-
Rapport d'adsorption du sodium		Méthode de la pâte saturée	2,0	2,8	2,4	0,9	1,3

Type de sol :			Luvisol SK01			Brunisol SK02	
Source :			Saskatchewan			Saskatchewan	
Classification :			Luvisol gris foncé			Brunisol eutriqué orthique	
Horizon :			LFH	Ahe	Bt	FH	AB
Paramètre	Unités	Méthode analytique					
Texture du sol ²		s.o. ³	LS	L	L	LS	SL
Sable	%	Granulométrie (bougie filtrante)	68	37	35	89	82
Limon	%		22	53	55	7	12
Argile	%		10	10	10	6	4
Capacité de rétention d'eau	%	EC (2005a)	287,7	68,6	42,1	174,1	39,5
Teneur optimale en humidité	%		55,0	52,5	42,5	55,0	45,0
pH	Unités	Méthode du ratio sol/eau de 1:1	6,6	6,4	6,6	6,9	6,8
Conductivité	mS/cm	Méthode de la pâte saturée	-	-	-	-	-
Carbone organique	%	Méthode du four Leco	29,4	4,9	1,0	11,4	1,0
Matière organique	%	Perte au feu	46,7	9,5	2,0	15,8	1,8
Capacité d'échange cationique	Cmol ⁺ /kg	Méthode du chlorure de baryum	43	22	11	22	6
Azote total	%	Méthode de Kjeldahl	1,6	0,41	0,07	0,65	0,05
NH ₃	mg/kg	Extraction au KCl 2N	158	49	5	23	6
NO ₃ -N	mg/kg		15	7	3	86	< 1
NO ₂ -N	mg/kg		< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
Phosphore (total)	%		0,18	0,14	0,06	0,05	0,02
Phosphore	mg/kg	Extraction au NaHCO ₃	56	62	9	24	16
Potassium	mg/kg	Extraction à l'acétate d'ammonium, analyse colorimétrique	411	363	170	200	83
Magnésium	mg/kg		586	315	198	785	196
Calcium	mg/kg		7260	3540	1780	2860	795
Sodium	mg/kg		93	100	67	64	50
Rapport C/N			20,5	0,8	0,3	4	0,6
Rapport d'adsorption du sodium		Méthode de la pâte saturée	0,0	0,1	0,2	0,4	0,1

¹ Caractéristiques du sol artificiel et des divers sols témoins négatifs qui ont été employés pour mettre au point la méthode d'essai biologique définitive décrite dans le présent document et pour établir les critères connexes de validité des essais (EC, 2010, 2013b, 2014b; Hennessy, 2010; Princz et coll., 2010, 2012, 2018; Princz, 2014; Ritchie et coll., 2017; ECCC, 2018, 2019).

