

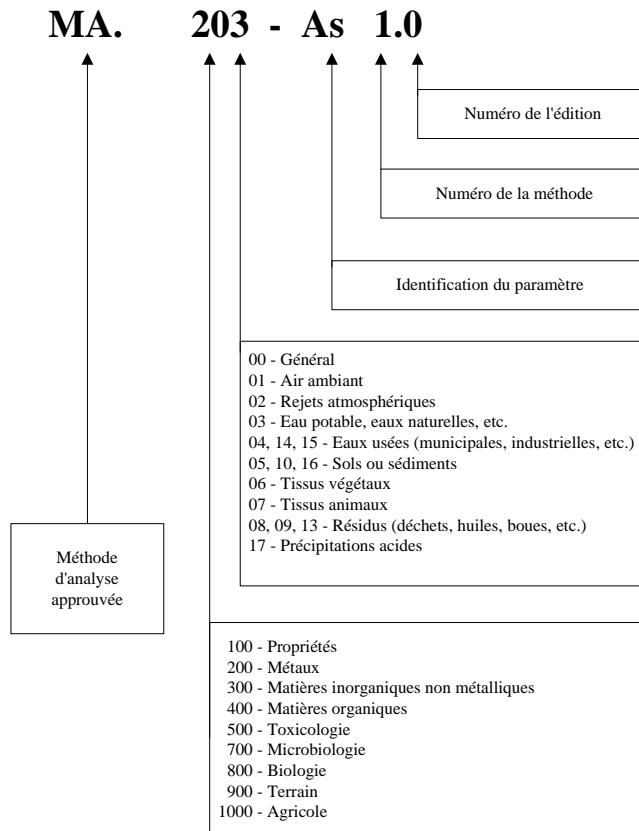
# Méthode d'analyse



## MA. 500 – VTL 1.0

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

## Exemple de numérotation :



La première édition d'une méthode est marquée de l'indice « 0 ». De façon usuelle, après quatre révisions successives, l'indice est augmenté de 1. Il peut également être élevé si une révision entraîne des modifications en profondeur de la méthode. La date de révision est suivie d'un chiffre qui indique le numéro de la révision en cours.

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), MA. 500 – VTL 1.0, Rév. 1, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs du Québec, 2012, 21 p.*

Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec  
2700, rue Einstein, bureau E.2.220  
Québec (Québec) G1P 3W8

Téléphone : 418 643-1301  
Télécopieur : 418 528-1091  
Courriel : ceaeq@mddep.gouv.qc.ca

© Gouvernement du Québec, 2012

## TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	5
1. DOMAINE D'APPLICATION	5
2. PRINCIPE ET THÉORIE	5
3. FIABILITÉ	5
3.1. Interférence	5
3.2. Fidélité	6
4. PRÉLEVEMENT ET CONSERVATION	6
4.1. Prélèvement	6
4.2. Conservation	7
5. RÉACTIFS	8
5.1. Toxique de référence	8
6. SOL TÉMOIN ET DE RÉFÉRENCE	8
6.2. Sol de référence	9
7. ORGANISME BIOLOGIQUE	9
7.1. Espèce	9
8. PROTOCOLE D'ANALYSE	10
8.1. Préparation des échantillons	10
8.2. Conditions du test	11
8.3. Schéma expérimental	12
8.4. Départ du test	13
8.5. Mesures à la fin du test	13
8.6. Essai avec un toxique de référence	14
8.7. Acceptabilité des résultats	14
9. CALCUL ET EXPRESSION DES RÉSULTATS	14
9.1. Détermination des CL <sub>50</sub> 14j	14
9.2. Expression des résultats	14
10. BIBLIOGRAPHIE	15
Annexe 1 - Méthode d'élevage des vers de terre	17
Annexe 2 - Feuille de travail	19
Annexe 3 - Suivi de l'élevage de vers de terre ( <i>Eisenia andrei</i> )	21



## 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 essais 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/DIS 11268-1, 2011 ; Env. Can., 2004), lesquels présentent de façon plus ou moins détaillée les mêmes exigences.

