

LIGNE DIRECTRICE DE L'OCDE POUR LES ESSAIS DE PRODUITS CHIMIQUES

Essai de reproduction de collemboles dans le sol

INTRODUCTION

1. La présente Ligne directrice est destinée à évaluer les effets des substances chimiques sur la reproduction des collemboles dans le sol. Elle est fondée sur les procédures existantes (1) (2). *Folsomia candida*, qui se reproduit par parthénogénèse, et *Folsomia fimetaria*, dont la reproduction est sexuée, sont deux des espèces de collemboles les plus répandues, qu'il est possible d'élever et qui sont disponibles dans le commerce. Lorsque des habitats spécifiques où ni l'une ni l'autre de ces espèces ne sont présentes sont évalués, la procédure peut également être étendue à d'autres espèces de collemboles dès lors qu'elles peuvent satisfaire aux critères de validité de l'essai.

2. Les collemboles, qui peuplent les sols, sont des espèces écologiquement pertinentes pour les essais d'écotoxicité. Les collemboles sont des hexapodes possédant un exosquelette extrêmement perméable à l'air et à l'eau, et constituent des espèces d'arthropodes caractérisées par une autre voie et un autre taux d'exposition que les vers de terre et les enchytréides.

3. Les densités des populations de collemboles atteignent communément 10^5 m⁻² dans le sol et la litière feuillue dans beaucoup d'écosystèmes terrestres (3) (4). Les adultes mesurent généralement de 0.5 à 5 mm et leur contribution à la biomasse animale totale présente dans le sol et à la respiration totale du sol se situe d'après les estimations dans une fourchette de 1% à 5% (5). Ils pourraient donc jouer principalement le rôle de régulateurs potentiels des processus écologiques en s'alimentant de microorganismes comme au travers de la prédation de la microfaune. Les collemboles sont les prédateurs d'un vaste éventail d'invertébrés endogés et épigés, tels que les acariens, les millepattes, les araignées, les coléoptères carabidés et les staphylins. Les collemboles contribuent aux processus de décomposition dans les sols acides où ils peuvent être, avec les enchytréides, les principaux invertébrés présents dans le sol, puisque les vers de terre et les diplopodes en sont généralement absents.

4. *F. fimetaria* a une répartition mondiale et est commun dans plusieurs types de sols, depuis les sols sableux jusqu'aux sols limoneux et depuis les mulls jusqu'aux mors. C'est un collembole dépourvu d'yeux et de pigmentation. Il a été observé dans les sols agricoles de toute l'Europe (6). Il a un régime alimentaire omnivore composé de filaments de mycélium, de bactéries, de protozoaires et de détritiques. Il interagit au travers du broutage avec les infections imputables aux champignons pathogènes des végétaux (7) et pourrait exercer une influence sur les mycorhizes, à l'instar de *F. candida*, dont on sait que tel est le

cas. Comme la plupart des espèces de collemboles, il se reproduit sexuellement, aussi la présence permanente de mâles est-elle indispensable pour la fécondation des œufs.

5. *F. candida* a également une répartition mondiale. Bien qu'il soit commun dans la plupart des sols naturels, on le rencontre souvent en de très nombreux endroits riches en humus. C'est un collembole dépourvu d'yeux et de pigmentation. Doté d'une furca (organe de saut) bien développée, il court vivement et s'empresse de bondir s'il est dérangé. Le rôle écologique de *F. candida* est similaire à celui de *F. fimetaria*, mais ses habitats sont constitués de sols organiques plus riches. Il se reproduit par parthénogénèse. La proportion de mâles peut être inférieure à 1 pour mille.

PRINCIPE DE L'ESSAI

6. Des collemboles synchrones, adultes (*F. fimetaria*) ou juvéniles (*F. candida*), sont exposés à une gamme de concentrations du produit chimique testé mélangé à un sol artificiel OCDE modifié comportant une teneur en matières organiques de 5% (ou à un sol de remplacement) (8). On peut distinguer deux étapes dans la procédure d'essai :

- un essai préliminaire de détermination des concentrations, si des informations sur la toxicité manquent, dans lequel la mortalité et la reproduction sont les principaux paramètres évalués après 2 semaines pour *F. fimetaria* et 3 semaines pour *F. candida*
- l'essai de reproduction proprement dit dans lequel on évalue le nombre total de juvéniles produits par animal parent et la survie des animaux parents. La durée de l'essai proprement dit est de 3 semaines pour *F. fimetaria* ou de 4 semaines pour *F. candida*.

L'effet toxique du produit chimique testé sur la mortalité et le taux de reproduction des adultes est mesuré par les valeurs CL_x et CE_x , les données étant ajustées à un modèle approprié au moyen d'une régression non linéaire en vue d'estimer la concentration qui entraînerait x% de mortalité ou de réduction du taux de reproduction, respectivement, ou encore par celle de la CSEO/CMEO (9) (Voir l'annexe 1 pour les définitions).

INFORMATION SUR LE PRODUIT CHIMIQUE TESTÉ

7. Il est préférable de connaître les propriétés physiques, l'hydrosolubilité, le $\log K_{oe}$, le coefficient de partage entre l'eau et le sol et la pression de vapeur de la substance d'essai. Des informations supplémentaires sur le devenir du produit chimique testé dans le sol, notamment sa vitesse de photolyse, d'hydrolyse et de dégradation biotique, seraient souhaitables. L'identification chimique du produit chimique testé selon la nomenclature de l'IUPAC, le numéro CAS, le lot de fabrication, le lot de conditionnement, la formule structurale et le degré de pureté devraient également être consignés si ces informations sont disponibles.

8. Cette Ligne directrice convient à l'essai de substances hydrosolubles ou insolubles ; néanmoins, le mode d'application du produit chimique testé variera en conséquence. Cette Ligne directrice peut ne pas s'appliquer aux substances dont le coefficient de partage air/sol est supérieur à un, ou les substances dont la pression de vapeur dépasse 300 Pa à 25°C. D'autres facteurs tels que la forte solubilité dans l'eau ou une adsorption au sol élevée, limitant le potentiel de volatilisation, doivent être pris en compte dans la décision de conduire ou non l'essai. Pour les substances instables, volatiles ou facilement dégradables (par exemple

identifiées au moyen de données issues d'un essai selon la Ligne directrice 307), ou quand il existe par ailleurs une incertitude sur le maintien de la concentration nominale dans le sol, des mesures analytiques des concentrations d'exposition au début, en cours et en fin d'essai devraient être considérées.