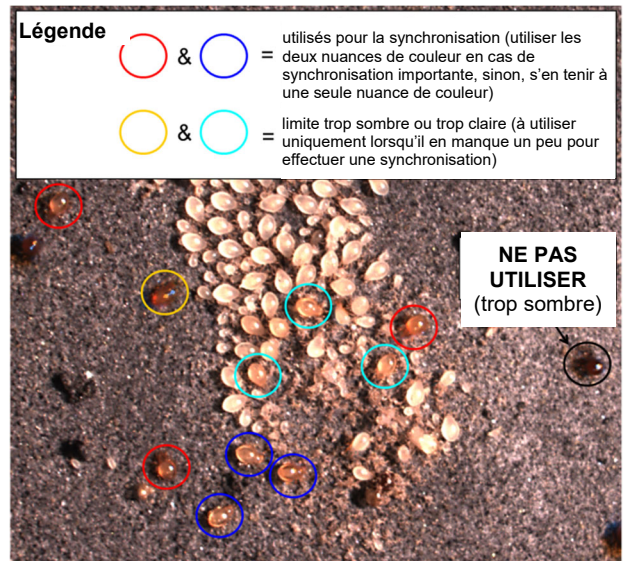
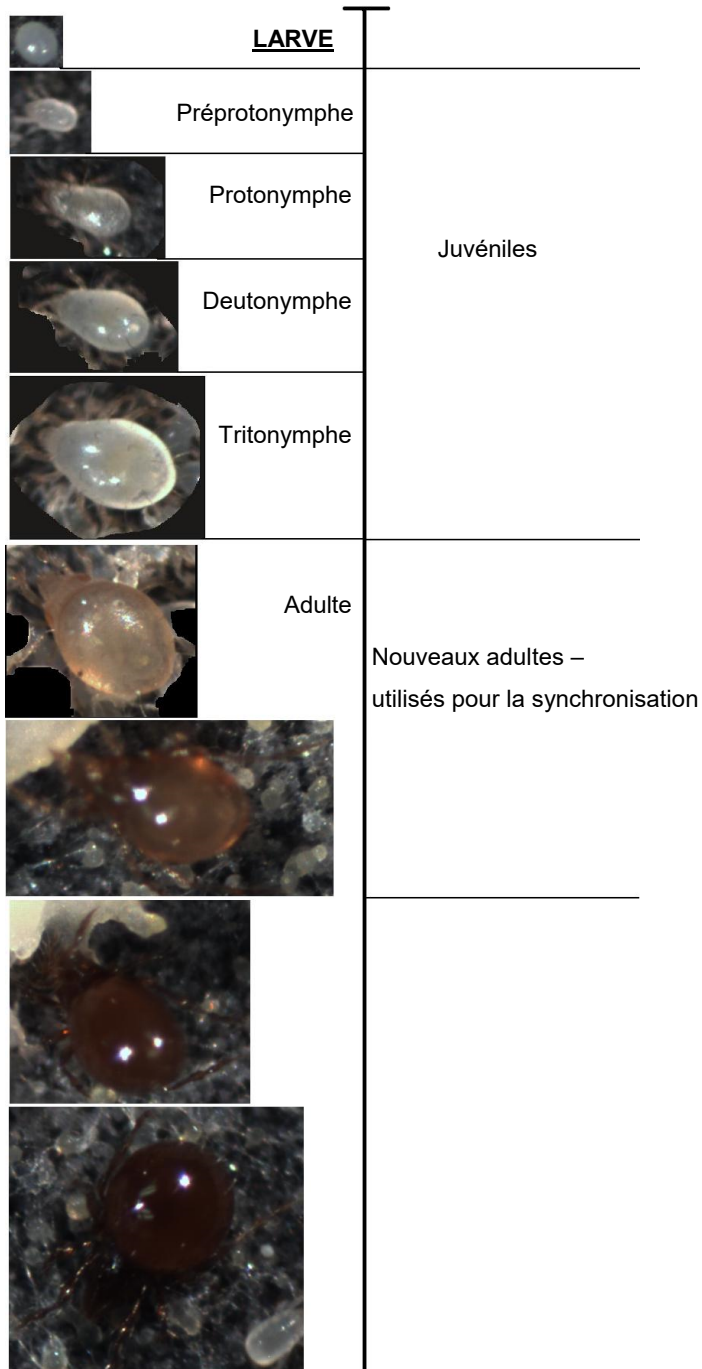
² LS = loam sableux; SL = sable loameux; L = loam

³ Sans objet.

⁴ Non déterminé.

Annexe E

Photographies illustratives d'*Oppia nitens*



Nuances appropriées d'*Oppia nitens* aux fins d'essai avec des élevages synchrones.



Les acariens ayant une apparence opaque « laiteuse » ne doivent pas servir à l'essai.

Annexe F

Séries logarithmiques de concentrations convenant aux essais toxicologiques^a

Colonne (nombre de concentrations entre 10,0 et 1,00 ou entre 1,00 et 0,10)^b

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

^a Modifié d'après Rocchini et coll. (1982).

^b Dans une colonne, on peut choisir une série de concentrations successives. Les points médians entre les concentrations de la colonne (x) se trouvent dans la colonne (2x + 1). Les valeurs énumérées peuvent représenter des concentrations exprimées sous forme de pourcentage massique (p. ex., mg/kg) ou volumique (p. ex., mg/L). Au besoin, on peut les multiplier ou les diviser par n'importe quelle puissance de 10. La colonne n° 2, avec ses deux ordres de grandeur, pourrait être utilisée si le degré de toxicité est entaché de beaucoup d'incertitude. On ne devrait pas utiliser des concentrations plus largement espacées, car elles ne permettraient pas de définir avec précision les limites de confiance entourant toute valeur à effet de seuil calculée. Les valeurs plus rapprochées des colonnes 4 à 7 peuvent parfois être utiles pour les essais sur des substances chimiques dont l'effet de seuil est abrupt.

Annexe G

Méthodes d'extraction à la chaleur

Cette annexe fournit de plus amples renseignements sur la présente méthode pour l'extraction à la chaleur de l'espèce *O. nitens* dans les sols d'essai (v. 4.7). D'autres méthodes pour l'extraction à la chaleur des acariens *O. nitens* dans les sols d'essai sont également fournies dans cette annexe. Ces autres procédures ont été fournies par ECT Oekotoxikologie GmbH (Flörsheim am Main, Allemagne) et Eurofins Agrosience Services EcoTox GmbH (Niefern-Öschelbronn, Allemagne). D'autres procédures d'extraction à la chaleur ou des variantes de celles qui sont fournies dans le présent document peuvent également être utilisées, à condition que l'efficacité de la méthode d'extraction choisie soit validée (v. 4.7).

