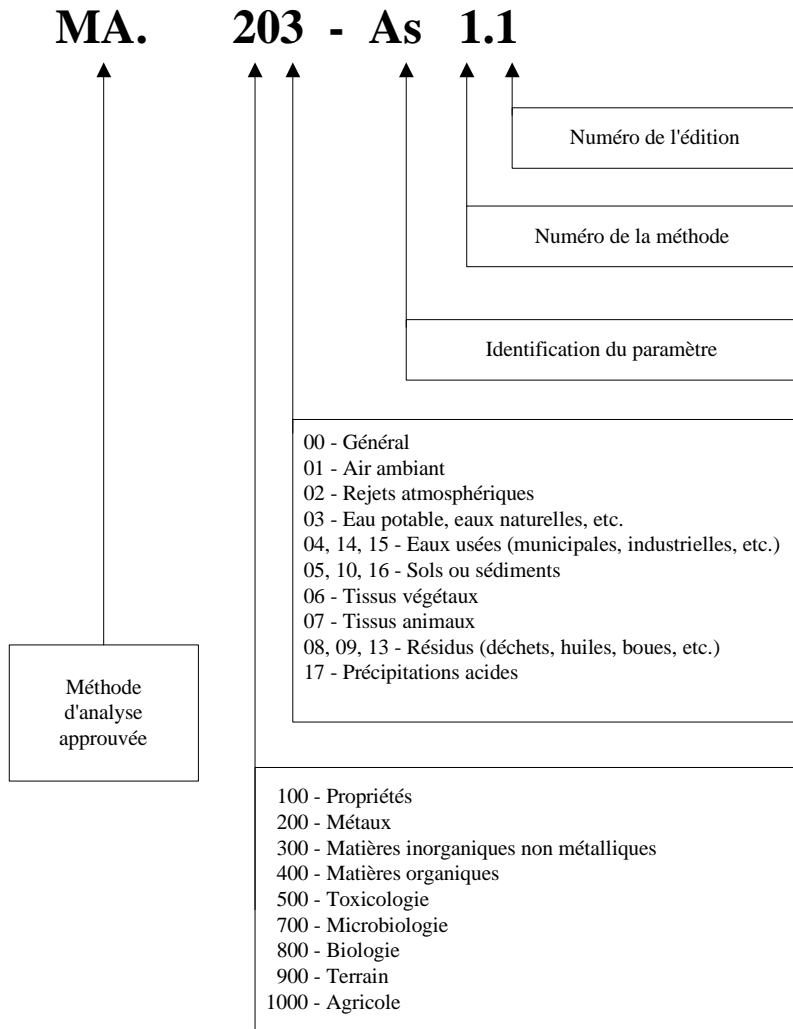


MA. 500 – VTL 1.0
Édition : 2003-04-30

Méthode d'analyse

Détermination de la toxicité létale chez le ver de terre
(*Eisenia andrei*, *Eisenia fetida*)

Exemple de numérotation :



ÉDITION APPROUVÉE LE : 30 avril 2003

Ce document doit être cité de la façon suivante :

CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC,
Détermination de la toxicité létale chez le ver de terre (*Eisenia andrei*, *Eisenia fetida*)
MA. 500 – VTL 1.0, Ministère de l'Environnement du Québec, 2003, 25 p.

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------|----|
| INTRODUCTION | 7 |
| 1. DOMAINE D'APPLICATION | 7 |
| 2. PRINCIPE ET THÉORIE | 7 |
| 3. FIABILITÉ | 7 |
| 3.1. Interférence | 8 |
| 3.2. Fidélité | 8 |
| 4. PRÉLEVEMENT ET CONSERVATION | 9 |
| 4.1. Prélèvement | 9 |
| 4.2. Conservation | 9 |
| 5. APPAREILLAGE ET FOURNITURES | 9 |
| 6. RÉACTIFS ET SOL DE RÉFÉRENCE | 10 |
| 6.1. Toxique de référence | 10 |
| 6.2. Sol artificiel | 10 |
| 6.3. Sol de référence | 11 |
| 7. ORGANISME BIOLOGIQUE | 12 |
| 7.1. Espèce | 12 |
| 8. PROTOCOLE D'ANALYSE | 12 |
| 8.1. Préparation des échantillons | 12 |
| 8.2. Conditions du test | 15 |
| 8.3. Schéma expérimental | 16 |
| 8.4. Départ du test | 16 |
| 8.5. Mesures à la fin du test | 17 |
| 8.6. Essai avec un toxique de référence | 17 |
| 8.7. Acceptabilité des résultats | 17 |
| 9. CALCUL ET EXPRESSION DES RÉSULTATS | 18 |
| 9.1. Détermination des CL ₅₀ 7j et 14j | 18 |
| 9.2. Expression des résultats | 18 |
| 10. BIBLIOGRAPHIE | 19 |
| Annexe 1 - Méthode d'élevage des vers de terre | 21 |
| Annexe 2 - Feuille de travail..... | 23 |
| Annexe 3 - Suivi de l'élevage de vers de terre (<i>Eisenia fetida</i>) | 25 |

INTRODUCTION

Au cours des deux dernières décennies, les problématiques de sols contaminés et de déchets solides ont connu une hausse dans l'ensemble des pays industrialisés, entraînant un besoin d'élaboration de méthodes de caractérisation toxicologique plus performantes. Les invertébrés du sol sont considérés comme de bons indicateurs de la qualité du sol (Lokke et Van Gestel, 1998; Greig-Smith *et al.*, 1992) et certains d'entre eux, particulièrement les vers de terre, présentent un intérêt particulier, car ils peuvent être exposés aux contaminants par différentes voies (phase aqueuse, phase vapeur et ingestion de la phase solide). Certaines espèces sont ubiquistes et représentatives de la faune indigène tout en étant faciles à élever en laboratoire. Les deux espèces les plus utilisées au cours des tests de toxicité sont *Eisenia andrei* et *Eisenia fetida*. Ces espèces sont typiques des sols riches en matière organique et sont fréquemment utilisées pour le compostage.