### 1. DOMAINE D'APPLICATION

Cet essai d'écotoxicité 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).

### 2. PRINCIPE ET THÉORIE

L'essai consiste à déterminer la concentration de l'échantillon qui cause la mortalité de 50 % des individus après 14 jours d'exposition (CL<sub>50</sub> 14j). Un sol artificiel est utilisé pour effectuer la gamme de dilution nécessaire à l'essai.

L'essai peut également être appliqué à un échantillon solide non dilué (test à concentration unique) et comparé à un groupe témoin.

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

### 3. FIABILITÉ

#### 3.1. INTERFÉRENCE

Les échantillons solides peuvent présenter des écarts importants par rapport à des conditions environnementales propices à la survie et la croissance des organismes d'essai et entraîner de fausses réponses positives. Des modifications apportées à l'échantillon peuvent être nécessaires et interférer avec l'équilibre physico-chimique des contaminants ou 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 l'essai 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.

Les sols argileux contenant un excès de fines particules entraînent une compaction et une augmentation de la densité du sol, laquelle peut être inappropriée aux essais. 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. 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 ( $n = 15$ ) obtenues avec l'acide borique a été de  $\pm 126$  mg/kg (CL<sub>50</sub> 14j moyenne = 2021 mg acide borique/kg et l'écart type = 277 mg acide borique/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. PRÉLÈVEMENT

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.

Une quantité de 1 à 2 kg de sol est requise pour l'analyse selon qu'il s'agit d'un essai avec ou sans dilution. Un contenant en polypropylène à large ouverture convient pour le prélèvement.

#### 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 essais de toxicité le plus rapidement possible après l'échantillonnage. La durée de conservation maximale pour les sols est de 45 jours. 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 toutefois 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 devraient être traités rapidement. Également, les sols ou déchets faisant l'objet de contamination ancienne susceptible d'être relativement stable peuvent tolérer une durée de conservation plus longue à 4 °C.

### 5. APPAREILLAGE ET FOURNITURES

- 5.1. Chambre environnementale à température, humidité et luminosité contrôlées
- 5.2. pH-mètre
- 5.3. Conductivimètre
- 5.4. Balance analytique ( $\pm 0,001\text{g}$ )
- 5.5. Tamiseur automatique avec tamis de 25, 75, 106, 250 et 300  $\mu\text{m}$
- 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<sup>®</sup>

## 6. RÉACTIFS

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

### 6.1. TOXIQUE DE RÉFÉRENCE

- Acide borique  $H_3BO_3$  (CAS n° 10043-35-3).

Une solution mère de 14,5 g/500 ml d'eau ultrapure est utilisée. Cette solution est préparée pour chaque série d'essais avec toxique de référence et n'est pas conservée.

## 7. SOL TÉMOIN ET DE RÉFÉRENCE

Le sol utilisé comme témoin est un sol artificiel de type loam sableux et a été mis au point au CEAEQ pour améliorer la représentativité en composition et en biodisponibilité des contaminants par rapport à un sol naturel.

Composition

- 70 % sable de silice grade 70 tamisé à 106-250  $\mu\text{m}$
- 22 % de limon (sable de silice grade 70 tamisé à 25-75  $\mu\text{m}$ )
- 5 % d'argile kaolinite
- 3 % terre noire (humus noir de *Sphagnum* sp.) tamisée à 4 mm
- acide citrique (0,20 – 0,25 %) pour ajustement du pH (CAS n° 77-92-9)

Un sol naturel non contaminé de type loam sableux peut également être utilisé en remplacement du sol artificiel. Toutefois, il doit être démontré que ce sol répond aux critères d'acceptabilité de l'essai, qu'il présente des caractéristiques physico-chimiques adéquates et qu'il ne contient pas de contamination.