Procédure d'Environnement et Changement climatique Canada (v. 4.7)

Tous les appareils, l'équipement et les matériaux de construction doivent être faits de matériaux non toxiques, et l'utilisation de matériaux toxiques, y compris le cuivre, le zinc, le laiton, le métal galvanisé, le plomb et le caoutchouc naturel, doit être évitée. Le laboratoire devrait être non seulement bien ventilé et exempt de fumées, mais aussi isolé de tout contaminant pouvant toucher les organismes expérimentaux ainsi que de toute zone de préparation et d'entreposage des échantillons.

Équipement et réactifs (figure G-1)

- Équipement de protection individuel (p. ex., blouse de laboratoire, gants, lunettes de sécurité)
- Gobelets en plastique (p. ex., Fisher n° 11-838-17 au catalogue)
- Canevas rond en plastique pour travaux à l'aiguille (c.-à-d. diamètre de 3 po, 7 mesh)
- Parafilm®
- Ciseaux ou couteau X-Acto (ou outil de coupe similaire)
- Pistolet à colle chaude et bâtons de colle non toxique
- Lampe (avec ampoule de 60 watts)
- Règle
- Thermomètres
- Bouteille de pulvérisation plastique
- Gaze
- Eau déionisée ou distillée
- Éthanol (70 % en volume)



Figure G-1 Matériaux nécessaires pour construire un récipient d'extraction à la chaleur : des gobelets de polypropylène de 4,5 oz (2 par récipient), un canevas circulaire en plastique de 14,6 cm, un pistolet à colle, une gaze et des bandes de Parafilm®.

Création de dispositifs d'extraction à la chaleur

1. Couper le fond d'un gobelet en plastique (à environ 1 cm du fond) pour créer la partie supérieure du dispositif d'extraction à la chaleur (figure G-2A).
2. Couper un morceau du canevas en plastique pour qu'il s'ajuste bien au niveau de l'extrémité non coupée du gobelet en plastique (figure G-2B). Fixer le canevas avec de la colle chaude (figure G-2C). Laisser la colle sécher avant d'assembler les dispositifs d'extraction.
3. Pour créer la partie inférieure du dispositif d'extraction à la chaleur, préparer une couche de plâtre de Paris dans des gobelets en plastique non coupés (environ 1 à 2 cm d'épaisseur).
4. Assembler le dispositif d'extraction à la chaleur en inversant une partie supérieure et en la plaçant sur une partie inférieure de façon à mettre en contact les bouches des gobelets. Sceller le dispositif en enroulant une bande de Parafilm® autour du joint entre les deux gobelets et la fixer avec du ruban adhésif si nécessaire (figure G-2D).
5. Placer un petit carré de gaze (une seule couche) sur le canevas afin que le sol ne puisse tomber à travers la partie inférieure (figure G-2D).