Différents protocoles sont disponibles (ISO 11268-1, 1993; OCDE 207, 1993; ASTM E1676, 1997; USEPA, 1988; EC, 2001 préliminaire), lesquels présentent de façon plus ou moins détaillée les mêmes exigences.

1. DOMAINE D'APPLICATION

Le test de toxicité réalisé au CEAEQ utilise le ver de terre *E. andrei* et est utilisé pour déterminer la toxicité d'échantillons solides (sols contaminés, résidus solides, matières résiduelles fertilisantes) ou liquides (substances pures, eaux usées, lixiviats de résidus solides, solutions susceptibles de contenir des substances toxiques) en utilisant un sol artificiel.

2. PRINCIPE ET THÉORIE

Ce test consiste à déterminer la concentration de l'échantillon qui cause la mortalité de 50 % des individus après 7 et 14 jours d'exposition (CL₅₀ 7j et 14j). Il peut également être appliqué à un échantillon solide non dilué et comparé à un groupe témoin (test à concentration unique).

Les essais sont réalisés dans des conditions contrôlées en laboratoire (température et humidité).

3. FIABILITÉ

Les données de fiabilité présentées dans ce document ont été récoltées à l'aide d'essais utilisant le sol artificiel de l'OCDE et le dodécyl sulfate de sodium. Ce sol étant peu représentatif d'un sol naturel, un nouveau sol artificiel (sable : 70 %, limon : 22 %, kaolinite : 5 % et terre noire : 3 %) a été développé afin d'offrir une meilleure représentativité du point de vue de la biodisponibilité des contaminants. Ce nouveau sol possède une texture et des propriétés de compaction similaires au sol précédent et s'est avéré adéquat pour la réalisation des essais. Il est à présent utilisé de façon routinière pour la réalisation du test de létalité avec *E. andrei*. De même, le chlorure de cadmium est désormais utilisé comme toxique de référence.

3.1. INTERFÉRENCE

La réalisation d'un test de toxicité nécessite des conditions environnementales optimales au cours de la période d'exposition, lesquelles sont adaptées spécifiquement à l'organisme biologique utilisé. Il est fréquent que les échantillons solides présentent des écarts significatifs par rapport à ces conditions optimales et que des ajustements soient nécessaires afin d'éviter de fausses réponses positives. Les modifications apportées à l'échantillon peuvent interférer avec l'équilibre physico-chimique des contaminants et de la matrice et entraîner un masquage ou une augmentation de la réponse toxique. Le compromis obligatoire que l'on doit faire pour rendre la matrice propice à la survie et à la croissance des organismes pendant le test de façon à ne mesurer que l'effet des contaminants entraîne souvent une difficulté à tester les échantillons de façon parfaitement représentative. L'usage de groupes de contrôle et de sol de référence permet de déterminer en partie l'effet de ces modifications.

Dans certains cas, les propriétés physiques du sol peuvent interférer directement avec la réalisation du test. Les sols argileux contenant un excès de fines particules entraînent une compaction et une augmentation de la densité du sol, laquelle peut être inappropriée au test. L'excès ou le manque d'humidité, les pH extrêmes ou l'hétérogénéité granulométrique peuvent également créer de l'interférence et nécessiter un prétraitement de l'échantillon qui en modifie l'intégrité initiale. Par exemple, la réduction de la compaction par l'ajout de sable de silice contribue à augmenter la porosité, laquelle peut modifier la volatilisation de certains contaminants ainsi que leur biodisponibilité. Ainsi, la silice accroît la perméabilité du sol et l'écoulement de l'eau, ce qui peut faciliter la solubilisation des contaminants (pour plus de détails sur ces aspects, voir Zagury *et al.*, 2002).

L'interprétation des résultats devra donc prendre en considération les interférences liées à la matrice et à la perte de représentativité liée aux modifications apportées à l'échantillon.

3.2. FIDÉLITÉ

3.2.1. Répétabilité

La répétabilité d'une série de mesures ($n = 19$) obtenues avec le dodécyl sulfate de sodium (DSS) a été de ± 94 mg/kg (CL₅₀ 14j moyenne = 1142 mg DSS/kg et l'écart type = 195 mg DSS/kg).

La répétabilité a été calculée comme suit :

$$I. C. 95 \% = x \pm \left[t (0,95; N-1) \frac{s}{\sqrt{N}} \right]$$

où

N : nombre de mesures;

x : moyenne arithmétique d'une série de mesures;

s : écart type d'une série de mesures;

t (0,95; N-1) : variable de la distribution de Student au niveau de confiance de 95 % pour N-1 degrés de liberté.

