NORME INTERNATIONALE

ISO 18187

Première édition
2016-05-01

Qualité du sol — Essai contact pour échantillons solides utilisant l'activité déshydrogénase de *Arthrobacter globiformis*

Soil quality — Contact test for solid samples using the dehydrogenase activity of Arthrobacter globiformis

Numéro de référence
ISO 18187:2016(F)

© ISO 2016



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2016, Publié en Suisse

Droits de reproduction réservés. Sauf indication contraire, 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, l'affichage sur l'internet ou sur un Intranet, sans autorisation écrite préalable. Les demandes d'autorisation peuvent être adressées à l'ISO à l'adresse ci-après ou au comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office
Ch. de Blandonnet 8 • CP 401
CH-1214 Vernier, Geneva, Switzerland
Tel. +41 22 749 01 11
Fax +41 22 749 09 47
copyright@iso.org
www.iso.org

Sommaire

Page

Avant-propos ..... **iv**
Introduction ..... **v**
1 Domaine d'application **1**
2 Références normatives **1**
3 Termes et définitions **1**
4 Principe **4**
5 Réactifs et matériau **4**
5.1 Micro-organismes d'essai 4
5.2 Substrats témoins 5
5.2.1 Généralités 5
5.2.2 Témoin pour les sols 5
5.2.3 Témoin pour les déchets 5
5.3 Substrats d'essai 6
5.4 Produits chimiques 6
6 Appareillage **9**
7 Mode opératoire **10**
7.1 Préparation des dilutions 10
7.2 Préparation de la substance de référence et du témoin positif 10
7.3 Mode opératoire de l'essai contact 10
7.3.1 Généralités 10
7.3.2 Aération 11
7.3.3 Désactivation 11
7.3.4 Préparation de l'inoculum 12
7.3.5 Incubation et mesurage de la fluorescence 12
7.4 Interférences 12
8 Calcul et expression des résultats **13**
8.1 Calcul 13
8.1.1 Fluorescence relative 13
8.1.2 Détermination du pourcentage d'inhibition 13
8.2 Expression des résultats 13
9 Validité de l'essai **14**
10 Analyse statistique **14**
11 Rapport d'essai **15**
Annexe A (informative) **Résultats de l'essai interlaboratoires** **17**
Annexe B (informative) **Préparation des micro-organismes d'essai** **23**
Annexe C (informative) **Essais avec les substances chimiques** **25**
Bibliographie **27**

© ISO 2016 – 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 appelée 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 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'OMC concernant les obstacles techniques au commerce (OTC), voir le lien suivant: Avant-propos — Informations supplémentaires.

Le comité chargé de l'élaboration du présent document est l'ISO/TC 190, *Qualité du sol*, sous-comité SC 4, *Méthodes biologiques*.

© ISO 2016 – Tous droits réservés

Introduction

La présente Norme internationale décrit l'essai contact miniaturisé sur solide avec *Arthrobacter globiformis* qui permet d'effectuer une évaluation préliminaire en 6 h des matériaux solides (c'est-à-dire des sols et des déchets). Le principe de l'évaluation repose sur l'inhibition de l'activité déshydrogénase d'un micro-organisme d'essai ajouté, provoquée par des substances toxiques biodisponibles dans des échantillons de sol et de déchets. Il s'agit d'un essai pertinent d'un point de vue écologique dans la mesure où il utilise une espèce de bactérie omniprésente dans les sols présentant une forte affinité vis-à-vis des surfaces[16][6] et dont les déshydrogénases sont impliquées dans divers mécanismes biologiques supportant l'intégrité bactérienne (des chaînes respiratoires, par exemple). De plus, il a été noté que ce paramètre (inhibition de l'activité déshydrogénase) est assez sensible aux différentes substances toxiques.[19][10][14][15]

Globalement, cet essai demande peu de main-d'œuvre, il a un bon rapport coût-efficacité et est sensible; il fournit des résultats qui améliorent l'évaluation physique et chimique des échantillons naturels tout en permettant une indication rapide de leurs effets biologiques.