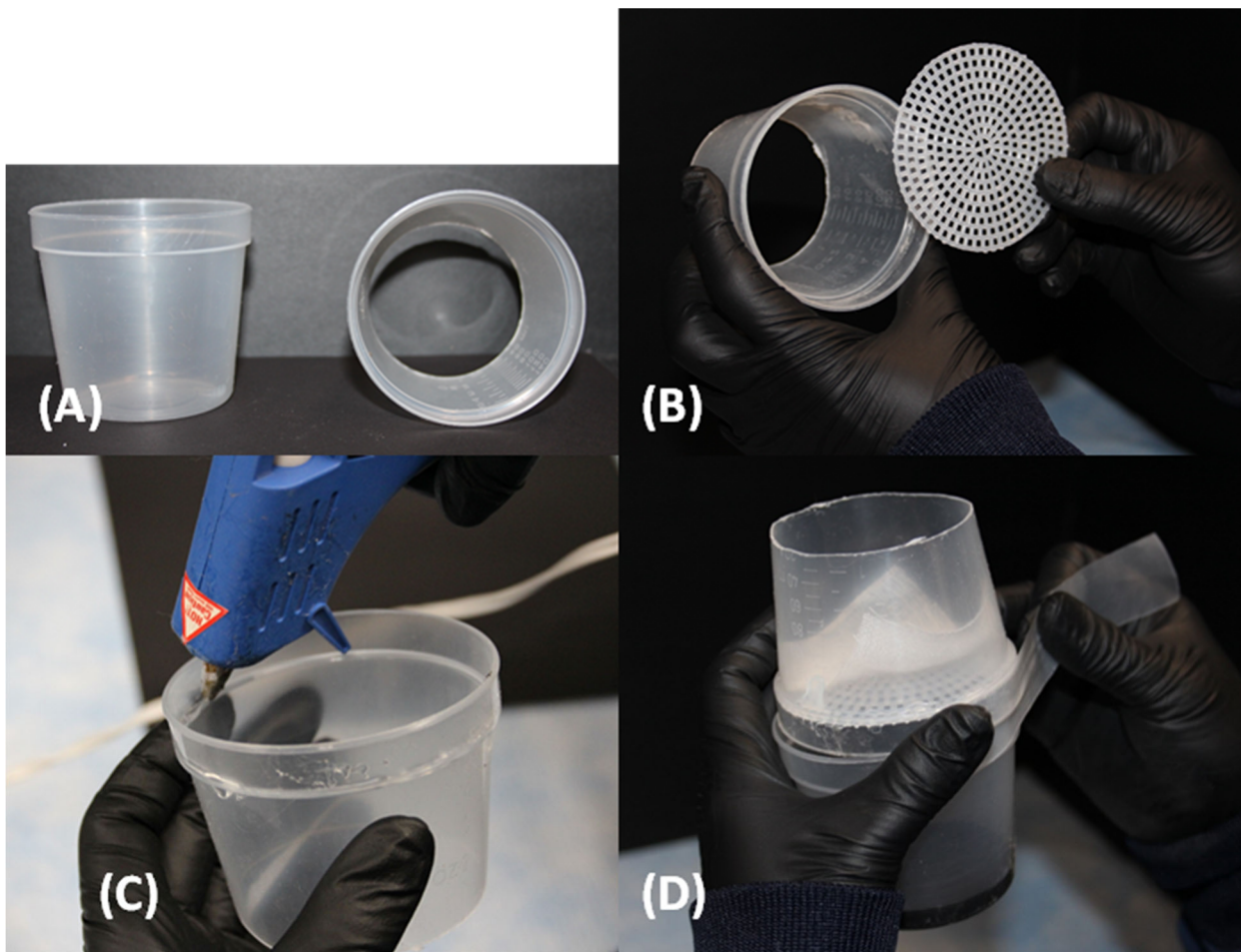


Figure G-2 Création des récipients d'extraction à la chaleur. (A) Le fond est découpé dans l'un des gobelets en plastique (photo de droite). (B) Le canevas en plastique est coupé pour s'ajuster à l'intérieur du rebord du couvercle du gobelet en plastique (~7 cm). (C) De la colle chaude est utilisée pour fixer le canevas sur le rebord du couvercle. (D) Le gobelet inférieur (rempli de 1 à 2 cm de plâtre de Paris) est fixé sur le dessus du dispositif (contenant le fond découpé) avec une bande de Parafilm®; tapoter au besoin.

Exécution de l'extraction à la chaleur

L'extraction à la chaleur devrait être commencée le dernier jour d'essai (c.-à-d. jour 28). Un dispositif d'extraction à la chaleur devrait être préparé et utilisé pour chaque récipient d'essai soumis à l'extraction à la chaleur.