9. Avant l'utilisation de cette Ligne directrice pour des essais sur les mélanges à des fins réglementaires, il faudra prendre en compte et justifier que les résultats générés fourniront des résultats appropriés à cette fin. De telles considérations ne sont pas nécessaires quand il existe une exigence réglementaire de tester le mélange.

VALIDITÉ DE L'ESSAI

10. Les témoins non traités devraient satisfaire aux critères suivants pour que le résultat de l'essai soit considéré comme valide:

- la mortalité moyenne des adultes n'excède pas 20% à la fin de l'essai;
- le nombre moyen de juvéniles par récipient est au moins égal à 100 à la fin de l'essai;
- le coefficient de variation calculé pour le nombre de juvéniles est inférieur à 30% à la fin de l'essai proprement dit.

SUBSTANCE DE RÉFÉRENCE

11. Une substance de référence est testée à sa concentration efficace à 50% (CE₅₀) pour le type de sol d'essai choisi, soit à intervalles réguliers, soit dans tous les essais, afin de vérifier que la réponse des organismes d'essai dans le système expérimental demeure de niveau normal. L'acide borique, qui devrait réduire de 50% la reproduction de l'une et l'autre espèces (10) (11) à environ 100 mg/kg de sol en poids sec, est une substance de référence appropriée.

DESCRIPTION DE L'ESSAI

Récipients expérimentaux et matériel

12. Les récipients expérimentaux peuvent contenir 30 g de sol (en poids sec). Le matériau est constitué de verre ou de plastique inerte (non toxique). Cependant, l'utilisation de récipients en plastique est évitée si l'exposition au produit chimique testé est diminuée du fait de la sorption. Les récipients expérimentaux ont une surface horizontale telle qu'ils puissent contenir des échantillons de sol d'une profondeur effective de 2 à 4 cm. Les récipients sont munis de couvercles (en verre ou en polyéthylène, par exemple) afin de réduire l'évaporation de l'eau, tout en autorisant les échanges gazeux entre le sol et l'atmosphère. Les récipients sont au moins partiellement transparents afin de permettre le passage de la lumière.

13. Cet essai requiert du matériel de laboratoire courant, en particulier:

- armoire à séchage;
- stéréomicroscope;
- pH-mètre et luxmètre;
- balances suffisamment précises;
- instruments appropriés permettant de réguler la température;
- instruments permettant de contrôler l'humidité de l'air (facultatifs si les récipients expérimentaux sont fermés par des couvercles);
- incubateur ou petite chambre à température contrôlée;
- pinces ou appareil d'aspiration de faible puissance.

Préparation du sol artificiel

14. Un sol artificiel OCDE modifié contenant 5% de matière organique est utilisé pour l'essai (8). Un sol naturel peut également être utilisé, étant donné que le sol artificiel ne ressemble pas aux sols naturels. La composition recommandée du sol artificiel est la suivante (en poids secs, séchés à 105° C jusqu'à obtention d'un poids constant):

- 5% de tourbe à sphaigne, séchée à l'air et finement broyée (une dimension des particules de 2 +/- 1 mm est acceptable);
- 20% d'argile kaolinique (taux de kaolinite de préférence supérieur à 30%);
- environ 74% de sable industriel séché à l'air (selon la quantité de CaCO₃ nécessaire), essentiellement du sable fin contenant plus de 50% de particules mesurant entre 50 et 200 microns. La quantité exacte de sable dépend de la quantité de CaCO₃ (voir ci-dessous), la part conjointe de ces deux éléments devant atteindre 75%;
- < 1.0% de carbonate de calcium (CaCO₃, pulvérisé, qualité analytique) afin d'obtenir un pH de 6.0 ± 0.5; la quantité de carbonate de calcium à ajouter dépend principalement de la qualité et de la nature de la tourbe (voir note 1).

Note 1 : La quantité de CaCO₃ requise dépend des composants du substrat de sol et est déterminée par mesure du pH des sous-échantillons de sol humide préincubé immédiatement avant l'essai.

Note 2 : Il est recommandé de mesurer le pH et de manière facultative le rapport C/N, la capacité d'échange de cations (CEC) et la teneur en matières organiques du sol en vue de permettre une normalisation ultérieure et une meilleure interprétation des résultats.

Note 3 : Si besoin est, par exemple à des fins d'essai spécifiques, des sols naturels provenant de sites non pollués peuvent également servir de substrat d'essai et/ou de culture. Toutefois, lorsque l'on utilise un sol naturel, il faut le caractériser au moins par son origine (site de récolte), son pH, sa texture (distribution de tailles de particules) sa CEC et sa teneur en matières organiques, et il doit être exempt de toute contamination. Pour ce qui est des sols naturels, il convient de démontrer qu'ils sont adaptés à la réalisation d'un essai et qu'ils permettent de répondre aux critères de validité de l'essai.

15. Les constituants secs du sol sont soigneusement mélangés (par exemple, dans un grand mélangeur de laboratoire). La capacité de rétention d'eau (CRE) maximale du sol artificiel est déterminée conformément aux protocoles décrits dans l'annexe 5. La teneur en humidité du sol d'essai est optimisée de sorte à lui donner une structure meuble et poreuse qui permette aux collemboles de pénétrer dans les pores. Tel est généralement le cas entre 40 et 60% de la capacité maximale de rétention d'eau.

16. Le sol artificiel sec est préhumidifié par l'ajout d'une quantité suffisante d'eau désionisée pour atteindre environ la moitié de sa teneur en eau finale 2 à 7 jours avant le début de l'essai, pour que l'acidité s'équilibre/se stabilise. Le pH est déterminé avec un mélange de sol et d'une solution de chlorure de potassium (KCl) 1 M ou de chlorure de calcium (CaCl₂) 0.01 M dans un rapport 1/5 (voir annexe 6). Si l'acidité du sol est supérieure à la limite requise, elle peut être ajustée par addition d'une quantité appropriée de CaCO₃. Si le sol est trop alcalin, il peut être rééquilibré par l'ajout d'un acide inorganique sans danger pour les collemboles.

17. Le sol préhumidifié est divisé en autant de portions que de concentrations expérimentales, de témoins et de substances de référence utilisés dans l'essai. Les composés d'essai sont ajoutés et la teneur en eau est régulée comme indiqué au paragraphe 24.