4. PRÉLEVEMENT ET CONSERVATION

4.1. PRÉLEVEMENT

Le prélèvement et la préparation des échantillons de sol posent des exigences particulières. L'échantillon doit d'abord être représentatif du site étudié. L'hétérogénéité de la matrice en termes de granulométrie et de structure verticale ainsi que les proportions variables des principaux constituants minéraux et organiques font en sorte que le niveau de représentativité des échantillons solides est plus difficile à concevoir que pour la plupart des matrices liquides. À cet égard, les guides d'échantillonnage présentant les techniques de prélèvement appropriées doivent être suivis.

À titre indicatif, pour les contaminations essentiellement organiques, les outils d'échantillonnage doivent être en acier inoxydable et les contenants de prélèvement en téflon ou en verre. Le couvercle doit être muni d'un scellant en téflon et le pot rempli en laissant un espace d'air minimal. Pour les contaminations inorganiques, les outils d'échantillonnage doivent être en polyéthylène à haute densité (HDPE) et les contenants de prélèvement en HDPE ou en polypropylène (PP) lavés à l'acide nitrique. Pour les contaminations mixtes, des pots de borosilicate conviennent.

Des précautions particulières doivent également être prises lors du prélèvement de sol situé dans une couche profonde où l'exposition à l'air a été très faible ou inexistante. Ces échantillons, de même que ceux contenant potentiellement des composés volatils, devraient être rapidement mis en pot, remplis à ras bord et compactés de façon à limiter le plus possible l'oxydation et la volatilisation des contaminants.

4.2. CONSERVATION

Les échantillons doivent être entreposés à l'obscurité à 4 °C. Aucun agent de préservation ne doit être ajouté et les échantillons ne doivent pas être congelés.

Il est recommandé de procéder aux tests de toxicité le plus rapidement possible après l'échantillonnage. Pour les échantillons liquides, tels les lixiviats de sites contaminés ou les eaux usées en général, le délai maximal de conservation est de 5 jours. Pour les lixiviats préparés au laboratoire, le délai maximal est de 5 jours après la lixiviation. Dans le cas des échantillons solides, la durée de conservation peut être variable selon la nature et l'âge de la contamination. Les sols présentant des contaminations récentes susceptibles de contenir des substances dégradables ou volatiles doivent être traités dans un délai de 7 jours. Également, les sols ou déchets faisant l'objet de contamination ancienne susceptible d'être relativement stable peuvent tolérer une durée de conservation à 4 °C allant jusqu'à six mois avant traitement.

5. APPAREILLAGE ET FOURNITURES

5.1. Chambre environnementale (20 °C ± 2 °C)

5.2. pH-mètre

- 5.3. Conductivimètre
- 5.4. Balance analytique ($\pm 0,001\text{g}$)
- 5.5. Tamiseur automatique avec tamis de 20, 75, 106, 250 et 300 μm
- 5.6. Contenant de polyéthylène haute densité (HDPE) 500 ml avec couvercle troué
- 5.7. Membrane géotextile commerciale
- 5.8. Micropipettes à volume variable
- 5.9. Tige en verre ou en acier inoxydable
- 5.10. Boîtes de polyéthylène haute densité (HDPE) pour la culture des vers de terre
- 5.11. Sacs de plastique en polyéthylène de type Ziploc[®]

6. RÉACTIFS ET SOL DE RÉFÉRENCE

Tous les réactifs commerciaux utilisés sont de qualité A.C.S., à moins d'indication contraire. De l'eau ultra-pure de type Milli-Q est utilisée dans la préparation des solutions du toxique de référence.

6.1. TOXIQUE DE RÉFÉRENCE

- Chlorure de cadmium, $\text{CdCl}_2 \cdot 2\frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}$ (CAS n° 7790-78-5).

Une solution mère de chlorure de cadmium est préparée à une concentration de 10 g/l de Cd (20,33 g $\text{CdCl}_2 \cdot 2\frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}$ /l ou 16,31 g CdCl_2) avec de l'eau ultra-pure. Cette solution peut être conservée pour une durée de six mois. Après six mois, si la solution est vérifiée chimiquement et que sa concentration n'a pas varié de plus de 10 %, la même solution peut être conservée pour une durée additionnelle de trois mois.

6.2. SOL ARTIFICIEL

Le sol artificiel utilisé est le sol CEAEQ.

6.2.1. Composition

- 70 % sable de silice grade 70 tamisé à 106-250 μm
- 22 % de limon (sable de silice grade 70 tamisé à 20-75 μm)
- 5 % d'argile kaolinite
- 3 % terre noire (humus noir de *Sphagnum* sp.) tamisée à 4 mm

6.2.2. Préparation

Déterminer le pourcentage d'humidité de la terre noire en pesant une fraction de 10 g, en faisant sécher à 105 °C pendant 24 heures et en pesant de nouveau. Déterminer le pourcentage d'humidité de la façon suivante :

$$\left[\frac{\text{poids humide} - \text{poids sec}}{\text{poids sec}} \right] \times 100$$

Tenir compte du taux d'humidité pour réajuster le poids de terre noire de façon à respecter 3 % en poids sec dans le sol artificiel.

Tamiser pendant 15 minutes du sable de silice grade 70 à l'aide d'un tamiseur automatique muni d'une séquence de tamis de 300, 250, 106, 75 et 20 µm. La fraction 106-250 µm est conservée comme la fraction sable et la fraction de 20 à 75 µm est conservée comme la fraction limon.