1. Retirer le couvercle du récipient d'essai. Transférer le sol du récipient d'essai dans le dispositif d'extraction à la chaleur correspondant en retournant le récipient sur le dispositif d'extraction (figure G-3A). S'assurer que l'échantillon de sol a été délogé et retiré du récipient d'essai. À l'aide d'une cuillère ou d'une spatule Scoopula, égaliser doucement et uniformément le sol sur le canevas en plastique (doublé d'une gaze).
2. Enregistrer le nombre d'adultes et de juvéniles (c.-à-d. les descendants) vivants et morts présents dans le récipient d'essai qui n'ont pas été transférés dans le dispositif d'extraction à la chaleur. Pour ce faire, on peut ajouter de l'eau désionisée dans le récipient d'essai vide; cela fera flotter les organismes restants, ce qui facilitera le dénombrement.
3. Placer les dispositifs d'extraction à la chaleur sous une lampe munie d'une ampoule de 60 watts. Il ne devrait pas y avoir plus de 5-6 dispositifs sous chaque lampe afin d'assurer la constance de la chaleur et de la lumière pour chaque dispositif d'extraction à la chaleur (figure G-3B).
4. Placer une sonde thermométrique directement dans le sol de l'un des récipients d'extraction à la chaleur; un thermomètre devrait être utilisé par lampe. Noter l'heure à laquelle l'extraction à la chaleur a commencé (c.-à-d. lorsque les ampoules ont été allumées).
5. Ajuster la hauteur de la lampe afin que le bas de l'ampoule soit à environ 25 cm au-dessus de la surface du sol. Au fur et à mesure de l'extraction, il n'est pas nécessaire d'ajuster la hauteur de la lampe, et la température devrait atteindre ~ 32 °C au bout de 48 h.
6. Surveiller et enregistrer la température du sol pendant l'extraction deux fois par jour, ou plus fréquemment si nécessaire. Les lampes peuvent être relevées pendant les périodes où les techniciens ne sont pas présents pour surveiller les dispositifs (p. ex., pendant la nuit) pour éviter que le sol ne sèche complètement.
7. S'assurer que le sol ne se dessèche pas complètement en mouillant la surface avec de l'eau déionisée à l'aide d'un vaporisateur au besoin. Le sol ne devrait pas être mouillé 16 heures avant la fin de l'extraction.
8. Terminer l'extraction à la chaleur après 48 heures en éteignant les lampes.
9. Compter les organismes dans le récipient d'extraction (moitié inférieure du gobelet) à l'aide de la méthode de flottation. Si les organismes ne peuvent être comptés immédiatement, le substrat peut être humidifié avec de l'eau désionisée et placé dans un endroit frais (p. ex., 4 °C-10 °C) jusqu'à ce que le traitement puisse continuer, ou ils peuvent être conservés dans de l'alcool titrant 70 % pour être comptés plus tard. La méthode de flottation décrite dans EC (2014a) peut être utilisée pour dénombrer les organismes. On ajoute de l'eau désionisée (p. ex., une profondeur de 1-2 cm) dans la moitié inférieure du récipient d'extraction thermique contenant les organismes extraits et on agite ou remue légèrement le contenu à l'aide d'une brosse pour déloger tout organisme adhérent au substrat de plâtre de Paris ou aux parois du récipient. Les acariens adultes et les descendants flottent vers la surface, et le gobelet est placé sous un microscope à dissection afin de les compter.
10. Les récipients d'extraction à la chaleur peuvent être lavés à l'eau et au savon, rincés à l'eau désionisée (trois fois) et réutilisés; toutefois, le substrat de plâtre de Paris doit être jeté et remplacé.

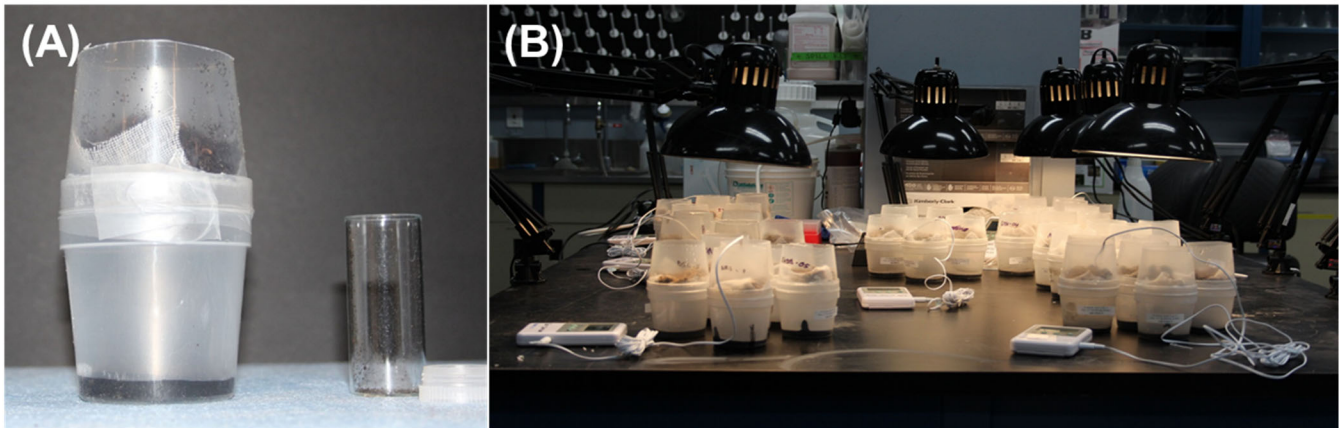


Figure G-3 (A) Le sol est transféré du récipient d'essai dans le dispositif d'extraction à la chaleur. (B) Les dispositifs d'extraction à la chaleur sont placés sous les lampes pendant 48 heures.

ECT Oekotoxikologie GmbH – Procédure

Cette méthode est une variante de celle décrite ci-dessus et à la section 4.7. Les différences comprennent :

- Des ampoules de 25 watts sont utilisées et allumées à une hauteur d'environ 30 cm au-dessus de la surface du sol (au lieu de 25 cm).
- Au jour 0 de l'extraction à la chaleur, la température devrait atteindre ~26 °C.
- Le jour 1, la distance de la lampe par rapport au sol est réduite pour augmenter la température jusqu'à ~28 °C.
- Pour atteindre 32 °C le dernier jour, la hauteur de la lampe est réglée à ~20 cm au-dessus du sol.

