NORME INTERNATIONALE

ISO 15952

Deuxième édition
2018-06

Qualité du sol — Effets des polluants vis-à-vis des escargots juvéniles (Helicidae) — Détermination des effets sur la croissance par contamination du sol

Soil quality — Effects of pollutants on juvenile land snails (Helicidae) — Determination of the effects on growth by soil contamination

Numéro de référence
ISO 15952:2018(F)

© ISO 2018



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2018

Tous droits réservés. Sauf prescription différente ou nécessité dans le contexte de sa mise en oeuvre, aucune partie de cette publication ne peut être reproduite ni utilisée sous quelque forme que ce soit et par aucun procédé, électronique ou mécanique, y compris la photocopie, ou la diffusion sur l'internet ou sur un intranet, sans autorisation écrite préalable. Une autorisation peut être demandée à l'ISO à l'adresse ci-après ou au comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office
Case postale 401 • Ch. de Blandonnet 8
CH-1214 Vernier, Geneva
Tél.: +41 22 749 01 11
Fax: +41 22 749 09 47
E-mail: copyright@iso.org
Web: www.iso.org

Publié en Suisse

Sommaire

Page

Avant-propos ..... **iv**
Introduction ..... **v**
1 Domaine d'application **1**
2 Références normatives **1**
3 Termes et définitions **2**
4 Principe **3**
5 Environnement de l'essai **3**
6 Réactifs **4**
7 Appareillage **5**
8 Stockage et préparation des échantillons **6**
8.1 Sol à soumettre à essai 6
8.2 Déchets 6
9 Mode opératoire **6**
9.1 Préparation de l'essai 6
9.1.1 Sélection des concentrations à soumettre à essai 6
9.1.2 Préparation des mélanges d'essai 7
9.2 Répartition du mélange d'essai 8
9.3 Introduction de la nourriture 8
9.4 Introduction du réactif biologique 9
9.5 Manipulations pendant les essais 9
9.5.1 Généralités 9
9.5.2 Soins de routine 9
9.5.3 Tâche hebdomadaire 9
10 Substance de référence **10**
11 Calculs et expression des résultats **11**
11.1 Calculs 11
11.2 Expression des résultats 12
12 Validité de l'essai **14**
13 Rapport d'essai **14**
Annexe A (informative) **Méthode statique** **16**
Annexe B (informative) **Technique d'élevage des escargots** **17**
Annexe C (informative) **Exemple de composition de la nourriture pour escargots** **22**
Annexe D (informative) **Exemple de tableau de données** **23**
Annexe E (informative) **Exemple de résultats avec *Helix aspersa aspersa*** **24**
Annexe F (informative) **Détermination des effets sur la croissance par contamination de la nourriture** **28**
Annexe G (informative) **Autres espèces d'escargots adéquates** **32**
Bibliographie **33**

© ISO 2018 – Tous droits réservés

Avant-propos

L'ISO (Organisation internationale de normalisation) est une fédération mondiale d'organismes nationaux de normalisation (comités membres de l'ISO). L'élaboration des Normes internationales est en général confiée aux comités techniques de l'ISO. Chaque comité membre intéressé par une étude a le droit de faire partie du comité technique créé à cet effet. Les organisations internationales, gouvernementales et non gouvernementales, en liaison avec l'ISO participent également aux travaux. L'ISO collabore étroitement avec la Commission électrotechnique internationale (IEC) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les procédures utilisées pour élaborer le présent document et celles destinées à sa mise à jour sont décrites dans les Directives ISO/IEC, Partie 1. Il convient, en particulier de prendre note des différents critères d'approbation requis pour les différents types de documents ISO. Le présent document a été rédigé conformément aux règles de rédaction données dans les Directives ISO/IEC, Partie 2 (voir www.iso.org/directives).

L'attention est attirée sur le fait que certains des éléments du présent document peuvent faire l'objet de droits de propriété intellectuelle ou de droits analogues. L'ISO ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié de tels droits de propriété et averti de leur existence. Les détails concernant les références aux droits de propriété intellectuelle ou autres droits analogues identifiés lors de l'élaboration du document sont indiqués dans l'Introduction et/ou dans la liste des déclarations de brevets reçues par l'ISO (voir www.iso.org/brevets).

Les appellations commerciales éventuellement mentionnées dans le présent document sont données pour information, par souci de commodité, à l'intention des utilisateurs et ne sauraient constituer un engagement.