Dans un mélangeur rotatif muni d'une cuve en polypropylène (PP), préparer des portions d'environ 25 kg de sol en ajoutant les proportions suivantes et en mélangeant pendant 45 minutes :

- 3500 g de sable 106-250 µm
- 1100 g de limon 20-75 µm
- 250 g de kaolin
- 150 g de terre noire (équivalent sec) tamisée à 4 mm

Le mélange sec est conservé dans le mélangeur et lorsqu'une quantité de sol doit être utilisée, le sol est mélangé de nouveau pour une durée de 15 minutes. Ce deuxième mélange a pour but de réhomogénéiser le sol, car avec le temps d'entreposage une ségrégation granulométrique verticale peut se faire entraînant la fraction fine vers le fond du contenant. De façon à avoir un mélange bien homogène, il est donc nécessaire de remélanger le sol selon le besoin.

Le pH du sol est déterminé en mélangeant 10 g de sol à 100 ml d'eau ultra-pure (ratio 1 : 10). Le pH de ce sol se situe naturellement entre une valeur de 5,8 et de 6,2. Si le pH est inférieur à 5,7, il doit être réajusté à $6,0 \pm 0,2$ à l'aide de carbonate de calcium (CaCO_3) à une concentration d'environ 0,1 %. À noter que le pH du sol peut varier légèrement dans les jours suivant l'ajustement du taux d'humidité.

La capacité maximale de rétention en eau (cf. 8.1.1) a été déterminée à 36 % après quatre essais avec une méthode avec application de 5 lb/po^2 de pression.

6.3. SOL DE RÉFÉRENCE

L'utilisation d'un sol de référence de texture et de physico-chimie identique au sol contaminé, mais sans contamination, est recommandée. Lorsque disponible, cette option permet de corriger l'interprétation des résultats en fonction de l'interférence possible de la texture du sol sur la survie et le comportement des organismes.

7. ORGANISME BIOLOGIQUE

7.1. ESPÈCE

Le ver de terre *Eisenia andrei* est un annélide de la classe des Clitellata et de la sous-classe des Oligochètes et de la famille des Lumbricidae. Cette espèce est saprophage et se nourrit de déchets organiques. Elle possède un cycle de vie court, atteignant la maturité sexuelle en 35 à 52 jours. La durée de vie maximale du ver est de 3 à 5 ans.

Dans de bonnes conditions d'humidité (40 %) et de température (22 °C), *E. andrei* est très prolifique, chaque ver produisant de deux à cinq cocons par semaine.

Des vers de terre (*Eisenia andrei*) élevés dans des conditions définies à l'annexe 1 sont utilisés pour les essais de toxicité. Ils doivent être adultes (âgés d'au moins deux mois avec un clitellum) et avoir un poids individuel de 250 à 700 mg.

8. PROTOCOLE D'ANALYSE

8.1. PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

8.1.1. Échantillons solides

Les échantillons solides doivent être bien homogénéisés et tamisés à 4 mm. Le pH et le pourcentage d'humidité sont déterminés et le taux d'humidité est ajusté à environ 80 % de la capacité maximale de rétention en eau (cette valeur peut varier selon la texture du sol). Pour le sol artificiel utilisé dans ce protocole, l'humidité est également ajustée à 80 % de la capacité de rétention, ce qui équivaut à un taux d'humidité de 29 %. Si le sol est détrempe, il doit être séché jusqu'à l'obtention du taux d'humidité désiré.

La capacité maximale de rétention en eau est déterminée comme suit :

- Utiliser un becher de polypropylène (PP) de 50 ml, dont le fond a été retiré et remplacé par une grille plastifiée. Déposer sur la grille un filtre Whatman n° 2 couvrant entièrement le fond du becher et saturer le filtre d'eau.
- Peser le becher avec le filtre saturé d'eau.
- Peser une quantité de 50 g de sol (équivalent sec) et le déposer dans le becher; peser de nouveau le sol et le becher et noter le poids.
- Saturer le sol d'eau en l'immergeant pendant 15 minutes dans un contenant plus grand renfermant de l'eau de façon à ce que son niveau atteigne environ la demie de la hauteur du niveau du sol.

- Retirer le becher contenant le sol du grand récipient d'eau et laisser drainer pendant quelques minutes; déposer ensuite sur une surface absorbante et laisser l'eau se drainer librement pendant 15 minutes.
- Déposer ensuite le becher contenant le sol sur une rampe à filtration sous vide, appliquer une pression de 5 lb/po² pendant 5 minutes et laisser l'eau se drainer.
- Peser de nouveau le becher contenant le sol humidifié et noter.
- Déterminer le poids du sol humide en soustrayant le poids du becher avec le filtre saturé d'eau.

La capacité maximale de rétention est calculée comme suit :

$$\frac{\text{poids humide} - \text{poids sec}}{\text{poids sec}}$$

Procéder ensuite à l'hydratation de l'échantillon de sol à un niveau correspondant à 80 % de la capacité maximale de rétention.

Un temps d'équilibrage de 24 heures après l'hydratation doit être appliqué pour les sols initialement secs et pour les sols artificiels fabriqués au laboratoire. Le pH peut présenter des variations au cours des heures suivant l'hydratation. Pour le sol artificiel, le pH est mesuré de nouveau après la période d'équilibrage de 24 heures.