Eurofins Agrosience Services Ecotox GmbH – Procédure

Cette procédure utilise un extracteur MacFayden qui génère un fort gradient de lumière et de chaleur pour forcer lentement les organismes à sortir d'un sol d'essai à travers un tamis à mailles, et à tomber dans un bocal de collecte situé en dessous.

Équipement et réactifs

- Extracteur MacFayden (y compris les creusets en plastique avec maille métallique au fond)
- Fines découpes de gaze (pour recouvrir la maille métallique)
- Boîtes de Pétri en plastique (pour recouvrir les dispositifs)
- Étiquettes
- Vaporisateur en plastique contenant de l'eau
- Vaporisateur en plastique contenant de l'éthanol (70 %)
- Bocaux de collecte
- Éthanol (70 % en volume)

Description de l'extracteur

L'objectif est de créer un gradient de lumière, de température et (plus tard) d'humidité. Le dispositif se compose de deux chambres. Dans la chambre supérieure, une source de chaleur et de lumière est placée sur l'échantillon de sol. Dans la chambre inférieure, de l'air froid est apporté par un dispositif de refroidissement.

L'échantillon de sol est placé dans un creuset en plastique (étiqueté) contenant un canevas et une fine gaze découpée sur un entonnoir en verre. Un bocal de collecte est fixé sous l'entonnoir et contient de l'éthanol (70 % en volume) pour conserver les animaux. De plus, l'échantillon de sol est recouvert d'une boîte de Pétri pour éviter que le sol ne se dessèche.

Les arthropodes réagissent à la chaleur et au dessèchement en se déplaçant vers le bas (loin de la chaleur) et tombent à travers le tamis au fond de l'entonnoir dans le bocal de collecte fixé sous le récipient.

Procédé d'extraction

L'extraction est effectuée en augmentant la température quotidienne par paliers, en partant de la température d'essai (de 20 ± 2 °C) jusqu'à 32 °C. Tout au long du processus d'extraction, le sol est humidifié deux à trois fois par jour selon les besoins à l'aide d'un vaporisateur. Le sol n'est pas humidifié pendant les 24 dernières heures de l'extraction à la chaleur.

Temps (heures)	Température (°C)
0 (Début)	22 (Début)
8	24
24	26
48	28
72	30
96	32
120 (Fin)	32 (Fin)

Un exemple de la durée et du gradient de température pour l'extraction à la chaleur est fourni dans le tableau ci-dessus. La durée de l'extraction et le gradient de température ne sont que des lignes directrices et devraient être choisis pour optimiser l'efficacité de l'extraction à la chaleur. Les conditions de température peuvent être consignées par un enregistreur de données.

Dénombrement des organismes expérimentaux

Une fois l'extraction à la chaleur terminée, les creusets en plastique sont retirés, et les entonnoirs sont rincés deux fois avec de l'éthanol titrant 70 % pour s'assurer que tous les organismes sont capturés dans les bocaux de collecte (c.-à-d. qu'ils ne restent pas dans l'entonnoir). Les bords des bocaux de collecte sont également rincés à l'éthanol afin de transférer dans les bocaux de collecte contenant de l'éthanol tous les organismes qui pourraient être collés sur les bords (sinon, ils pourraient se dessécher et il pourrait devenir difficile de les détecter lors du dénombrement). Les organismes capturés dans les bocaux de collecte sont ensuite comptés et les résultats sont consignés.

Détermination d'une concentration témoin positive et définition des limites de contrôle – Exemple fonctionnel

1. Utiliser ≥ 5 essais valides (c.-à-d. les critères de validité des essais doivent être satisfaits) à concentrations multiples dans un type de sol (p. ex., sol témoin négatif ou sol artificiel), avec le même toxique de référence. Dans cet exemple, les essais ont été effectués sur un sol non contaminé prélevé sur le terrain (c.-à-d. un sol témoin négatif) en utilisant de l'acide borique comme toxique de référence.
2. Pour chaque essai, compiler le nombre total moyen de descendants produits par traitement (tableau H-1).
3. Pour chaque essai, calculer et compiler le pourcentage de réduction de la production de descendants par rapport à la réponse dans le groupe témoin (tableau H-2) à l'aide de la formule suivante :

$$\text{Réduction (\%)} = \left(\frac{(\text{Réponse dans le témoin} - \text{Réaction au traitement})}{\text{Réponse dans le témoin}} \right) \times 100$$