L'essai de contact miniaturisé sur solide est basé sur l'essai contact sur solide décrit par la Référence [7].

La présente Norme internationale se base également sur la Référence [23].

Les résultats d'un essai interlaboratoires visant à estimer la variabilité de l'essai pour évaluer différents échantillons de déchets et de sols, ainsi que des produits chimiques, sont présentés à l'Annexe A.

© ISO 2016 – Tous droits réservés

Qualité du sol — Essai contact pour échantillons solides utilisant l'activité déshydrogénase de *Arthrobacter globiformis*

1 Domaine d'application

La présente Norme internationale spécifie une méthode rapide d'évaluation d'échantillons solides en suspension aérobie, en déterminant l'inhibition de l'activité déshydrogénase de *Arthrobacter globiformis* à l'aide d'un indicateur redox coloré, la résazurine.

Cette méthode est applicable à l'évaluation de l'effet de contaminants non volatils, liés aux matières solides ou solubles dans l'eau, présents dans des échantillons naturels tels que des sols et des déchets. L'essai délivre un résultat en 6 h et peut donc être utilisé pour le criblage de matériaux potentiellement contaminés.

2 Références normatives

Les documents ci-après, dans leur intégralité ou non, sont des références normatives indispensables à l'application 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 5667-15, *Qualité de l'eau — Échantillonnage — Partie 15: Lignes directrices pour la conservation et le traitement des échantillons de boues et de sédiments*

ISO 10381-6, *Qualité du sol — Échantillonnage — Partie 6: Lignes directrices pour la collecte, la manipulation et la conservation, dans des conditions aérobies, de sols destinés à l'évaluation en laboratoire des processus, de la biomasse et de la diversité microbiens*

CEN/TR 15310-1, *Caractérisation des déchets — Prélèvement des déchets — Partie 1: Guide relatif au choix et à l'application des critères d'échantillonnage dans diverses conditions*

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

3 Termes et définitions

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

3.1
temps de contact
durée d'exposition des bactéries à une suspension de matériau solide

3.2
témoin négatif
échantillon d'un *substrat témoin* (3.6) avec un mélange de solutions connues [eau distillée, milieu B ou *inoculum* (3.12)]·

Note 1 à l'article: Il est utilisé dans le but de normaliser l'analyse.

© ISO 2016 – Tous droits réservés

3.3
témoin positif
échantillon d'un *substrat témoin* (3.6) contenant un mélange de solutions connues [eau distillée, milieu B ou *inoculum* (3.12)] et une substance de référence

Note 1 à l'article: Il est utilisé pour vérifier la sensibilité de l'organisme d'essai.

3.4
blanc A
blanc qui fixe la fluorescence propre au substrat après sa désactivation

Note 1 à l'article: Aucune bactérie n'est ajoutée au blanc.

3.5
blanc B
blanc qui fixe la fluorescence naturelle du substrat sans désactivation

Note 1 à l'article: Aucune bactérie n'est ajoutée au blanc.

3.6
substrat témoin
substrat de référence ou standard, utilisé comme témoin et comme *milieu* (3.13) de préparation des séries de dilutions/concentrations des *substrats d'essai* (3.7) ou d'une substance de référence

EXEMPLE Sable de quartz ou sol standard de type LUFA 2.2.

3.7
substrat d'essai
substrat naturel ou artificiel qui est naturellement contaminé ou qui est dopé avec un produit chimique soumis à essai

Note 1 à l'article: Le substrat d'essai est le *matériau d'essai* (3.8) qui a été préparé pour être testé (par exemple, qui a été tamisé) et/ou qui a été dilué avec un *substrat témoin* (3.6).