Sélection et préparation des animaux d'essai

18. *F. candida*, qui est parthénogénétique, est l'espèce recommandée parce que dans l'essai circulaire de la méthode (11), le critère de validité relatif à la survie a été rempli plus souvent avec cette espèce qu'avec *F. fimetaria*. Si une espèce alternative est utilisée, il faut qu'elle remplisse les critères de validité mentionnés au paragraphe 9. Au début de l'essai les animaux sont bien nourris et âgés de 23 à 26 jours dans le cas de *F. fimetaria* et de 9 à 12 jours dans celui de *F. candida*. Pour chaque expérience identique, le nombre de *F. fimetaria* est de 10 mâles et 10 femelles, et pour ce qui est de *F. candida* 10 femelles sont utilisées (voir Annexes 2 et 3). Pour chacun des lots ajoutés à une expérience identique, les animaux synchrones sont tirés au hasard des récipients et leur état de santé et leur condition physique sont contrôlés. Chaque groupe de 10/20 individus est ajouté à un récipient d'essai choisi au hasard et de grosses femelles de *F. fimetaria* sont sélectionnées de sorte qu'elles puissent être aisément distinguées des *F. fimetaria* mâles.

Préparation des concentrations expérimentales

19. Quatre méthodes d'application du produit chimique testé peuvent être utilisées : 1) mélanger le produit chimique testé au sol en utilisant de l'eau en guise de support, 2) mélanger le produit chimique testé au sol en utilisant un solvant organique en guise de support, 3) mélanger le produit chimique testé au sol en utilisant du sable en guise de support, ou 4) appliquer le produit chimique testé à la surface du sol. Le choix de la méthode appropriée dépend des caractéristiques du composé et de la finalité de l'essai. On recommande, en général, de mélanger le produit chimique testé au sol. Des modes d'application conformes à l'utilisation concrète du produit chimique testé pourraient cependant s'imposer (par exemple, la pulvérisation de préparations liquides ou l'utilisation de présentations spéciales de pesticides telles que les granulés ou les produits de traitement des semences). Le sol est traité avant l'ajout des collemboles, qu'il convient de laisser s'enfoncer dans le sol, sauf si le composé d'essai est appliqué à la surface de celui-ci.

Produit chimique testé hydrosoluble

20. Une solution du produit chimique testé dans de l'eau désionisée est préparée en une quantité suffisante pour toutes les expériences identiques d'une concentration expérimentale. Chaque solution du produit chimique testé est soigneusement mélangée à un lot du sol préhumidifié, avant d'être introduite dans le récipient expérimental.

Produit chimique testé insoluble dans l'eau

21. Les substances non solubles dans l'eau mais solubles dans des solvants organiques peuvent être dissoutes dans le plus petit volume possible d'un solvant approprié (par exemple de l'acétone) permettant néanmoins un bon mélange de la substance chimique dans le sol ainsi que son mélange avec une partie du sable quartzique requis. Seuls des solvants volatils peuvent être utilisés. Lorsqu'un solvant organique est utilisé, toutes les concentrations expérimentales et un témoin négatif de solvant supplémentaire contiennent la même quantité minimale de solvant. Les récipients où est effectuée l'application sont laissés sans couvercle pendant un certain temps afin de permettre au solvant associé à l'application du produit chimique testé de s'évaporer, en veillant à ce qu'aucune dissipation du composé toxique ne se produise pendant ce temps.

Produit chimique testé peu soluble dans l'eau et les solvants organiques

22. Pour les substances peu solubles dans l'eau et les solvants organiques, on mélange du sable quartzique, qui doit faire partie du volume total de sable ajouté au sol, à la quantité de produit chimique testé nécessaire pour obtenir la concentration expérimentale voulue. Ce mélange de sable quartzique et de produit chimique testé est ajouté au sol préhumidifié, auquel il est soigneusement mélangé après l'ajout de la quantité d'eau désionisée nécessaire pour atteindre l'humidité requise. Le mélange final est réparti entre les récipients expérimentaux. On répète la procédure pour chaque concentration expérimentale et on prépare un témoin approprié.

Application du produit chimique testé à la surface du sol

23. Si le produit chimique testé est un pesticide, il peut être pertinent de l'appliquer à la surface du sol par pulvérisation. Le sol est traité après l'ajout des collemboles. Les récipients expérimentaux sont d'abord remplis avec le substrat de sol humidifié, puis les animaux sont ajoutés et les récipients expérimentaux sont ensuite pesés. Afin d'éviter toute exposition directe des animaux par contact direct avec le produit chimique testé, celle-ci est appliquée au moins une demi-heure après l'introduction des collemboles. Le produit chimique testé devrait être réparti à la surface du sol de façon aussi régulière que possible, à l'aide d'un épandeur de laboratoire apte à simuler la pulvérisation sur un champ. L'application devrait avoir lieu à une température de $\pm 2^{\circ}\text{C}$ et, s'agissant de solutions aqueuses, d'émulsions ou de dispersions à une densité conforme aux recommandations d'évaluation des risques. Il convient de vérifier le taux à l'aide d'une technique d'étalonnage appropriée. L'application des présentations spéciales, telles que les granulés ou les produits de traitement des semences, pourrait reproduire leur mode d'emploi en agriculture. La nourriture est ajoutée après la pulvérisation.

MODE OPÉRATOIRE*Conditions expérimentales*

24. L'essai est conduit à une température moyenne de $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$, dans une fourchette de températures de $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$. L'essai est mené sous des cycles réglés de lumière et d'obscurité (de préférence 16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité), avec un éclairage de 400 à 800 lux dans la zone des récipients expérimentaux.

25. Pour vérifier l'humidité du sol, on pèse les récipients au début, au milieu et à la fin de l'essai. Toute perte de poids $> 2\%$ est compensée par l'ajout d'eau désionisée. Remarquons que la perte d'eau peut être réduite par le maintien d'un taux d'humidité de l'air élevé ($> 80\%$) dans l'incubateur.

26. Le pH est mesuré au début et à la fin de l'essai préliminaire de détermination des concentrations et de l'essai proprement dit. Des mesures devraient être effectuées sur un échantillon supplémentaire témoin et un échantillon supplémentaire de sol traité (à toutes les concentrations), préparés et entretenus de la même manière que les cultures expérimentales, mais sans ajout des collemboles.

Procédure d'essai et mesures

27. Pour chaque concentration expérimentale, une quantité de sol d'essai correspondant à 30 g de poids sec est placée à l'intérieur du récipient expérimental. On prépare également des témoins d'eau sans produit chimique testé. Si la substance d'essai est appliquée à l'aide d'un véhicule, une série de témoins

contenant uniquement le véhicule devrait être mis à l'essai parallèlement à la série traitée avec la substance d'essai. La concentration du solvant ou du dispersant devrait être identique à celle utilisée dans les récipients expérimentaux contenant la substance d'essai.