Pour certains sols à faible teneur en matière organique et à fractions particulaires très fines, l'hydratation peut être problématique. Le sol peut passer rapidement d'une structure dure et compacte à un état boueux lors de la phase d'hydratation. Dans ces cas particuliers, il est recommandé, lorsque cela est possible, d'effectuer des prétests d'hydratation de façon à déterminer la quantité précise d'eau à ajouter. Dans le cas des échantillons très compacts (argileux), il peut être également nécessaire d'améliorer la texture du sol par l'ajout de sable de silice. Ces modifications doivent être précisées sur la feuille de travail du laboratoire ainsi que sur le certificat d'analyse. Dans les cas de sols ayant des textures problématiques, il est fortement recommandé de mener parallèlement un groupe de référence constitué du même sol que le sol contaminé mais provenant d'une zone non contaminée.

Pour les échantillons contenant des substances volatiles, l'exposition à l'air doit être minimisée. Ainsi, au lieu de tamiser, il est plutôt conseillé de broyer et d'homogénéiser le sol dans un sac de polyéthylène hermétiquement fermé.

Pour la détermination de la CL₅₀ 14j, une série de dilutions de l'échantillon solide est effectuée afin d'obtenir une relation concentrations/réponses. Cette dilution s'effectue avec un sol de référence non contaminé si un tel sol est disponible ou avec le sol artificiel du laboratoire. Les dilutions doivent être effectuées sur une base de poids sec.

8.1.2. Échantillons liquides

Les échantillons liquides peuvent être testés sur le sol artificiel en humidifiant ce dernier au moyen de l'échantillon. Il est également possible de déterminer la relation concentrations/réponses en effectuant des dilutions de l'échantillon avec de l'eau ultra-pure.

Pour plus de détails sur les procédures de fabrication d'extraits liquides pour l'estimation de la mobilité des contaminants dans les sols, consulter le protocole MA 500 – Lix 1.0 (CEAEQ, 2003).

8.2. CONDITIONS DU TEST

Tableau 1 - Conditions d'essai pour le test de létalité avec le ver de terre

| | |
|-------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Espèce | <i>Eisenia andrei</i> 250-700 mg avec clitellum âgés d'au moins deux mois |
| Température d'incubation | 20 °C ± 2 °C |
| Sol artificiel | <ul style="list-style-type: none"> • 70 % sable de silice (106-250 µm) • 22 % limon (20-75 µm) • 5 % kaolin • 3 % terre noire • pH : 6,0 ± 0,2 |
| Hydratation et % humidité | <ul style="list-style-type: none"> • 80 % du taux maximal de rétention en eau • Hydratation au début du test et à 7 j si nécessaire. |
| Luminosité | Aucune |
| Type de contenant de test | Contenants de 500 ml en polyéthylène |
| Quantité de sol par contenant | 200 g sec |
| Nombre de vers par contenant | 5 |
| Nombre de replica | <ul style="list-style-type: none"> • 5 pour test avec échantillon 100 % ; • 3 pour test avec relation concentrations/ réponses |
| Durée du test | 14 jours |
| Mesures physico-chimiques | <ul style="list-style-type: none"> • Au début du test : capacité de rétention en eau • % d'humidité, pH et conductivité pour les échantillons solides • Au début du test : pH, conductivité et oxygène dissous pour les échantillons de lixiviat • % humidité et pH dans quatre replica à la fin du test (2 pour l'échantillon et 2 pour le témoin) • Température de l'incubateur trois fois par semaine |
| Mesures biologiques | <ul style="list-style-type: none"> • Poids moyen de 5 vers utilisés dans le témoin au début • Mortalité et comportements anormaux au temps 7 et 14 j |
| Paramètres de mesure | <ul style="list-style-type: none"> • % de mortalité par rapport au contrôle pour les tests à concentration unique • CL₅₀ au 7^e et 14^e jour pour les tests avec relation concentrations/réponses |
| Statistiques | <ul style="list-style-type: none"> • Probit, moyenne mobile ou binomiale pour la CL₅₀ • Test t unilatéral pour les tests à concentration unique |

8.3. SCHÉMA EXPÉRIMENTAL

De façon générale, aucune dilution de sol n'est effectuée dans le cas des problématiques de sols contaminés et de déchets solides où l'échantillon provient du terrain. L'approche expérimentale est alors basée sur une comparaison statistique (test *t* unilatéral) entre l'échantillon et le témoin. Un nombre plus grand de replica (5 ou plus) est nécessaire dans cette approche. Dans certains cas, le processus de gestion du sol contaminé peut nécessiter une dilution avec un sol propre et la réutilisation du sol ainsi modifié. Le sol peut alors être testé à la concentration 100 % et à la concentration d'usage prévue.

Dans le cas des échantillons liquides (lixiviats, eau usée, etc.), un sol artificiel est hydraté avec l'échantillon et comparé au témoin hydraté avec de l'eau déminéralisée.

Dans les contextes d'étude sur la toxicité de produits purs ou de mélanges de produits purs (établissement de critères, etc.), la détermination de la relation concentrations/réponses est nécessaire. Un nombre de trois replica est alors utilisé avec une gamme de concentrations relativement étendue. Le choix de la gamme de dilutions doit être basé sur le comportement de l'échantillon plutôt que sur un choix préétabli.