### 7.1.1. Préparation

Déterminer le pourcentage d'humidité de la terre noire en pesant une fraction de 10 g, en faisant sécher à 70 °C pendant 48 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 20 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 25 µm. La fraction 106-250 µm est conservée comme la fraction sable et la fraction de 25 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 15 kg de sol en ajoutant les proportions suivantes et en mélangeant pendant 45 minutes :

- 10,5 kg de sable 106-250 µm
- 3,3 kg de limon 25-75 µm
- 750 g de kaolin
- 450 g de terre noire (équivalent sec) tamisée à 4 mm

Si le sol n'est pas utilisé immédiatement, le mélange sec doit être réhomogénéisé pour une durée de 15 minutes avant son utilisation car avec le temps d'entreposage une ségrégation granulométrique verticale peut se faire entraînant la fraction fine vers le fond du contenant.

Le pH du sol est déterminé en mélangeant 10 g de sol à 100 ml d'eau ultrapure (ratio 1 : 10). Si le pH est inférieur à 6,0 il doit être réajusté entre 6,0 et 6,5 à l'aide de carbonate de calcium (CaCO<sub>3</sub>) à une concentration d'environ 0,1 %. À noter que le pH du sol peut varier dans les jours suivant l'ajustement du taux d'humidité. Il faut laisser stabiliser le sol hydraté au moins cinq jours avant de procéder aux essais.

La capacité maximale de rétention en eau (cf. 9.1.1) a été déterminée à 36 % après quatre essais selon l'annexe C de la méthode ISO 11267.

## 7.2. SOL DE RÉFÉRENCE

L'utilisation d'un sol de référence similaire à celui du site d'échantillonnage 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. En l'absence de sol de référence adéquat, un sol artificiel de texture similaire au sol à l'étude peut être utilisé.

## 8. ORGANISME BIOLOGIQUE

### 8.1. 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 600 mg.

## 9. PROTOCOLE D'ANALYSE

### 9.1. PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

#### 9.1.1. Échantillons solides

Les échantillons solides doivent être bien homogénéisés et tamisés à 4 mm. Le pH et le pourcentage d'humidité doivent également être déterminés. Si le sol est détrempe, il doit être séché jusqu'à l'obtention du taux d'humidité désiré. Pour le sol artificiel utilisé dans ce protocole, l'humidité est ajustée à environ 80 % de la capacité de rétention.

La capacité maximale de rétention en eau est déterminée comme suit (ISO, 1999) :

- Boucher l'extrémité inférieure d'un verre Falcon® de 250 ml dont le fond est perforé d'un trou de 37 mm au centre avec un papier filtre Whatman #2 dont le diamètre est de 42,5 mm;
- Déposer 200 ml du sol à tester dans le verre et déposer le verre dans un bain-marie (ex : un plat à vaisselle) contenant de l'eau déminéralisée;
- Laisser le sol se saturer en eau jusqu'à ce que l'eau soit visible à la surface (2-3 h), retirer le verre et laisser le sol s'égoutter sur du papier essuie-tout de 1 à 2 h en prenant soin de couvrir le verre avec un couvercle Falcon® pour éviter la déshydratation.

Déterminer le taux d'humidité du sol égoutté (capacité de rétention) 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 environ 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 particulières 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. 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 CL<sub>50</sub> 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.

### 9.1.2. 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 ultrapure.

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, 2012).

## 9.2. CONDITIONS DU TEST

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

Espèce	<i>Eisenia andrei</i> 250-600 mg avec clitellum âgés d'au moins deux mois
Température d'incubation	20 °C ± 2 °C
Sol artificiel (loam sableux)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 70 % sable de silice (106-250 µm)</li> <li>• 22 % limon (25-75 µm)</li> <li>• 5 % kaolin</li> <li>• 3 % terre noire</li> <li>• pH : 6,0 – 6,5</li> </ul>
Hydratation et % humidité	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 80 % du taux maximal de rétention en eau</li> <li>• Hydratation au début du test et à 7 j si nécessaire.</li> </ul>
Luminosité	Photopériode 16 h/8 h lumière/obscurité 400 – 800 lux
Type de contenant de test	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Contenants de 500 ml en polyéthylène opaque pour réplikat de 10 vers</li> <li>• Contenants de 1000 ml en polyéthylène opaque pour réplikat de 20 vers</li> <li>• Couvercle transparent percé de petits trous</li> </ul>