4. Calculer le pourcentage moyen de réduction de la production de descendants pour chaque traitement (tableau H-2). *Facultatif*: tracer les données (Figure H-1).
5. Choisir une concentration pour laquelle les données ont tendance à être moins variables (c.-à-d. la plage des données couvre ~ 20 %), mais qui présente tout de même un effet partiel (c.-à-d. réduction de 30 à 70 %; voir les cellules ombrées du tableau H-2 ou les données encadrées de la figure H-1).
6. Calculer l'écart type (ET) et deux écarts types (2 ET) de la réduction moyenne en pourcentage pour la concentration d'essai choisie (tableau H-2).
7. Calculer le pourcentage moyen de réduction ± 2 ET pour la concentration d'essai choisie (tableau H-2) et comparer ces valeurs aux pourcentages de réduction minimum et maximum observés dans le cadre de ce traitement pour s'assurer que les limites de contrôle proposées (c.-à-d. le pourcentage moyen de réduction ± 2 ET) tiennent compte des données liées à la réponse. Utiliser le pourcentage moyen de réduction à ce traitement pour définir le niveau d'effet cible.
8. Dans cet exemple, 95 mg de H_3BO_3 par kilogramme de sol sec a entraîné une réduction moyenne de 41 % de la production de descendants (c.-à-d. le niveau cible de l'effet) avec des limites de contrôle proposées de ≥ 27 % et ≤ 56 %. D'après ces résultats, il s'agit de la concentration d'essai d'acide borique qu'un laboratoire pourrait choisir et utiliser en même temps que chaque essai définitif pour le traitement avec témoin positif.
9. Pour les essais où le témoin positif est inclus dans le cadre de l'essai définitif de reproduction, le pourcentage de réduction de la production de descendants (c.-à-d. l'effet) est comparé aux limites de contrôle établies. Cette opération est effectuée et documentée selon les mêmes procédures que celles utilisées pour comparer les essais toxicologiques de référence à concentrations multiples dans les cartes de contrôle avec toxique de référence (v. 4.9 et figure H-2). Si le pourcentage de réduction de la production de descendants dans un sol témoin positif avec un essai définitif se situe dans les limites de contrôle établies (c.-à-d. le pourcentage moyen de réduction ± 2 ET), le témoin positif est acceptable. Si la réponse est en dehors de ces limites, il faut examiner le déroulement de l'essai et la sensibilité de la population d'essai (c.-à-d. les élevages de laboratoire) (v. 4.9). Cet examen peut consister, par exemple, à déterminer si la concentration témoin positive a été préparée correctement, à vérifier les calculs de l'essai, à confirmer analytiquement la concentration témoin positive, à examiner les données sur les témoins négatifs, à examiner les données sur la santé de l'élevage, à vérifier les compétences du technicien ou la qualité en fonction de l'âge du sol (p. ex., s'il a été conservé trop longtemps dans des seaux). Outre l'établissement de cartes de contrôle sur les témoins positifs, un laboratoire devrait surveiller la variabilité de la réponse des témoins positifs dans le temps en calculant le coefficient de variation (CV) de la réponse et en l'évaluant par rapport à une limite d'acceptabilité prédéfinie (p. ex., le laboratoire définit un $\text{CV} \leq 30$ % comme acceptable). Dans cet exemple, le CV est de 17,2 % pour six points de données (tableau H-2).

Tableau H-1 Nombre moyen de descendants d'*Oppia nitens* produits lors de l'exposition à l'acide borique dans un sol non contaminé prélevé sur le terrain

Essai n°	Concentration d'acide borique (mg/kg)					
	0	56	73	95	123	160
1	175,4	81,0	207,8	122,4	33,8	10,2
2	38,0	39,4	46,0	21,0	9,8	0,2
3	173,2	180,0	173,6	109,6	53,0	9,8
4	114,4	117,6	120,4	57,2	33,6	1,2
5	139,5	129,8	117,4	75,6	29,0	6,2
6	124,6	117,2	85,8	75,4	46,2	2,6

Tableau H-2 Pourcentage de réduction de la production de descendants d'*Oppia nitens*, par rapport à la réponse dans le groupe témoin, lors de l'exposition à l'acide borique dans un sol non contaminé prélevé sur le terrain

Essai n°	Concentration d'acide borique (mg/kg)					
	0	56	73	95	123	160
1	0	53,8	-18,5	30,2	80,7	94,2
2	0	-3,7	-21,1	44,7	74,2	99,5
3	0	-3,9	-0,2	36,7	69,4	94,3
4	0	-2,8	-5,2	50,0	70,6	99,0
5	0	7,0	15,8	45,8	79,2	95,6
6	0	5,9	31,1	39,5	62,9	97,9
Moyenne	-	9,4	0,3	41,2	72,9	96,7
ET^a				7,1		
2 ET				14,3		
Moyenne + 2 ET				55,5		
Moyenne - 2 ET				26,9		
% CV				17,2		