8.4. DÉPART DU TEST

Déposer 200 g (équivalent sec) d'échantillon ou de sol artificiel dans chacun des contenants de 500 ml. Pour le sol artificiel, le sol est hydraté avec de l'eau déminéralisée à 80 % de la capacité maximale de rétention, soit 29 % d'humidité. Pour les autres échantillons, ils sont hydratés à 85 % de la capacité maximale de rétention en eau. Les vers de terre sont insérés délicatement dans le sol de façon à obtenir un contact intime avec l'échantillon. Déposer par la suite une membrane géotextile à la surface du sol et sur les rebords des contenants et appuyer cette membrane contre le sol à l'aide d'un dispositif adéquat de façon à empêcher les vers de se maintenir à la surface du sol et ainsi éviter l'exposition. Un couvercle de plastique troué et doublé d'un géotextile permet ensuite de fermer complètement le contenant d'essai tout en maintenant des échanges gazeux entre le sol et l'atmosphère. Si le sol a tendance à trop se dessécher, on peut déposer un papier filtre imbibé d'eau sur le couvercle de façon à conserver l'humidité du sol.

Pour les tests avec un sol contaminé, 5 replica contenant chacun 5 vers sont utilisés, soit 25 vers pour l'échantillon non dilué et 25 vers pour le témoin. Le groupe témoin est composé de sol artificiel (cf. 6.2). Pour les tests avec un sol contaminé prélevé sur le terrain, il est fortement recommandé de procéder avec un sol de référence constitué du même sol que l'échantillon mais sans contamination. Ce sol de référence peut être obtenu à proximité du site d'échantillonnage mais dans une zone non contaminée. La toxicité mesurée dans l'échantillon est alors comparée au site de référence. Le groupe témoin (sol artificiel) du test agit pour sa part comme un contrôle de qualité de laboratoire.

Pour les tests avec détermination de la relation concentrations/réponses, le nombre de replica est de 3. Un minimum de 5 concentrations est nécessaire afin de permettre une détermination suffisamment précise des CL₅₀ 7j et 14j.

Le pourcentage d'humidité, le pH et la conductivité de l'échantillon ainsi que la température de l'enceinte de test sont mesurés au temps 0. Le poids de 5 vers de terre d'un replica témoin est noté et la moyenne est déterminée.

Les contenants sont déposés dans une chambre environnementale ou une pièce à température contrôlée pour une période de 14 jours à une température de $20\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$. Une vérification de la mortalité est effectuée pendant le 7^e jour d'exposition. Les individus morts sont alors retirés et le nombre d'individus morts est noté sur la feuille de travail. En cours de test, la température doit être mesurée et notée trois fois par semaine et il faut vérifier occasionnellement si le milieu conserve suffisamment son humidité. S'il y a lieu, il faut réhydrater à l'aide d'une vaporisation d'eau.

8.5. MESURES À LA FIN DU TEST

À la fin de la période de 14 jours d'exposition, les groupes tests et témoins sont retirés de la chambre environnementale. Les individus présentant des comportements anormaux et le nombre d'individus morts dans chacun des replica sont notés et inscrits sur la feuille de travail.

Le pourcentage d'humidité et le pH sont également mesurés dans deux replica témoins et deux replica de test. La température de la chambre environnementale est également mesurée à la fin du test.

Un exemple de feuille de travail est fourni à l'annexe 2.

8.6. ESSAI AVEC UN TOXIQUE DE RÉFÉRENCE

L'utilisation d'un toxique de référence permet de déterminer la précision des analyses, de faire un suivi de la sensibilité des organismes vivants et de détecter éventuellement les séquences d'analyse hors contrôle. Le toxique de référence utilisé pour cette méthode est le chlorure de cadmium ($\text{CdCl}_2 \cdot 2\frac{1}{2}\text{ H}_2\text{O}$).

Les essais avec le toxique de référence doivent être effectués sur une base de un par mois ou à un rythme de un par essai ou série d'essais si la fréquence est inférieure à un par mois. Les résultats issus de ces tests sont compilés sous forme de diagramme de contrôle.

Des limites de contrôle inférieures (moyenne -2S et -3S) et supérieures (moyenne +2S et +3S) sont calculées et les résultats situés à l'extérieur de ces limites indiquent des problèmes potentiels dans le système d'essai. Au maximum, un essai sur 20 devrait se situer à l'extérieur des limites de $\pm 2\text{S}$ (seuil de probabilité de 95 %).

8.7. ACCEPTABILITÉ DES RÉSULTATS

Les résultats d'un test de toxicité sont acceptables si les conditions suivantes sont satisfaites :

- le pourcentage de mortalité observé dans les groupes témoins est inférieur ou égal à 10 %;

- les résultats obtenus avec le toxique de référence se situent à l'intérieur des limites de $\pm 2S$; tous les résultats se situant à l'extérieur des limites de $\pm 3S$ doivent être rejetés. Si le résultat se situe entre les limites de $-2S$ et $-3S$ ou $+2S$ et $+3S$, il peut, selon le cas, être acceptable. Une note doit toutefois être inscrite au rapport d'analyse afin de préciser la situation;
- les conditions d'essais (température, humidité, poids des individus, etc.) au cours du test ont été respectées.

9. CALCUL ET EXPRESSION DES RÉSULTATS

9.1. DÉTERMINATION DES CL_{50} 7J ET 14J

À la fin du test, calculer les pourcentages de mortalité par rapport au nombre total de vers de terre exposés pour chaque concentration.

Déterminer la CL_{50} 7j et 14j et leurs intervalles de confiance à 95 % à l'aide de la méthode de la moyenne mobile, de la méthode des probits ou de la méthode binomiale.

