

---

---

**Qualité du sol — Évaluation des  
effets génotoxiques sur les végétaux  
supérieurs — Essai des micronoyaux  
sur *Vicia faba***

*Soil quality — Assessment of genotoxic effects on higher plants —  
Vicia faba micronucleus test*

**iTeh STANDARD PREVIEW**  
**(standards.iteh.ai)**

[ISO 29200:2013](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/855ef5a1-eb9d-4775-881e-6154771de520/iso-29200-2013)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/855ef5a1-eb9d-4775-881e-6154771de520/iso-29200-2013>



**iTeh STANDARD PREVIEW**  
**(standards.iteh.ai)**

ISO 29200:2013

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/855ef5a1-eb9d-4775-881e-6154771de520/iso-29200-2013>



**DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT**

© ISO 2013

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  
Case postale 56 • CH-1211 Geneva 20  
Tel. + 41 22 749 01 11  
Fax + 41 22 749 09 47  
E-mail [copyright@iso.org](mailto:copyright@iso.org)  
Web [www.iso.org](http://www.iso.org)

Publié en Suisse

## Sommaire

Page

Avant-propos.....	iv
Introduction.....	v
<b>1</b> <b>Domaine d'application</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b> <b>Références normatives</b> .....	<b>1</b>
<b>3</b> <b>Termes et définitions</b> .....	<b>2</b>
<b>4</b> <b>Principe</b> .....	<b>2</b>
<b>5</b> <b>Plantes, matériel d'essai et réactifs</b> .....	<b>2</b>
5.1    Matériel.....	2
5.2    Organisme d'essai.....	2
5.3    Substance de référence.....	3
5.4    Réactifs.....	3
<b>6</b> <b>Protocoles</b> .....	<b>3</b>
6.1    Préparation du sol à soumettre à essai.....	3
6.2    Préparation des graines.....	4
6.3    Réalisation de l'essai.....	5
6.4    Conditions d'essai.....	7
6.5    Préparation des cellules.....	7
<b>7</b> <b>Évaluation des résultats</b> .....	<b>9</b>
7.1    Présentation des données.....	9
7.2    Analyse statistique.....	9
7.3    Interprétation des résultats.....	9
<b>8</b> <b>Critères de validité</b> .....	<b>9</b>
<b>9</b> <b>Rapport d'essai</b> .....	<b>9</b>
<b>Annexe A</b> (informative) <b>Composition du milieu de Hoagland</b> .....	<b>11</b>
<b>Annexe B</b> (informative) <b>Produits chimiques soumis à essai ajoutés aux sols</b> .....	<b>12</b>
<b>Annexe C</b> (informative) <b>Résultats de l'essai interlaboratoires mené dans le cadre de la norme NF T 90-327</b> .....	<b>13</b>
<b>Annexe D</b> (informative) <b>Résultats de l'essai interlaboratoires effectué sur la substance de référence et sur un sol industriel contaminé</b> .....	<b>15</b>
<b>Bibliographie</b> .....	<b>19</b>

## 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 (CEI) 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/CEI, 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/CEI, Partie 2, [www.iso.org/directives](http://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 sur la liste ISO des déclarations de brevets reçues, [www.iso.org/brevets](http://www.iso.org/brevets).

Les éventuelles appellations commerciales utilisées dans le présent document sont données pour information à l'intention des utilisateurs et ne constituent pas une approbation ou une recommandation.

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

[ISO 29200:2013](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/855ef5a1-eb9d-4775-881e-6154771de520/iso-29200-2013)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/855ef5a1-eb9d-4775-881e-6154771de520/iso-29200-2013>

## Introduction

Dans le domaine de l'évaluation de la qualité du sol, il apparaît nécessaire de déterminer in vivo le potentiel génotoxique des sols et des matrices solides, qui peut être induit par la pollution ou par un processus de remédiation. En effet, les agents génotoxiques ont la capacité d'endommager le génome des organismes vivants ou d'interférer avec son fonctionnement, mais ils ne sont pas toujours détectés par une analyse chimique ou des essais d'écotoxicité classiques. En fait, les effets génotoxiques sont souvent observés chez les organismes vivants à une concentration sublétales, à laquelle aucun effet toxique (par exemple survie ou croissance) ne peut être observé à court terme mais des effets à long terme peuvent être craints. De plus, les plantes supérieures, telles que *Vicia faba* (fève) sont écologiquement représentatives pour évaluer la qualité des sols ou des matrices solides.

## iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

[ISO 29200:2013](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/855ef5a1-eb9d-4775-881e-6154771de520/iso-29200-2013)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/855ef5a1-eb9d-4775-881e-6154771de520/iso-29200-2013>

**iTeh STANDARD PREVIEW**  
**(standards.iteh.ai)**

ISO 29200:2013

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/855ef5a1-eb9d-4775-881e-6154771de520/iso-29200-2013>

# Qualité du sol — Évaluation des effets génotoxiques sur les végétaux supérieurs — Essai des micronoyaux sur *Vicia faba*

## 1 Domaine d'application

La présente Norme internationale décrit une méthode pour évaluer les effets génotoxiques (cassure des chromosomes ou dysfonctionnement du fuseau mitotique) des sols ou des matrices solides sur une plante supérieure: *Vicia faba* (fève). Cette méthode permet d'évaluer la génotoxicité (toxicité vis-à-vis du matériel génétique) des sols ou des matrices solides telles que des composts, boues, déchets, matières fertilisantes, etc. Deux modes d'exposition peuvent être considérés: une exposition directe des plantes au sol (ou aux matrices solides) ce qui est représentatif du potentiel génotoxique réel et une exposition des plantes à l'extrait aqueux du sol (ou des matrices solides). Ce dernier mode d'exposition à un lixiviat ou un éluat permet de détecter les mutagènes qui ne sont pas adsorbés dans les sols et qui peuvent être transférés aux compartiments aquatiques. D'autre part, cet essai peut être utilisé pour évaluer les effets génotoxiques des substances chimiques, ainsi que des eaux, effluents, etc.