^a Écart type

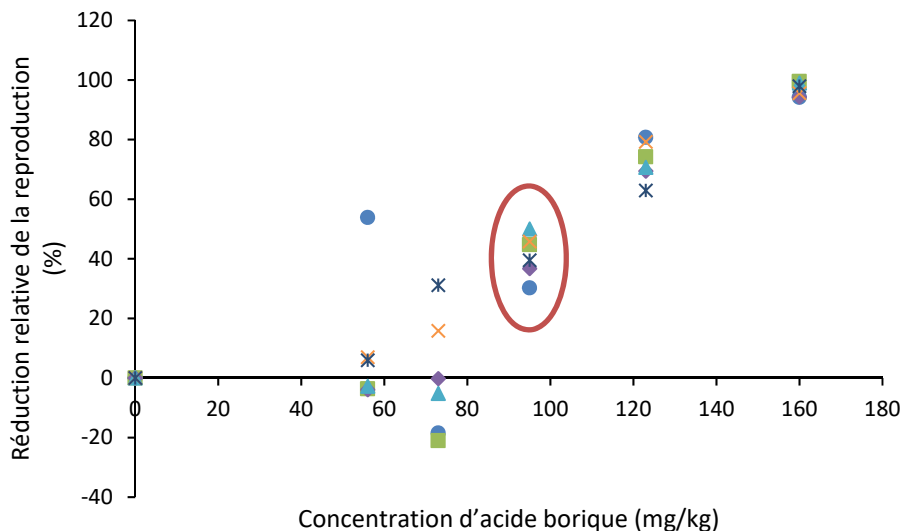


Figure H-1 Reproduction d'*Oppia nitens* (en pourcentage de la réponse dans le groupe témoin) dans un sol non contaminé prélevé sur le terrain (c.-à-d. sol témoin négatif) enrichi avec de l'acide borique (mg/kg). Chaque symbole représente différents essais à concentrations multiples.

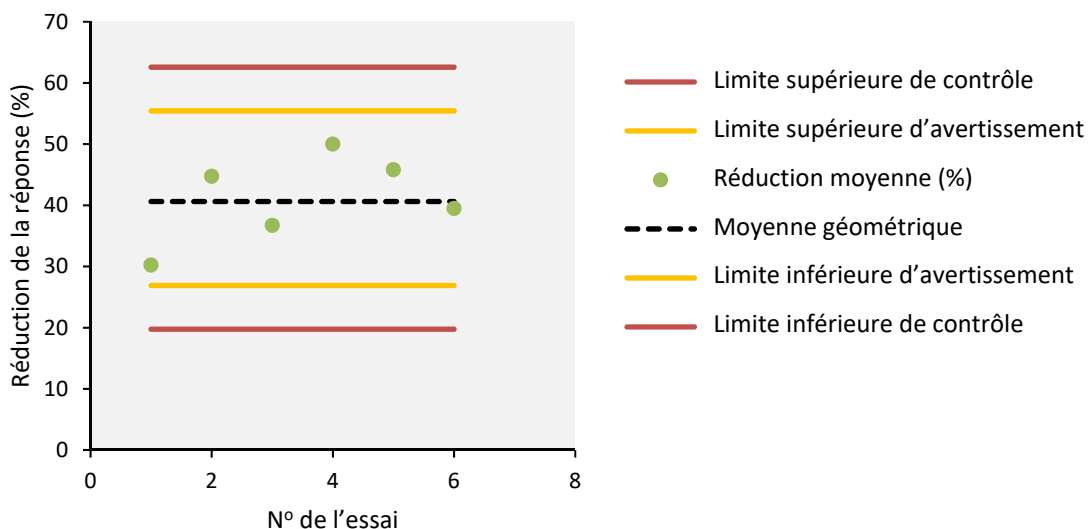


Figure H-2 Carte de contrôle illustrant le pourcentage de réduction de la production de descendants d'*Oppia nitens* (en pourcentage de la réponse dans le groupe témoin) dans le cadre des traitements avec sol témoin positif (95 mg d'acide borique par kilogramme de sol) inclus avec chaque essai définitif de reproduction. Les limites de contrôle inférieures et supérieures représentent le pourcentage moyen de réduction (calculé à chaque nouvel essai) ± 2 ET. Les limites de contrôle inférieures et supérieures représentent le pourcentage moyen de réduction ± 3 ET.