Dans les cas où le test ne génère aucune donnée partielle, le résultat est rapporté soit comme l'écart entre la concentration la plus élevée causant 0 % d'effet et la concentration la plus faible causant 100 % d'effet si une gamme de dilution étendue a été utilisée, soit comme la CL_{50} calculée par la méthode binomiale si une gamme de dilution plus serrée a été utilisée.

9.2. EXPRESSION DES RÉSULTATS

Les résultats sont exprimés en pourcentage de mortalité par rapport au témoin. La CL_{50} 7j et 14j et leurs intervalles de confiance à 95 % doivent être exprimés :

- en milligrammes par kilogramme de sol (mg/kg) dans le cas des substances chimiques dont on connaît la concentration de départ;
- en pourcentage poids/poids (% P/P) pour les échantillons de sol;
- en pourcentage volume/volume (% V/V) pour les lixiviats.

Pour les tests avec des échantillons non dilués, les résultats de mortalité s'expriment par rapport à celle observée dans le groupe témoin. Le test statistique t unilatéral de Student pour un seuil de confiance de 95 % est utilisé pour comparer les moyennes de mortalité obtenues dans chaque groupe.

10. BIBLIOGRAPHIE

- ASTM, Standard Guide for Conducting Laboratory Soil Toxicity or Bioaccumulation Tests with the Lumbricid Earthworm *Eisenia fetida*, Association of Standards and Testing Materials, ASTM E 1676-97, 1997.
- CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC, Lignes directrices concernant l'application des contrôles de la qualité en toxicologie, Programme d'accréditation des laboratoires d'analyse environnementale, DR-12-SCA-03, Ministère de l'Environnement du Québec, Édition courante.
- CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC, Protocole de lixiviation applicable aux tests biologiques, MA 500 – Lix. 1.0, Ministère de l'Environnement du Québec, Édition courante.
- EDWARDS, C.A., Earthworm Ecology, CRC Press, 400 p., 1997.
- ENVIRONMENT CANADA, Tests for Toxicity of Soil to Earthworms (*Eisenia andrei*, *Eisenia fetida*, or *Lumbricus terrestris*), Environmental Protection Series, Biological Test Methods, Draft, June 2001.
- ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA), Protocol for Short Term Toxicity Screening of Hazardous Wastes Sites, EPA/600/3-88/029 Environmental research laboratory, Corvallis, OR, 102 pages, 1988.
- GREIG-SMITH, P.W., H. BECKER, P.J. EDWARDS and F. HEIMBACH, Ecotoxicology of Earthworms, Intercept Ltd., 269 p., 1992.
- ISO, Qualité du sol – Effets des polluants vis-à-vis des vers de terre (*Eisenia fetida*) – Partie 1 : Détermination de la toxicité aiguë en utilisant des substrats de sol artificiel, Organisation internationale de normalisation, Norme internationale ISO 11268-1, 1993.
- LOKKE, H. and C.A.M. VAN GESTEL. Handbook of Soil Invertebrate Toxicity Tests, John Wiley & Sons, 281 p., 1998.
- McELROY, T.C. and W.J. DIEHL, Heterosis in Two Closely Related Species of Earthworm (*Eisenia fetida* and *E. andrei*), Heredity, 87: 598-608, 2001.
- OCDE, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, volume 1. Ver de terre, essais de toxicité aiguë - 207 Adoptée 1984, Organisation de coopération et de développement économique, 1993.
- ZAGURY, G.J., Y. DUDAL, J. BUREAU, C. BASTIEN and R. CHASSÉ, Sample Handling and Preparation for Estimation of Mobility, Bioavailability and Toxicity of Contaminated Soils, In Sunahara, G.I., A.Y. Renoux, C. Thellen, C.L. Gaudet and A. Pilon, ed. 2002, Environmental Analysis of Contaminated Sites – Toxicological Methods and approaches, John Wiley and Sons, 2002.

ANNEXE 1

MÉTHODE D'ÉLEVAGE DES VERS DE TERRE

Cultures mères

Eisenia andrei et *Eisenia fetida* sont maintenant considérés comme des espèces distinctes et les critères morphologiques d'apparence (couleur, taches et bandes transversales) sont insuffisants pour déterminer l'espèce de façon certaine. L'identification formelle exige la détermination du patron de polymorphisme de certaines enzymes par électrophorèse (McElroy et Diehl., 2001). La plupart des organismes utilisés actuellement dans les laboratoires Canadiens appartiendraient à l'espèce *Eisenia andrei* et auraient été faussement identifiées comme *Eisenia fetida*. Les organismes utilisés au CEAEQ appartiendraient également à l'espèce *Eisenia andrei*.

Boîtes d'élevage

Les vers de terre sont élevés dans des bacs de polyéthylène de 37,8 l recouverts d'une membrane de géotextile. De cette façon, des échanges gazeux appropriés sont maintenus tout en évitant que les vers puissent sortir de l'enceinte ou que les insectes envahissent les locaux. Un volume de 20 l (approx. 8 kg) de substrat de culture est utilisé pour chacun des bacs.

Substrat de culture

E. andrei est élevé dans la mousse de tourbe à un pH ajusté entre 7,0 et 8,0. Le substrat utilisé (worm bedding) provient de Carolina Biological Supply et le pH est de 7,4 et la conductivité de 150 µS/cm. La mousse de tourbe est hydratée avec environ 3 l d'eau déminéralisée par kg. Les excès d'humidité doivent être évités (la mousse ne doit pas laisser d'eau s'écouler si elle est pressée) ainsi que le dessèchement qui devient apparent par un changement de coloration en surface.