3.8
matériau d'essai
échantillon initial de sol ou de déchets n'ayant subi aucune modification (par exemple, tamisage)

3.9
activité déshydrogénase
activité d'enzymes captant l'hydrogène, impliquées dans divers processus métaboliques énergétiques et de biosynthèse (la chaîne respiratoire, par exemple) et nécessitant l'intégrité cellulaire pour être produites

Note 1 à l'article: Ces enzymes peuvent réduire la résazurine en résorufine dans l'environnement extracellulaire.[6]

Note 2 à l'article: Voir Référence [21].

3.10
concentration d'effet pour un effet de *x* %
CE*x*
concentration (fraction massique) d'une substance ou d'un échantillon soumis à essai qui produit un effet de *x* % pour un paramètre donné, pendant une durée d'exposition définie, par rapport à un témoin

EXEMPLE Une CE50 est une concentration qui produit un effet, pour le paramètre de l'essai, sur 50 % d'une population exposée sur une durée d'exposition définie.

Note 1 à l'article: La concentration CE*x* est exprimée sous la forme d'un pourcentage du sol ou des déchets soumis à essai (matière sèche) dans le mélange de sol (masse de matière sèche). Pour les essais sur les produits chimiques, la concentration CE*x* est exprimée en masse de substance d'essai dans le sol (équivalent sec), en milligrammes par kilogramme.

© ISO 2016 – Tous droits réservés

3.11
bactéries lyophilisées
culture bactérienne conservée en éliminant l'eau d'une suspension de cellules congelées, par sublimation sous pression négative réduite

Note 1 à l'article: Les cultures lyophilisées peuvent être conservées à (-20 ± 2) °C. Les bactéries sont actives après reconstitution avec de l'eau distillée stérilisée [20 min à 30 min à (6 ± 2) °C] et prêtes à être utilisées pour l'essai [voir 7.3.4 b)].

3.12
inoculum
suspension bactérienne utilisée pour ensemencer une solution nutritive

3.13
milieu
solution nutritive aqueuse nécessaire à la croissance des bactéries

3.14
densité optique de l'inoculum bactérien
mesure de l'atténuation d'un faisceau de lumière traversant une suspension bactérienne à 600 nm (utilisée pour déterminer le nombre de cellules de façon indirecte)

Note 1 à l'article: Dans un essai bactérien, l'absorbance est généralement mesurée en FAU (unités d'atténuation formazine) à 600 nm (voir Référence [3]).

3.15
début de l'essai
moment où les substrats, les réactifs et l'*inoculum* (3.12) bactérien sont préparés, précédant immédiatement la période d'incubation et de réaction

Note 1 à l'article: Dans le cas présent, il s'agit du jour où le substrat d'essai et le *substrat témoin* (3.6) sont préparés pour l'incubation (c'est-à-dire Tableau 1, jour 0).

3.16
temps de réaction
temps que prend l'enzyme pour réagir (à partir de l'ajout de la solution de résazurine jusqu'à la fin de la réaction)

3.17
pente
rapport de la variation de *fluorescence relative* (3.18) pendant le *temps de réaction* (3.16), entre 15 min et 45 min

Note 1 à l'article: La pente (exprimée en min^{-1}) est obtenue par application d'un modèle de régression linéaire aux valeurs de fluorescence en fonction du temps.

3.18
fluorescence relative
fluorescence mesurée pour chaque traitement (témoin et essai) à laquelle est soustraite la fluorescence du *blanc A* (3.4) correspondant

3.19
culture mère
culture bactérienne obtenue à partir d'une culture pure de la souche provenant d'un laboratoire certifié

Note 1 à l'article: Cette culture mère fournit un *inoculum* (3.12) pour la pré-culture du mode opératoire d'essai.

© ISO 2016 – Tous droits réservés

3.20
dilution minimale sans effet
valeur de DMSE
plus faible niveau de dilution (DMSE) pour lequel l'essai n'aboutit pas à une réduction pertinente d'un point de vue écotoxicologique

Note 1 à l'article: La DMSE est exprimée en tant que valeur inverse de la dilution.