28. Les collemboles sont transférés avec soin dans les différents récipients expérimentaux (entre lesquels ils sont répartis aléatoirement) et placés à la surface du sol. Pour assurer un transfert efficace des animaux, un appareil d'aspiration de faible puissance peut être utilisé. Le nombre d'expériences identiques pour les concentrations expérimentales et les témoins dépend de la conception de l'essai. Les récipients expérimentaux sont placés au hasard dans l'incubateur et leurs emplacements sont modifiés au hasard chaque semaine.

29. Pour l'essai avec *F. fimetaria*, 20 adultes, 10 mâles et 10 femelles, âgés de 23 à 26 jours sont utilisés par récipient expérimental. Au 21^{ème} jour, les collemboles sont extraits du sol et comptés. Dans le cas de *F. fimetaria*, le sexe des animaux synchronisés composant le lot utilisé pour l'essai est déterminé en fonction de leur taille. Les femelles sont en effet nettement plus grosses que les mâles (voir annexe 2).

30. Pour l'essai avec *F. candida*, 10 juvéniles de 9 à 12 jours par récipient expérimental sont utilisés. Au 28^{ème} jour, les collemboles sont extraits du sol et comptés.

31. Une source de nourriture appropriée constituée d'une quantité suffisante, de 2 à 10 mg par exemple, de levure de boulanger sèche en granulés, disponible dans le commerce pour un usage ménager, est ajoutée à chaque récipient au début de l'essai puis après 2 semaines environ.

32. À la fin de l'essai, la mortalité et la reproduction sont évaluées. Après 3 semaines (*F. fimetaria*) et 4 semaines (*F. candida*), les collemboles sont extraits du sol d'essai (voir annexe 3) et comptés (12). À la fin de l'essai, les adultes et les juvéniles sont euthanasiés de façon humaine, préférablement par congélation rapide à -80°C ou par cryopréservation. Un collembole est consigné comme mort s'il n'est pas présent lors de l'extraction. La méthode d'extraction et de comptage est validée. Sa validité implique une efficacité d'extraction des juvéniles supérieures à 95%, et peut par exemple être vérifiée par l'ajout d'un nombre connu d'individus au sol.

33. Le déroulement concret de la procédure d'essai et son calendrier sont décrits dans l'Annexe 2.

Plan de l'essai

Essai préliminaire de détermination des concentrations

34. Si nécessaire, un essai préliminaire de détermination des concentrations est mené avec, par exemple, cinq concentrations expérimentales: 0,1, 1,0, 10, 100 et 1 000 mg/kg de masse sèche de sol. Deux expériences identiques par concentration et par témoin sont par ailleurs effectuées. Des informations supplémentaires, provenant d'essais avec des composés similaires ou tirées d'études déjà publiées, sur la mortalité ou la reproduction des collemboles peuvent également être utiles pour décider de la gamme de concentrations à utiliser dans l'essai préliminaire de détermination des concentrations.

35. La durée de l'essai préliminaire de détermination des concentrations est de deux semaines pour *F. fimetaria* et de 3 semaines pour *F. candida* afin de garantir que des juvéniles auront été produits. À la

fin de l'essai, la mortalité et la reproduction des collemboles sont évaluées. Le nombre d'adultes et celui de juvéniles sont consignés.

Essai proprement dit

36. Pour déterminer la CE_x (par exemple CE_{10} , CE_{50}), il faut tester douze concentrations. Au minimum deux expériences identiques par concentration d'essai plus six témoins identiques sont recommandés. Le facteur d'espacement peut varier en fonction de la relation dose-réponse.

37. Pour déterminer la CSEO/CMEO, il faut tester au moins cinq concentrations formant une série géométrique. Quatre expériences identiques par concentration d'essai plus huit témoins sont recommandées. Les concentrations sont espacées d'un facteur d'au plus 1.8.

38. Une démarche combinée permet de déterminer à la fois la CSEO/CMEO et la CE_x . On utilise à cet effet huit concentrations formant une série géométrique. Quatre expériences identiques par concentration d'essai plus huit témoins sont recommandées. Les concentrations sont espacées d'un facteur d'au plus 1.8.

39. Si aucun effet n'est observé à la plus forte concentration lors de l'essai préliminaire de détermination des concentrations (1 000 mg/kg), l'essai de reproduction peut devoir être conduit comme un essai limite, avec une concentration expérimentale de 1 000 mg/kg plus le témoin. Un essai limite permettra de démontrer l'absence d'effet statistiquement significatif à la concentration limite. Il faut alors utiliser huit expériences identiques pour le sol traité et pour le témoin.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Traitement des résultats

40. Le taux de reproduction est le principal paramètre à évaluer (par exemple le nombre de juvéniles produits par récipient expérimental). L'analyse statistique, à l'aide par exemple des procédures d'analyse de la variance (ANOVA), compare les différentes concentrations au moyen du test t de Student, du test de Dunnett, ou du test de Williams. Les intervalles de confiance à 95% sont calculés pour les moyennes établies aux différentes concentrations.

41. Le nombre d'adultes survivants dans les témoins non traités est un critère de validité essentiel qui est détaillé. Comme dans l'essai préliminaire de détermination des concentrations, tous les autres signes de nocivité sont également consignés dans le rapport final.

CL_x et CE_x

42. On calcule les valeurs de CE_x et leurs limites de confiance à 95% supérieures et inférieures correspondant au paramètre, en utilisant des méthodes statistiques adéquates (fonction logistique ou de Weibull, méthode abrégée de Spearman-Kärber, ou interpolation simple, par exemple). Une CE_x est obtenue en intégrant une valeur correspondant à x% de la moyenne du témoin dans l'équation retenue. Pour calculer la CE_{50} ou toute autre CE_x , la série de données complète est soumise à une analyse de régression. La CL_{50} est généralement estimée par analyse des probits ou par des méthodes d'analyse similaires prenant en compte les données sur la mortalité, qui suivent une distribution binomiale.

CSEO/CMEO

43. Lorsqu'une analyse statistique est appliquée pour déterminer la CSEO ou la CMEO, il faut disposer de statistiques par récipient (chaque récipient individuel étant considéré comme une expérience distincte). Il convient alors d'utiliser des méthodes statistiques adéquates conformément au Document 54 de l'OCDE intitulé *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application* (9). En général, les effets indésirables de la substance d'essai par rapport au témoin sont étudiés en procédant à une vérification de l'hypothèse unilatérale (plus faible) pour $p \leq 0.05$.