Pour une explication de la nature volontaire des normes, la signification des termes et expressions spécifiques de l'ISO liés à l'évaluation de la conformité, ou pour toute information au sujet de l'adhésion de l'ISO aux principes de l'Organisation mondiale du commerce (OMC) concernant les obstacles techniques au commerce (OTC), voir le lien suivant: www.iso.org/avant-propos.

Le présent document a été élaboré par le comité technique ISO/TC 190, *Qualité du sol*, sous-comité SC 4, *Caractérisation biologique*.

Cette deuxième édition annule et remplace la première édition (ISO 15952:2006), qui a fait l'objet d'une révision technique.

© ISO 2018 – Tous droits réservés

Introduction

En raison du nombre limité de données disponibles sur la toxicité des contaminants sur les organismes vivant dans le sol, l'écotoxicité des sols et des déchets sont très préoccupants tant au niveau national qu'au niveau international. Les essais actuellement disponibles utilisent les organismes de la faune du sol limités aux embranchements annélides (vers de terre et *Enchytraeidae*) et des arthropodes (insectes: Collemboles et Coléoptères). Parmi ces derniers, deux normes évaluent la toxicité aiguë (vers de terre (ISO 11268-1) et larves de coléoptères[6] et trois autres normes traitent des effets sublétaux des contaminants du sol sur la reproduction (vers de terre,[3] Collemboles,[2] *Enchytraeidae*[4]). Dans les cycles biologiques des organismes, il semble que la croissance est, tout comme la reproduction, un paramètre écophysiologique fondamental à prendre en considération pour la viabilité des espèces et des écosystèmes[38].

Les escargots sont des indicateurs écologiques pertinents pour l'évaluation de la qualité des sols (voir Références [16], [18] à [20], [32], [33], [40] à [42]), étant donné qu'ils sont caractéristiques de la couche superficielle du sol (saprophages et phytophages) et qu'une grande partie de leur cycle biologique a lieu dans le sol (ponte, éclosion, premiers stades du développement, hibernation, etc.).[7][18][29] Pendant les autres phases de leur cycle, ils ingèrent du sol et sont en contact avec celui-ci par l'intermédiaire de leur sole pédieuse humide (pied), recouverte de mucus, et participent aux échanges permanents avec le sol (eau, sels minéraux, excréments, puis finalement la coquille et la matière organique quand ils meurent).[7][18][31] De plus, ils représentent un lien important entre les plantes, la faune et les micro-organismes du sol. Ils répondent pleinement aux critères d'un bon indicateur biologique: faciles à collecter et à identifier, ils présentent une large répartition, ils accumulent les contaminants (voir Références [9], [11] à [15], [17], [18], [22], [24], [29], [30], [33] à [48]), leurs caractéristiques écologiques et physiologiques sont bien connues [7],[10],[32] et ils sont, à présent, faciles à élever dans des conditions contrôlées.[22] [26][32] Leur sensibilité aux contaminants courants dans leur environnement a été démontrée (voir Références [11] à [16], [19] à [28], [30], [33] à [38], [37] à [48]).

La présente Norme internationale décrit une méthode pour déterminer les effets sur la survie et la croissance des escargots juvéniles de substances, de préparations (c'est-à-dire un mélange ou une solution composé d'au moins deux substances), de sols ou de déchets ajoutés à un sol artificiel ou naturel. La méthode décrite est donc applicable aux essais de sols contaminés ou à la comparaison de différents sols non contaminés. L'espèce recommandée est *Helix aspersa aspersa* Müller (aussi communément appelée: escargot petit-gris, escargot de jardin, Petit-Gris; synonymes: *Cantareus aspersus, Cornu aspersum*[56]). Parmi les escargots terrestres (mollusques gastéropodes pulmonés stylommatophores de la famille *Helicidae*), *Helix aspersa aspersa* Müller est le plus répandu. Cette espèce paléarctique peut s'acclimater à des régions présentant des climats de types différents: méditerranéen, océanique tempéré, continental tempéré, voire tropical. *Helix aspersa aspersa* Müller est d'origine européenne et a été introduit dans le monde entier. Ces escargots se trouvent à présent sur tous les continents hormis l'Antarctique[10].