EXEMPLE La série de dilutions 1/2/4/8/16 [= 100 %/50 %/25 %/12,5 %/6,25 % de *substrat d'essai* (3.7) par rapport au *substrat témoin* (3.6)] est couramment employée. Une DMSE de 8 correspond à une dilution de sol ou de déchets de 1:8.

4 Principe

La bactérie *Arthrobacter globiformis* est ajoutée au matériau solide et incubée à (30 ± 1) °C pendant 2 h. À l'issue de ce temps de contact, on ajoute la résazurine, un indicateur coloré d'oxydoréduction non toxique. L'activité déshydrogénase entraîne une transformation de la résazurine en résorufine dans l'environnement extracellulaire.[6] La résorufine peut être détectée par fluorométrie (excitation à 535 nm, émission à 590 nm) en présence de matériau solide. L'augmentation de résorufine est déterminée en mesurant la fluorescence toutes les 15 min pendant 1 h. Afin de déterminer l'inhibition de l'activité déshydrogénase, le taux d'augmentation de résorufine dans l'échantillon est comparé au taux d'augmentation de résorufine dans le témoin. Une inhibition de l'activité déshydrogénase est attendue en présence de substances toxiques. Cette inhibition se traduit par la réduction de la production de résorufine et par la diminution de l'émission de fluorescence qui en découle.

5 Réactifs et matériau

5.1 Micro-organismes d'essai

L'organisme utilisé pour cet essai est *Arthrobacter globiformis* (Conn 1982) Conn et Dimmick 1947 (souche ATCC 8010), qui est courant dans les sols. Les espèces de *Arthrobacter* appartiennent à la famille des Micrococcaceae. Il s'agit principalement de micro-organismes aérobies stricts, même si certaines espèces sont susceptibles de présenter un mécanisme anaérobie dans des conditions limitantes en oxygène.[9] *Arthrobacter* spp. sont chimiohétérotrophes et présentent des caractéristiques pléomorphes dans la mesure où ils présentent une modification de leur morphologie, de bâtonnets à coccus, lorsqu'ils entrent en phase stationnaire. Bien que *Arthrobacter* soit gram-positif, il peut être gram-négatif pendant la phase de croissance exponentielle. Des fluctuations de l'épaisseur de paroi cellulaire durant la croissance bactérienne peuvent aboutir à une variabilité de la coloration de Gram, se traduisant par une coloration différentielle des granules.[21] Cependant, cette caractéristique n'induit aucune différence en termes de sensibilité entre les essais, dans la mesure où on utilise un inoculum en phase de croissance exponentielle pendant le temps de réaction. *Arthrobacter globiformis* appartient au groupe de risque I — micro-organisme non pathogène.

La souche bactérienne peut être obtenue à partir de réactifs lyophilisés ou déshydratés du commerce ou de collections de cultures disponibles, par exemple auprès du Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, ou auprès de l'ARS Culture Collection NCAUR.[1)] Les suspensions bactériennes utilisées pour les mesures de toxicité doivent être fraîchement préparées à partir des cultures mères ou doivent être directement utilisées lorsqu'elles proviennent d'un lot lyophilisé prêt à l'emploi. Le procédé de préparation des cultures mères et de lyophilisation des bactéries est présenté à l'Annexe B.

1) Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) GmbH, Mascheroder Weg 10, D-38124 Brunswick, Allemagne ou ARS (Agricultural Research Service) Culture collection (également connu sous le nom de NRRL) appartenant au National Center for Agricultural Utilization Research (NCAUR), 1815 N, University Street, Peoria, Illinois 61604, USA (États-Unis d'Amérique), sont des exemples de sociétés commercialisant cette bactérie. Cette information n'est donnée aux utilisateurs du présent document que par souci de commodité et ne constitue en rien une recommandation de ces sociétés par l'ISO.

© ISO 2016 – Tous droits réservés