44. « La distribution normale et l'homogénéité de la variance peuvent être vérifiées à l'aide d'un test statistique approprié, tel que le test de Shapiro-Wilk et le test de Levene, respectivement ($p \leq 0.05$). » Une analyse de la variance à un facteur (ANOVA), puis des tests multi-comparaisons peuvent être effectués. Des tests de comparaisons multiples (test de Dunnett, par exemple) ou des tests d'analyse de tendance descendante (tel que le test de William) peuvent permettre de calculer d'éventuelles différences significatives ($p \leq 0.05$) entre les témoins et les diverses concentrations de produit chimique testé (on choisira le test recommandé conformément au Document 54 de l'OCDE (9)). On peut toutefois utiliser des méthodes non paramétriques (tels que le test U de Bonferroni conformément à Holm ou le test de tendance de Jonckheere-Terpstra) pour déterminer la CSEO et la CMEO.

Essai limite

45. Si un essai limite a été mis en œuvre (comparaison du témoin et d'un seul traitement) et que les conditions requises pour les procédures de tests paramétriques (normalité, homogénéité) sont remplies, on peut évaluer les réponses métriques par le test de Student (test t). Le test t de variance inégale (test t de Welch) ou bien un test non paramétrique tel que le test U de Mann-Whitney peuvent être employés lorsque ces conditions ne sont pas satisfaites.

46. Si l'on cherche à déterminer des différences significatives entre les témoins (témoin et témoin de solvant), les répliques de chaque témoin peuvent être testées comme décrit pour l'essai limite. Lorsque les essais ne détectent aucune différence significative, il est possible de rassembler toutes les expériences identiques témoins et témoins de solvant. Dans le cas contraire, il faut comparer tous les traitements avec le témoin de solvant.

Rapport d'essai

47. Le rapport d'essai comprend au moins les informations suivantes:

Produit chimique testé : nature physique et propriétés physico-chimiques pertinentes :

Données d'identification chimique;

- Substance mono-constituant :

apparence physique, hydro-solubilité et autres propriétés physico-chimiques pertinentes ;

identification chimique, telle que désignation(s) IUPAC ou CAS, numéro CAS, code SMILES ou InChI, formule structurale, pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc. (y compris la teneur en carbone organique, si cela se justifie).

- Substance multi-constituants, UVBC et mélanges :

caractérisés autant que possible par l'identité chimique (voir ci-dessus), la teneur et les propriétés physico-chimiques pertinentes des constituants.

Organisme d'essai

- identification des espèces et fournisseur des organismes d'essai, description des conditions d'élevage et fourchettes d'âges des organismes d'essai;

Conditions expérimentales

- description du plan de l'étude et du mode opératoire;
- détails sur la préparation du sol d'essai; description détaillée lorsque l'on utilise un sol naturel (origine, histoire, distribution de tailles de particules, pH, teneur en matières organiques);
- capacité de rétention d'eau du sol;
- description de la méthode d'application du produit chimique testé dans le sol;
- conditions expérimentales : intensité lumineuse, durée des cycles de lumière et d'obscurité, température;
- description du régime d'administration de la nourriture, nature et quantité de nourriture fournie au cours de l'essai, dates d'alimentation;
- pH et teneur en eau du sol au début et à la fin de l'essai (pour le témoin et chacune des concentrations);
- description détaillée de la méthode d'extraction et de l'efficacité d'extraction;

Résultats de l'essai

- nombre de juvéniles déterminés dans chaque récipient expérimental à la fin de l'essai;
- nombre et mortalité des adultes (%) dans chaque récipient expérimental à la fin de l'essai;
- description des effets physiologiques évidents ou des symptômes pathologiques ou des changements nets de comportement;
- résultats obtenus avec la substance de référence;
- valeurs de la CSEO/CMEO, des CL_x pour la mortalité et des CE_x pour la reproduction (principalement les CL_{50} , CL_{10} , CE_{50} et CE_{10}) et intervalles de confiance à 95%; graphique du modèle ajusté utilisé pour effectuer le calcul, équation de la fonction correspondante, ainsi que ses paramètres (9);
- toutes les informations et observations utiles à l'interprétation des résultats;
- puissance du test effectivement réalisé s'il est procédé à une vérification de l'hypothèse formulée (9);
- écarts par rapport aux procédures décrites dans la présente Ligne directrice et faits inhabituels survenus au cours de l'essai;
- validité de l'essai;
- en cas d'estimation de la CSEO, différence minimale détectable.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) Wiles JA et Krogh PH (1998) Testing with the collembolans *I. viridis*, *F. candida* and *F. fimetaria*. In Handbook of soil invertebrate toxicity tests (dir. de pub. H Løkke et CAM Van Gestel), pp. 131-156. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester.
- (2) ISO (2014) Soil Quality - Effects of soil pollutants on Collembola (*Folsomia candida*): Method for determination of effects on reproduction. N° 11267. Organisation internationale de normalisation, Genève.
- (3) Burges A et Raw F (Eds) (1967) Soil Biology. Academic Press. Londres.
- (4) Petersen H et Luxton M (1982) A comparative analysis of soil fauna populations and their role in decomposition processes. *Oikos* 39, 287-388.
- (5) Petersen H (1994) A review of collembolan ecology in ecosystem context. *Acta Zoologica Fennica* 195: 111-118.
- (6) Hopkin SP (1997). *Biology of the Springtails (Insecta : Collembola)*. Oxford University Press. 330pp (ISBN 0-19-854084-1)
- (7) Ulber B (1983) Einfluss von *Onychirurus fimatus* Gisin (Collembola, Onychiuridae) und *Folsomia fimetaria* L. (Collembola, Isotomidae) auf *Pythium ultimum* Trow. einen Erreger des Wurzelbrandes der Zuckerrübe. In New trends in soil Biology (Lebrun Ph, André HM, De Medts A, Grégoire-Wibo, Wauthy G (dir. de pub.), Actes du VI^{ème} colloque international sur la zoologie du sol, Louvain-la-neuve (Belgique), 30 août – 2 septembre 1982, I Dieu-Brichart, Ottignies-Louvain-la-Neuve, pp. 261-268.
- (8) OCDE (2006), *Essai de reproduction d'un acarien prédateur (Hypoaspis (Geolaelaps) Aculeifer) dans le sol*; Ligne directrice N° 226, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, OECD, Paris
- (9) OCDE (2006), *Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application*, Série de l'OCDE sur les essais et évaluations, Numéro 54, [ENV/JM/MONO\(2006\)18](#), OCDE, Paris
- (10) Scott-Fordsmand JJ et Krogh PH (2005) Background report on prevalidation of an OECD springtail test guideline. Environmental Project Nr. 986. Miljøstyrelsen 61 pp. Ministère danois de l'environnement.