Dans leur environnement naturel, les escargots assimilent les contaminants par contact (avec des substrats variés tels que le sol, les lixiviats du sol et la litière végétale), par ingestion (de plantes et de sol), de même que par les voies respiratoires.[7][29] Ainsi, pour des objectifs particuliers (évaluation de la toxicité d'un pesticide, par exemple), une autre méthode d'essai basée sur l'exposition par ingestion d'aliments est disponible en option (Annexe F et Référence [6]).

© ISO 2018 – Tous droits réservés

Qualité du sol — Effets des polluants vis-à-vis des escargots juvéniles (Helicidae) — Détermination des effets sur la croissance par contamination du sol

1 Domaine d'application

Le présent document s'applique à une méthode semi-statique pour la détermination des effets de contaminants sur la croissance et la survie d'escargots juvéniles, généralement *Helix aspersa aspersa* Müller. Les animaux sont exposés par les voies cutanée et digestive à un substrat d'essai (sol artificiel ou naturel selon l'objectif de l'étude) auquel sont ajoutées des quantités définies:

— de substances, de mélanges ou de préparations;

— de sols (contaminés ou de qualité inconnue) ou de déchets.

Cet essai prend en considération les changements éventuels de la substance d'essai, de la préparation, du sol ou des déchets, étant donné que les mélanges d'essai sont préparés et renouvelés chaque semaine pendant la période d'essai de 28 jours.

Il est admis de mettre en œuvre une méthode statique en sus de la méthode semi-statique (facultatif). Cette méthode est décrite dans l'Annexe A.

Cette méthode ne s'applique pas aux substances dont le coefficient de partage air/sol est supérieur à 1, ou pour lesquelles la pression de vapeur est supérieure à 300 Pa à 25 °C.

2 Références normatives

Les documents suivants cités dans le texte constituent, pour tout ou partie de leur contenu, des exigences du présent document. Pour les références datées, seule l'édition citée s'applique. Pour les références non datées, la dernière édition du document de référence s'applique (y compris les éventuels amendements)

ISO 10390, *Qualité du sol — Détermination du pH*

ISO 18400-206, *Qualité du sol — Échantillonnage — Partie 206: Lignes directrices pour la collecte, la manipulation et la conservation de sols destinés à l'évaluation de paramètres biologiques fonctionnels et structurels en laboratoire*

ISO 10694, *Qualité du sol — Dosage du carbone organique et du carbone total après combustion sèche (analyse élémentaire)*

ISO 11268-1, *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*

ISO 11269-2:2012, *Qualité du sol — Détermination des effets des polluants sur la flore du sol — Partie 2: Effets des sols contaminés sur l'émergence et la croissance des végétaux supérieurs*

ISO 11274, *Qualité du sol — Détermination de la caractéristique de la rétention en eau — Méthodes de laboratoire*

ISO 11465, *Qualité du sol — Détermination de la teneur pondérale en matière sèche et en eau — Méthode gravimétrique*

EN 14735, *Caractérisation des déchets — Préparation des échantillons de déchets en vue d'essais écotoxicologiques*

© ISO 2018 – Tous droits réservés

3 Termes et définitions

Pour les besoins du présent document, les termes et définitions suivants s'appliquent.

L'ISO et l'IEC tiennent à jour des bases de données terminologiques destinées à être utilisées en normalisation, consultables aux adresses suivantes:

— IEC Electropedia: disponible à l'adresse http://www.electropedia.org/

— ISO Online browsing platform: disponible à l'adresse https://www.iso.org/obp

3.1
substrat d'essai
sol artificiel ou sol naturel utilisé comme témoin et comme substrat de dilution

3.2
matrice
sol ou déchet soumis à l'essai

3.3
mélange d'essai
mélange de la substance d'essai, de la préparation ou de la matrice avec le *substrat d'essai* (3.1)

3.4
croissance
<biomasse> augmentation de la biomasse, c'est-à-dire de la masse fraîche totale (corps et coquille) des organismes entre le début et la fin de l'essai

Note 1 à l'article: Elle s'exprime sous forme d'un coefficient de croissance $k_{CC,m}$.

3.5
croissance
<coquille> augmentation du diamètre maximal de la coquille entre le début et la fin de l'essai

Note 1 à l'article: Elle est exprimée sous forme d'un coefficient de croissance $k_{CC,d}$.