Conditions et entretien des cultures

Les cultures de vers de terre sont maintenues dans une chambre de croissance à la même température que celle utilisée pour les essais, soit 20 °C ± 2 °C. La perte d'humidité dans le temps est compensée par l'ajout d'environ 500 ml d'eau par bac par semaine. Deux fois par semaine, le substrat d'élevage doit être brassé afin d'en diminuer la compaction. Cette pratique permet d'augmenter la productivité de l'élevage et de réduire l'infestation par les collemboles et les mouches.

Le suivi de l'élevage est effectué comme suit dans les bacs actifs :

- température de l'incubateur (1 fois par semaine);
- contrôle de l'hydratation (1 fois par semaine);
- pH et conductivité du substrat (1 fois par mois);
- quantité de nourriture ajoutée (2 fois par semaine);
- poids moyen (mg) de 10 individus (1 fois par mois);

- état de la culture (apparence des vers, abondance, productivité, insectes, etc.) (1 fois par semaine).

Les bacs de culture peuvent contenir entre 1 000 et 1 500 vers et sont régénérés environ au trois mois. Après une telle période, la population de vers de terre devient trop importante et les individus ont tendance à sortir du milieu d'élevage et à s'accrocher au couvercle. Il peut également se développer une population importante de collembole. Au cours de la période de trois mois, le substrat de culture peut être renouvelé en partie et de façon progressive par l'ajout de nouvelle mousse de tourbe.

Les organismes sont nourris avec une moulée spécialement conçue pour l'élevage de vers de terre (Magic Worm Food, Magic Products Inc.). La moulée est légèrement enfouie dans le substrat de façon à éviter les moisissures et la quantité est ajustée en fonction de l'abondance d'individus et de la présence résiduelle de la ration précédente. Une ration équivalente à 200 ml de moulée sèche par bac deux fois par semaine est appropriée pour une population d'environ 1 200 vers de 200 à 400 mg.

Préparation de nouveaux bacs d'élevage

Une quantité de 20 l de mousse de tourbe est ajoutée dans un bac propre et est humidifiée de façon progressive par l'ajout d'environ 22,5 l d'eau déminéralisée. Le milieu est laissé à stabiliser pendant 24 heures et le pH et la conductivité sont mesurés. Le pH doit se situer dans l'intervalle entre 7,0 et 8,0. Une petite ration de nourriture est ajoutée et légèrement enfouie dans le substrat. Par la suite, un groupe de 50 à 100 cocons est ajouté à la surface du substrat. Après 3 ou 4 semaines, les jeunes vers devraient être visibles. De nouveaux bacs d'élevage peuvent également être préparés par l'ajout d'environ 20 adultes de plus de 300 mg et possédant un clitellum. Après un mois, les adultes sont retirés (de nombreux cocons devraient être visibles) et le développement des individus se poursuit pendant un deuxième mois. Au cours du troisième mois, le bac d'élevage est utilisé pour puiser des individus qui seront utilisés pour les essais de toxicité.

Organisme pour essais

Les vers adultes (âgés de plus de 2 mois et possédant un clitellum) pesant entre 250 et 700 mg et provenant d'une même culture sont utilisés pour les essais. Les vers morts et identifiables sont retirés et les juvéniles et adultes de plus de 700 mg sont laissés dans les boîtes de culture. Chaque test requiert entre 50 et 100 vers.

Critères de qualité

Les critères de qualité de l'élevage sont les suivants :

- faible mortalité
- apparence saine et mobilité des individus
- productivité (présence de cocons et de jeunes)
- consommation des rations alimentaires
- populations de collembole et de mouches maîtrisées

ANNEXE 2

N° labo : _____

N° dossier : _____

FEUILLE DE TRAVAIL LÉTALITÉ AVEC LE VER *EISENIA FETIDA*

Formulaire n° FO-09-01-BMS-138

Client : _____

Projet : _____

Identification : _____

Mode de conservation : _____

Traitement de l'échantillon : _____

Poids moyen et écart type des vers témoins au début du test (g) : _____

Volume de liquide utilisé : _____

Poids (g) utilisé par replica : _____

Date d'analyse et h : _____

| Physico-chimie de l'échantillon avant le test | % humidité et pH à la fin du test | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------------------------------------|-----------------------------------|-----|-------------|-----|--------|-----|-------------|-----|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
| | % humidité | | | | pH | | | | | | | | | | | | |
| | Témoin | | Échantillon | | Témoin | | Échantillon | | | | | | | | | | |
| | R-1 | R-2 | R-1 | R-2 | R-1 | R-2 | R-1 | R-2 | | | | | | | | | |
| Capacité de rétention max : _____ | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| % hum avant : _____ % hum. ajusté : _____ | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| pH : _____ Cond. ($\mu\text{S/cm}$) : _____ | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Texture : _____ | | | | | | | | | | | | | | | | | |

| Conc. échant. % V/V | Jour 7 | | | | | | | | Jour 14 | | | | | | | |
|---------------------|--------|---|---|---|---|------|-------|---|---------|---|---|---|---|------|-------|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | Tot. | Mort. | % | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | Tot. | Mort. | % |
| Témoin | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |

Suivi de la température de la salle de test

| Jour | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 |
|------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|
| T°C | | | | | | | | | | | | | | |

Tox. réf. CL₅₀ (LC 95 %) : _____

Date : _____

Commentaires : _____

Analyste : _____