- (11) Krogh, P.H., 2009. Toxicity testing with the collembolans *Folsomia fimetaria* and *Folsomia candida* and the results of a ringtest. Agence danoise pour la protection de l'environnement, Environmental Project No. 1256, pp. 66.
- (12) Krogh PH, Johansen K and Holmstrup M (1998) Automatic counting of collembolans for laboratory experiments. *Appl. Soil Ecol.* 7, 201-205.
- (13) Fjellberg A (1980) Identification keys to Norwegian collembolans. *Norsk Entomologisk Forening*.
- (14) Edwards C.A. (1955) Simple techniques for rearing Collembola, Symphyla and other small soil inhabiting arthropods. In *Soil Zoology* (Kevan D.K. McE., Ed). Butterworths, Londres, pp. 412-416.
- (15) Goto HE (1960) Simple techniques for the rearing of Collembola and a note on the use of a fungistatic substance in the cultures. *Entomologists' Monthly Magazine* 96:138-140.

ANNEXE 1

DEFINITIONS

Les définitions suivantes s'appliquent aux fins de la présente Ligne directrice (dans cet essai, toutes les concentrations efficaces sont exprimées en masse de la substance d'essai rapportée à la masse sèche du sol d'essai):

La CSEO (concentration sans effet observé) désigne la concentration de produit chimique testé à laquelle aucun effet n'est observé. Dans cet essai, la concentration correspondant à la CSEO n'a pas d'effet statistiquement significatif ($p < 0,05$) durant une période d'exposition donnée, en comparaison avec le témoin.

La CL₀ (concentration non létale) désigne la concentration de produit chimique testé qui ne tue aucun des organismes d'expérience exposés durant une période déterminée. Dans cet essai, la CL₀ s'exprime en masse de substance d'essai par masse sèche de sol expérimental.

La CL₅₀ (concentration létale moyenne) correspond à la concentration de produit chimique testé qui entraîne la mort de 50% des organismes d'expérience exposés durant une période déterminée. Dans cet essai, la CL₅₀ s'exprime en masse de produit chimique testé par masse sèche de sol expérimental.

La CL₁₀₀ (concentration totalement létale) correspond à la concentration de produit chimique testé qui entraîne la mort de 100% des organismes d'expérience exposés durant une période déterminée. Dans cet essai, la CL₁₀₀ s'exprime en masse de produit chimique testé par masse sèche de sol expérimental.

La CMEO (concentration minimale avec effet observé) est la plus faible concentration de produit chimique testé qui exerce un effet statistiquement significatif ($p < 0,05$) durant une période d'exposition donnée, en comparaison avec le témoin.

La CE_x (concentration efficace à x%) est la concentration qui engendre un effet de x% sur les organismes d'expérience durant une période d'exposition déterminée, en comparaison avec un témoin. Par exemple, une CE₅₀ est une concentration estimée produire un effet sur un paramètre évalué de l'essai dans 50 % d'une population exposée durant une période d'exposition déterminée.

ANNEXE 2**PRINCIPALES ACTIONS ET CALENDRIER DE RÉALISATION D'UN ESSAI SUR LES COLLEMBOLLES**

Les étapes de l'essai peuvent se résumer comme suit :

Date (jour)	Action
-23 à -26	Préparation d'une culture synchrone de <i>F. fimetaria</i>
-14	Préparer le sol artificiel (mélanger les ingrédients secs) Vérifier le pH du sol artificiel et l'ajuster en conséquence Mesurer la capacité de rétention d'eau maximale du sol
-9 à -12	Préparation d'une culture synchrone de <i>F. candida</i>
-2 à -7	Sol préhumidifié
-1	Répartir les juvéniles en lots Préparer les solutions mères et appliquer la substance d'essai si un solvant est requis
0	Préparer les solutions mères et appliquer la substance d'essai si l'application d'un composé solide ou d'un hydrosoluble est requise, ou qu'elle est effectuée en surface. Mesurer le pH du sol et peser les récipients. Ajouter la nourriture. Introduire les collembolles.
14	Essai préliminaire de détermination des concentrations pour <i>F. fimetaria</i> : mettre un terme à l'essai, extraire les animaux, mesurer le pH du sol et la perte d'eau (poids) Essais proprement dits : Mesurer la teneur en humidité et compenser les pertes d'eau, et ajouter de 2 à 10 mg de levure
21	Essai proprement dit pour <i>F. fimetaria</i> : mettre un terme à l'essai, extraire les animaux, mesurer le pH du sol et la perte d'eau (poids) Essai préliminaire de détermination des concentrations pour <i>F. candida</i> : mettre un terme à l'essai, extraire les animaux, mesurer le pH du sol et la perte d'eau (poids)
28	Essai proprement dit pour <i>F. candida</i> : mettre un terme à l'essai, extraire les animaux,

mesurer le pH du sol et la perte d'eau (poids)

ANNEXE 3**RECOMMANDATIONS EN MATIÈRE D'ÉLEVAGE ET DE SYNCHRONISATION DE
F. fimetaria et *F. candida***

Les indications de dates et de durées données dans les présentes recommandations sont vérifiées pour chaque variété particulière de collemboles afin de s'assurer que le calendrier prévu permettra de disposer d'une quantité suffisante de juvéniles synchronisés. Pour l'essentiel, ce sont la survenue de la ponte après le transfert des adultes à un substrat frais et l'éclosion des œufs qui déterminent le jour approprié pour la collecte des œufs et pour celle des juvéniles synchrones.

Il convient de disposer en permanence d'une culture mère composée par exemple de 50 récipients/boîtes de Petri. Cette culture mère devrait être maintenue dans de bonnes conditions d'alimentation en lui fournissant de la nourriture et de l'eau toutes les semaines, et en retirant la nourriture ancienne et les cadavres. Si le nombre de collemboles présents sur le substrat est trop faible, il peut s'ensuivre une inhibition en raison d'une plus grande formation de moisissures. Si la culture mère est utilisée trop souvent pour la production d'œufs, elle risque de s'épuiser. Les signes d'épuisement prennent la forme de la présence d'adultes morts et de moisissures sur le substrat. Les œufs restant après la production d'animaux synchrones peuvent être utilisés pour rajeunir la culture.