3.6
concentration efficace
CE*x*
concentration à laquelle est décelé un effet spécifique; *x* est le pourcentage (10, 25, 50) de cet effet, par exemple inhibition de la croissance

EXEMPLE CE_{50} est la concentration estimée pour réduire la croissance, à la fin de l'essai, de 50 % par rapport au témoin ($CE_{50,m}$ et $CE_{50,d}$ pour la croissance de la biomasse et de la coquille, respectivement).

3.7
concentration létale médiane
CL_{50}
concentration de la substance d'essai, de la préparation présente à l'origine ou concentration de la matrice entraînant la mort de 50 % des escargots soumis à l'essai

3.8
concentration minimale avec effet observé
CMEO
concentration la plus basse soumise à l'essai, à laquelle il est observé que la substance d'essai a un effet statistiquement significatif ($p < 0,05$) par rapport au témoin

Note 1 à l'article: Toutes les concentrations d'essai supérieures à la CMEO ont un effet nocif supérieur ou égal à ceux observés à la CMEO. Lorsqu'il n'est pas possible de satisfaire ces deux conditions, il convient d'expliquer dans le détail comment a été sélectionnée la CMEO (et par conséquent la CSEO).

© ISO 2018 – Tous droits réservés

3.9
concentration sans effet observable
CSEO
concentration de l'essai immédiatement inférieure à la CMEO, qui, lorsqu'elle est comparée à celle du témoin, ne produit aucun effet statistiquement significatif ($p > 0,05$) pendant un temps d'exposition donné

Note 1 à l'article: La CSEO est la concentration immédiatement inférieure à la CMEO.

Note 2 à l'article: Dans le cas de 3.6, 3.7, 3.8 et 3.9, les résultats sont exprimés:

— en masse sèche de la substance d'essai ou de la préparation par masse sèche du *substrat d'essai (3.1)*;

— en pourcentage de la masse de la matrice soumise à l'essai dans le mélange d'essai (exprimé en masse sèche).

4 Principe

Des escargots terrestres juvéniles (généralement *Helix aspersa aspersa* Müller) sont exposés pendant une période de 28 jours à des mélanges d'essai contenant la substance d'essai, la préparation ou la matrice à différentes concentrations. Les mélanges d'essai sont fraîchement préparés et renouvelés tous les 7 jours.

En fonction des objectifs de l'étude, les mélanges d'essai peuvent être préparés avec du sol artificiel (6.3.2) ou un sol naturel adapté (6.3.3).

Pendant l'essai, les escargots sont nourris avec un aliment non contaminé.

Les effets sur la croissance (biomasse et diamètre de la coquille) et sur la survie sont mesurés après 28 jours d'exposition (facultativement, les effets peuvent être mesurés tous les 7 jours pendant 28 jours).

Les résultats obtenus au cours de l'essai sont comparés avec ceux d'un témoin afin de déterminer la CSEO ou la CMEO et ils permettent d'estimer la concentration qui réduit la croissance des escargots de 50 % en l'espace de 28 jours par rapport à la masse fraîche [$CE_{50,m}$ (28 jours)] et au diamètre de la coquille [$CE_{50,d}$ (28 jours)] ou à d'autres valeurs de CE_x.

Si les concentrations sélectionnées provoquent des effets létaux, les résultats obtenus au cours de l'essai sont comparés à ceux d'un témoin et sont utilisés pour estimer la concentration qui entraîne la mort de 50 % des escargots [CL_{50} (28 jours)].

Dans des cas particuliers, il est possible de déterminer (facultatif) certains paramètres (CE_x, CSEO, CMEO, CL_{50}) après des périodes d'exposition inférieures à 28 jours (7 jours, 14 jours ou 21 jours).

L'essai comprend deux étapes:

— un essai préliminaire dont le but est de déterminer aussi bien la concentration sans effet observable (CSEO) que l'inhibition totale de la croissance. La relation dose/effet obtenue est importante pour la conception correcte de l'essai définitif;

— un essai définitif spécifiant les concentrations entraînant une inhibition de 10 % à 90 % de la croissance. Il n'est pas nécessaire d'effectuer un essai définitif lorsque l'essai préliminaire n'a pas révélé d'effets inhibiteurs à la concentration maximale soumise à essai.

5 Environnement de l'essai

L'essai doit être réalisé à une température de (20 ± 2) °C avec une photopériode jour-nuit de 18 h à 6 h. L'intensité lumineuse (lumière artificielle de type lumière du jour), sans lumière naturelle dans les récipients d'essai, doit être de 50 lx à 100 lx.

© ISO 2018 – Tous droits réservés