Nombre de réplicats, nombre de vers et quantité de sol	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 3 réplicats de 10 vers/300 g sol sec pour test sans dilution (100 %)</li> <li>• 1 réplicat de 20 vers/600 g sol sec pour test avec relation concentrations/réponses</li> <li>• 200 g sec</li> </ul>
Durée du test	14 jours
Mesures physico-chimiques	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Au début du test : capacité de rétention en eau</li> <li>• % d'humidité, pH et conductivité pour les échantillons solides</li> <li>• Au début du test : pH, conductivité et oxygène dissous pour les échantillons de lixiviat</li> <li>• % humidité et pH dans quatre réplicats à la fin du test (2 pour l'échantillon et 2 pour le témoin)</li> <li>• Température de l'incubateur trois fois par semaine</li> </ul>
Mesures biologiques	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Poids moyen de 10 vers utilisés dans le témoin au début</li> <li>• Mortalité et comportements anormaux au temps 7 et 14 j</li> </ul>
Paramètres de mesure	<ul style="list-style-type: none"> <li>• % de mortalité par rapport au contrôle pour les tests à concentration unique</li> <li>• CL<sub>50</sub> 14 j pour les tests avec relation concentrations/réponses</li> </ul>
Statistiques	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Probit, moyenne mobile ou binomiale pour la CL<sub>50</sub></li> <li>• Test t unilatéral pour les tests à concentration unique</li> </ul>

### 9.3. 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 réplicats 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 réplicats 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.

#### 9.4. DÉPART DU TEST

Mesurer des quantités de 300 ou 600g sec (selon le cas) d'échantillon ou de sol artificiel et hydraté ces sols avec de l'eau déminéralisée tel qu'il est précisé plus haut. Déposer ensuite dans les contenants de tests et insérer les vers délicatement dans le sol de façon à obtenir un contact avec l'échantillon. Fermé le contenant à l'aide d'un couvercle de plastique transparent perforé de petits trous de façon à maintenir des échanges gazeux entre le sol et l'atmosphère.

Pour les essais sans dilution, 3 réplicats contenant chacun 10 vers sont utilisés, soit 30 vers pour l'échantillon non dilué et 30 vers pour le témoin. Le groupe témoin est composé de sol artificiel (cf. 7). Pour les essais 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. 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 essais avec détermination de la relation concentrations/réponses, un seul réplicat de 20 vers est utilisé. Un minimum de 5 concentrations est nécessaire pour permettre une détermination suffisamment précise des  $CL_{50}$  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 10 vers de terre d'un réplicat témoin est noté et la moyenne est calculée.

Les contenants de test sont déposés dans une chambre environnementale pour une période de 14 jours à une température de  $20\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ . En cours de test, la température doit être mesurée et notée trois fois par semaine. Le maintien du niveau d'humidité du sol est également vérifié par gravimétrie ou au toucher et réajuster s'il y a lieu à l'aide d'une vaporisation d'eau. Les individus morts et présents en surface sont retirés des contenants.

#### 9.5. MESURES À LA FIN DU TEST

À la fin de la période d'exposition de 14 jours, les groupes tests et témoins sont retirés de la chambre environnementale et les individus morts ou qui présentent des comportements anormaux sont dénombrés.

Le pourcentage d'humidité et le pH sont également mesurés dans un réplicat témoin et un réplicat 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.

## 9.6. 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 l'**acide borique ( $H_3BO_3$ )**.

Les essais avec le toxique de référence doivent être effectués **à une fréquence** de un par mois ou 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  $\pm 2S$  (seuil de probabilité de 95 %).

## 9.7. ACCEPTABILITÉ DES RÉSULTATS

Les résultats de l'essai 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 de l'essai ont été respectées.