Dans une culture synchrone de *F. fimetaria*, les mâles se distinguent principalement des femelles par la taille. Les mâles sont en effet nettement plus petits que les femelles, et ils se caractérisent par une plus grande vitesse de déplacement qu'elles. La bonne détermination des sexes n'exige guère d'expérience et elle peut être confirmée par inspection de la zone génitale au microscope (13).

1. Élevage*1.a. Préparation du substrat de culture*

Le substrat de culture est constitué de plâtre de Paris (sulfate de calcium) et de charbon de bois actif. On obtient ainsi un substrat humide, la fonction du charbon étant d'absorber les effluents gazeux et les excréments (14) (15). Différentes formes de charbon peuvent être utilisées pour faciliter l'observation des collemboles. Du charbon de bois en poudre est ainsi utilisé pour *F. candida* et *F. fimetaria* (donnant une coloration gris-noir au plâtre de Paris) :

Composition du substrat :

- 20 ml de charbon de bois actif
 - 200 ml d'eau distillée
 - 200 ml de plâtre de Paris
- ou

- 50 g de charbon de bois actif réduit en poudre
- 260-300 ml d'eau distillée
- 400 g de plâtre de Paris.

On laisse reposer le mélange du substrat avant son utilisation.

1.b. *Reproduction*

Les collemboles sont maintenus dans des récipients tels que des boîtes de Petri (90 mm x 13 mm), dont le fond est couvert d'une couche de 0.5 cm de substrat formé de plâtre et de charbon de bois. Ils sont cultivés à une température de $20 \pm 1^\circ \text{C}$ et sous des cycles de 12 heures de lumière et de 12 heures d'obscurité (avec un éclairage de 400 à 800 lux). Les récipients sont maintenus humides en permanence de sorte que l'humidité relative de l'air y atteigne 100%. Cela peut être obtenu en assurant la présence d'eau libre dans le plâtre poreux mais en évitant qu'une pellicule d'eau se forme à la surface du plâtre. La perte d'eau peut être évitée en maintenant l'humidité de l'air ambiant. Tous les individus morts devraient être retirés des récipients, de même que toute nourriture moisie. Pour stimuler la production d'œufs, les animaux adultes sont transférés dans des boîtes de Petri contenant un substrat de plâtre de Paris et de charbon de bois fraîchement préparé.

1.c. *Source de nourriture*

Pour *F. candida* comme pour *F. fimetaria*, la seule source de nourriture utilisée est constituée de levure de boulanger sèche en granulés. De la nourriture fraîche leur est fournie une ou deux fois par semaine, afin d'éviter la moisissure. Elle est directement placée en un petit tas sur le plâtre de Paris. La quantité de levure de boulanger ajoutée devrait être ajustée à la taille de la population de collemboles, mais un apport de 2 à 15 mg sera généralement suffisant.

2. Synchronisation.

L'essai est mené avec des animaux synchronisés afin de disposer d'animaux d'essai homogènes, au même stade de développement et de même taille. Qui plus est, la synchronisation permet de distinguer les *F. fimetaria* mâles des femelles à partir de l'âge de 3 semaines sur la base de leur dimorphisme sexuel, c'est-à-dire de leurs différences de tailles. La procédure ci-dessous constitue une suggestion quant à la manière d'obtenir des animaux synchronisés (les étapes concrètes sont facultatives).

2.a. Synchronisation.

- Préparer des récipients contenant une couche de 0.5 cm de substrat constitué de plâtre de Paris et de charbon de bois.
- Pour la ponte, transférer dans les récipients de 150 à 200 *F. fimetaria* adultes et de 50 à 100 *F. candida* tirés des 15 à 20 meilleurs récipients de la culture mère avec un substrat vieux de 4 à 8 semaines et les nourrir avec 15 mg de levure de boulanger. Éviter de mêler des juvéniles aux adultes car la présence de juvéniles risquerait d'inhiber la production d'œufs.
- Maintenir la culture à $20 \pm 1^\circ \text{C}$ (la moyenne devrait être de 20°C) et sous des cycles de 12 heures de lumière et de 12 heures d'obscurité (avec un éclairage de 400 à 800 lux). Veiller à ce que de la nourriture fraîche soit disponible et à ce que l'air soit saturé d'eau. Le manque de nourriture peut amener les animaux à déféquer sur les œufs, aboutissant à la formation de moisissures sur ceux-ci, ou encore *F. candida* pourrait cannibaliser ses propres œufs.
- Après 10 jours les œufs sont soigneusement collectés avec une épingle et une spatule et déposés sur du « papier à œufs » (petits morceaux de papier filtre plongés dans une barbotine de plâtre de

Paris et de charbon de bois) qui est placé dans un récipient contenant un substrat frais constitué de plâtre et de charbon de bois. Quelques grains de levure sont ajoutés au substrat pour attirer les juvéniles et leur faire quitter ledit papier. Il importe que ce papier tout comme le substrat soient humides, car sinon les œufs souffriront de déshydratation. Une autre solution consiste à retirer les animaux adultes des boîtes de culture synchronisée après qu'ils ont produit des œufs pendant 2 ou 3 jours.

- Après trois jours, la plupart des œufs déposés sur le papier auront éclos, et quelques juvéniles pourront être trouvés sous celui-ci.

- Pour obtenir des juvéniles d'âge homogène, le papier et les œufs non éclos présents sur celui-ci sont retirés de la boîte de Petri à l'aide de pinces. Désormais âgés de 0 à 3 jours, les juvéniles demeurent dans le récipient et sont nourris avec de la levure de boulanger. Les œufs non éclos sont jetés.

- Les œufs et les juvéniles éclos sont cultivés de la même manière que les adultes. Pour *F. fimetaria* en particulier, il conviendrait de prendre les dispositions suivantes : fournir suffisamment de nourriture fraîche et retirer la vieille nourriture qui commence à moisir, puis après 1 semaine répartir les juvéniles dans de nouvelles boîtes de Petri sous réserve que leur densité demeure supérieure à 200.

2.b. Gestion des collemboles au début de l'essai

- Les *F. candida* âgés de 9 à 12 jours ou les *F. fimetaria* âgés de 23 à 26 jours sont collectés, par exemple par aspiration, puis relâchés dans un petit récipient contenant un substrat humide constitué de plâtre et de charbon de bois, leur condition physique étant contrôlée sous le stéréomicroscope (les animaux blessés ou ayant subi des dommages sont éliminés). Il convient de suivre les différentes étapes en maintenant les collemboles dans une atmosphère humide afin d'éviter tout stress dû à la sécheresse, en utilisant par exemple des surfaces humidifiées, etc.

- Retourner le récipient et en tapoter le fond afin de transférer les collemboles sur le sol. Il convient de neutraliser l'électricité statique, au risque que les animaux se retrouvent sinon tout simplement en suspension dans l'air, ou adhèrent aux parois du récipient expérimental et s'y dessèchent. Un ioniseur ou un morceau de tissu humide placé sous le récipient peuvent être utilisés à cet effet.

- La nourriture devrait être répartie sur toute la surface du sol et non disposée en un seul bloc.

- Lors du transport et durant la période d'essai, il convient d'éviter de heurter ou de déranger physiquement de quelque autre manière les récipients d'essai, car cela risque d'accroître le tassement du sol et de compromettre l'interaction entre les collemboles.

3. Autres espèces de collemboles

D'autres espèces de collemboles peuvent être choisies pour procéder à des essais conformes à cette Ligne directrice, comme par exemple *Proisotoma minuta*, *Isotoma viridis*, *Isotoma anglicana*, *Orchesella cincta*, *Sinella curviseta*, *Paronychiurus kimi*, *Orthonychiurus folsomi*, ou encore *Mesaphorura macrochaeta*. Un certain nombre de conditions préalables sont toutefois réunies avant d'utiliser ces autres espèces :

- Elles sont clairement identifiées;
- Les raisons du choix de l'espèce retenue sont fournies;
- Il faut veiller à ce que la biologie de la reproduction soit incluse dans la phase d'essai, de sorte qu'elle sera potentiellement ciblée durant l'exposition;
- Leur cycle de vie est connu : âge de maturation, durée de développement des œufs, et stades de développement susceptibles d'être soumis à l'exposition;

- Le substrat d'essai et la quantité de nourriture disponible garantissent des conditions optimales de croissance et de reproduction;
- La variabilité est suffisamment faible pour permettre une estimation précise et exacte de la toxicité.

ANNEXE 4**EXTRACTION ET COMPTAGE DES ANIMAUX**

1. Deux méthodes d'extraction peuvent être appliquées.

1.a. Première méthode : Un extracteur à gradient de température contrôlé reposant sur les principes énoncés par MacFayden peut être utilisé (1). La chaleur émanant d'un dispositif de chauffage situé sur la partie supérieure de la boîte d'extraction est régulée par un thermistor placé à la surface de l'échantillon de sol. La température du liquide réfrigéré entourant le récipient de collecte est régulée par un thermistor situé à la surface de la boîte de collecte (placée sous l'échantillon de sol). Les thermistors sont reliés à une unité de contrôle programmable qui élève la température selon un schéma préétabli. Les animaux sont collectés dans la boîte de collecte réfrigérée (2° C) dont le fond contient une couche constituée de plâtre de Paris et de charbon de bois. L'extraction débute à 25° C et la température est ensuite automatiquement augmentée de 5° C toutes les 12 h sur une durée totale de 48 heures. Après 12 h à 40° C l'extraction est achevée.

1.b. Seconde méthode : Au terme de la période d'incubation expérimentale le nombre de collemboles juvéniles présents est évalué par flottation. À cet effet, l'essai est réalisé dans des récipients d'un volume d'environ 250 ml. Environ 200 ml d'eau distillée sont ajoutés à la fin de l'essai. Le sol est remué doucement à l'aide d'un pinceau fin en vue de permettre aux collemboles de remonter à la surface de l'eau. Une petite quantité, environ 0.5 ml, de teinture photographique noire Kentmere peut être ajoutée à l'eau pour faciliter le comptage en augmentant le contraste entre l'eau et les collemboles blancs. Cette teinture n'est pas toxique pour les collemboles.

2. Comptage: le comptage des animaux peut être effectué à l'œil nu ou à l'aide d'un microscope optique après avoir placé une grille sur le récipient de flottation, ou encore en photographiant la surface de chaque récipient puis en comptant ultérieurement les collemboles sur des agrandissements ou sur des projections de diapositives. Le comptage peut également être réalisé à l'aide de techniques de traitement numérique de l'image (12). Toutes ces techniques sont validées.

ANNEXE 5**DÉTERMINATION DE LA CAPACITÉ MAXIMALE DE RÉTENTION D'EAU DU SOL**

La méthode suivante de détermination de la capacité maximale de rétention d'eau du sol a fait ses preuves. Elle est décrite à l'annexe C de la norme ISO 11268-2 (Qualité du sol -- Effets des polluants vis-à-vis des vers de terre (*Eisenia fetida*). Partie 2: Détermination des effets sur la reproduction).

Prélevez une quantité déterminée (5 g, par exemple) du sol expérimental servant de substrat à l'aide d'un instrument approprié (tarière, etc.). Couvrez le fond de la tarière avec un morceau de papier filtre humide et placez-la sur un support dans un bain d'eau. La tarière est progressivement submergée jusqu'à ce que le niveau d'eau dépasse le sommet de la carotte de sol. Laissez la tarière dans l'eau durant environ trois heures. Comme l'eau absorbée par les capillaires du sol ne peut pas être retenue en totalité, laissez l'échantillon de sol dégorger durant deux heures, en plaçant le tube sur un lit de sable quartzique fin très humide contenu dans un récipient fermé (pour empêcher le séchage). Pesez l'échantillon et séchez-le à 105°C jusqu'à ce qu'il atteigne une masse constante. La capacité de rétention d'eau (CRE) est calculée comme suit:

$$\text{CRE (en \% de masse sèche)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

où :

S = masse du substrat saturé en eau + masse de la tarière + masse du papier filtre

T = tare (masse de la tarière + masse du papier filtre)

D = masse sèche du substrat

ANNEXE 6**DÉTERMINATION DU pH DU SOL**

La méthode de détermination du pH d'un sol, décrite ci-dessous s'appuie sur la norme ISO 10390: Qualité du sol – Détermination du pH.

On laisse sécher une quantité définie de sol à température ambiante durant au moins 12 heures. On prépare une suspension du sol (contenant au moins 5 g de sol) dans cinq fois son volume d'une solution de chlorure de potassium (KCl) 1 M de qualité analytique ou d'une solution de chlorure de calcium (CaCl₂) 0,01 M de qualité analytique. On agite vigoureusement la suspension durant cinq minutes et on la laisse sédimenter durant au moins deux heures, mais pas plus de 24 heures. On mesure ensuite le pH de la phase liquide à l'aide d'un pH-mètre, étalonné avant chaque mesure à l'aide d'une série appropriée de solutions tampons (pH 4.0 et 7.0, par exemple).