## 10. CALCUL ET EXPRESSION DES RÉSULTATS

### 10.1. DÉTERMINATION DES $CL_{50}$ 14J

À la fin de l'essai, calculer les pourcentages de mortalité par rapport au nombre total d'organismes exposés dans chacune des concentrations.

Déterminer la  $CL_{50}$  14j et, **le cas échéant**, l'intervalle de confiance à 95 % à l'aide de la méthode **probit, Spearman Karber ou binomiale**.

### 10.2. EXPRESSION DES RÉSULTATS

Les résultats sont exprimés en pourcentage de mortalité par rapport au témoin. La  $CL_{50}$  14j et l'intervalle 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 essais avec des échantillons non dilués, les résultats sont exprimés par rapport aux groupes témoins. 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.

## 11. BIBLIOGRAPHIE

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, Rév. 1, Québec, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs, 2012, 22 p.

EDWARDS, C.A. *Earthworm Ecology*, CRC Press, 1997, 400 p.

ENVIRONNEMENT CANADA. *Méthode d'essai biologique : essai pour déterminer la toxicité de sols contaminés pour les vers de terre Eisenia andrei, Eisenia fetida ou Lumbriculus terrestris*, Section de l'élaboration et de l'application des méthodes, Ottawa, Publication SPE 1/RM/43, juin 2004.

ISO. *Qualité du sol – Inhibition de la reproduction de Collembola (Folsomia candida) par des polluants du sol*. Organisation internationale de normalisation, Norme internationale ISO 11267, 1999.

ISO. *Qualité du sol – Effets des polluants vis-à-vis des vers de terre – Partie 1 : Détermination de la toxicité aiguë vis à vis de Eisenia fetida/Eisenia andrei*, Organisation internationale de normalisation, Norme internationale ISO/DIS 11268-1, 2011.

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.

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 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 **et d'un couvercle perforé**. 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 entre **6,0** et **7,0**. Le substrat utilisé (worm bedding) provient de Carolina Biological Supply et le pH est **d'environ 6,8** et la conductivité de **235 µS/cm**. La mousse de tourbe est hydratée avec environ 3 l d'eau déminéralisée par kg. **De l'eau bouillante est utilisée de façon à éviter l'apparition de mouches et de collemboles**. 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 à la même température que celle utilisée pour les essais, soit  $20\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ . La perte d'humidité dans le temps est compensée par l'ajout d'environ **200 ml** d'eau par bac par semaine. **Une** 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 (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. 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 commerciale à base de grains broyés. Elle 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 6,0 et 7,0. 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 600 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 600 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 ANDREI*

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 réplicat : \_\_\_\_\_

Date d'analyse et h : \_\_\_\_\_

Physico-chimie de l'échantillon avant le test	% humidité et pH à la fin du test dans un réplicat témoin et un échantillon			
	% humidité		pH	
	Témoin	Échantillon	Témoin	Échantillon
Capacité de rétention en eau : _____				
% hum avant : _____ % hum. ajusté : _____				
pH : _____ Cond. ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) : _____				
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. CL<sub>50</sub> (LC 95 %) : \_\_\_\_\_

Date : \_\_\_\_\_

Commentaires : \_\_\_\_\_

Analyste : \_\_\_\_\_



### ANNEXE 3

## Suivi de l'élevage de vers de terre (*Eisenia andrei*)

Formulaire n° FO-09-01-BMS-145

N° culture : \_\_\_\_\_

Poids total de substrat : \_\_\_\_\_

Nb de vers ou de cocons au départ : V \_\_\_\_\_ C \_\_\_\_\_

Date de départ : \_\_\_\_\_

Date (semaine)	Quantité de nourriture (ml) (1/sem)	Temp. incubation (°C) (1/sem)	Quantité d'eau ajoutée (semaine)	pH (1/mois)	Conductivité ( $\mu$ S/cm) (1/mois)	Poids de 10 vers (1/mois)	Commentaires (apparence, productivité, abondance, insectes, etc.)