## 2 Références normatives

Les documents suivants, en tout ou partie, sont référencés de manière normative dans le présent document et sont indispensables pour son application. 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 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*

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

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

ISO 11260, *Qualité du sol — Détermination de la capacité d'échange cationique effective et du taux de saturation en bases échangeables à l'aide d'une solution de chlorure de baryum*

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

ISO/TS 21268-1, *Qualité du sol — Modes opératoires de lixiviation en vue d'essais chimiques et écotoxicologiques ultérieurs des sols et matériaux du sol — Partie 1: Essai en bâchée avec un rapport liquide/solide de 2 l/kg de matière sèche*

ISO/TS 21268-2, *Qualité du sol — Modes opératoires de lixiviation en vue d'essais chimiques et écotoxicologiques ultérieurs des sols et matériaux du sol — Partie 2: Essai en bâchée avec un rapport liquide/solide de 10 l/kg de matière sèche*

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 sol témoin**  
substrat non contaminé utilisé comme milieu de contrôle et pour la préparation des différentes concentrations des sols ou des matrices solides à soumettre à essai

EXEMPLE Composts, boues, déchets, substances chimiques.

**3.2 indice mitotique**  
nombre de cellules en division pour 1 000 cellules observées lorsque toutes les phases de la mitose sont prises en compte, depuis la prophase (quand les chromosomes commencent à se condenser) jusqu'à la télophase (quand la chromatine des deux noyaux formés à chaque pôle de la cellule termine de se décondenser)

**3.3 mélange d'essai**  
mélange du milieu soumis à essai (sols, composts, boues, déchets, substances chimiques) avec le sol témoin

### 4 Principe

Cet essai de génotoxicité est basé sur la détection des micronoyaux dans les cellules des extrémités des racines secondaires de *Vicia faba* (fève). Les micronoyaux, visibles dans le cytoplasme des cellules, résultent d'une cassure chromosomique (effet des substances clastogènes) ou d'un dysfonctionnement du fuseau mitotique (effet aneugène). (standards.iteh.ai)

Dans les deux cas, les fragments des chromosomes ou les chromosomes entiers ne peuvent pas migrer vers l'un des deux pôles du fuseau au moment de l'anaphase de la division mitotique et donc, forment un (ou plusieurs) micronoyau(s). <https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/855ef5a1-eb9d-4775-881e-6154771de520/iso-29200-2013>

La fréquence de micronoyaux est déterminée dans les cellules des racines témoins et dans celles qui ont été exposées au sol (ou aux matrices solides) ou à l'extrait aqueux du sol soumis à essai. Un test statistique permet donc de déterminer la significativité des données.

### 5 Plantes, matériel d'essai et réactifs

#### 5.1 Matériel

L'exposition des plantes aux sols et aux matrices solides à soumettre à essai a lieu dans des pots en plastique (diamètre: 9 cm, hauteur: 10 cm).

L'exposition à l'extrait aqueux des sols est effectuée dans des contenants en verre (par exemple béccher en verre d'une contenance de 200 ml).

Un microscope équipé d'un objectif grossissant  $\times 400$  est requis pour étudier les effets microscopiques sur les cellules.

#### 5.2 Organisme d'essai

La plante choisie pour sa sensibilité aux micropolluants et pour sa facilité d'obtention est *Vicia faba* (fève), Aguadulce à très longue cosse. Cette plante supérieure fait partie de la famille des légumineuses et appartient à la classe des dicotylédones.

Il est recommandé de ne pas utiliser de graines enrobées d'insecticides et/ou de fongicides.



### 5.3 Substance de référence

L'hydrazide maléique est recommandé comme substance de référence. Le contrôle positif est effectué à une concentration de  $10^{-5}$  M, respectivement 1,12 mg/kg et 1,12 mg/l pour des expositions en phase solide et en phase liquide.

La préparation de cette substance photodégradable et l'exposition des organismes végétaux à la solution doivent être exécutées à l'abri de la lumière.

### 5.4 Réactifs

#### 5.4.1 Solution de Carnoy

La solution de Carnoy est composée d'acide acétique glacial et d'éthanol dans des proportions respectives de 25 % et 75 % et doit être préparée extemporanément.

#### 5.4.2 Solution d'hydrolyse

Une solution de HCl d'une concentration de 1 mol/l permet d'effectuer l'hydrolyse des racines.

#### 5.4.3 Solution de coloration

La solution de coloration utilisée pour mettre spécifiquement en évidence l'ADN est de l'orcéine à 1 % diluée dans de l'acide acétique à 45 %. Le mélange est amené à ébullition pendant 10 min, ensuite filtré après refroidissement. Lors de l'emploi, il est important de filtrer la solution de coloration après chaque utilisation afin d'empêcher la formation de cristaux d'orcéine qui pourraient être confondus avec les micronoyaux durant l'examen microscopique des cellules.

NOTE Une autre solution de coloration spécifique de l'ADN peut être utilisée.

#### 5.4.4 Milieu de Hoagland

Milieu nutritif dont la composition est donnée dans l'[Annexe A](#).

#### 5.4.5 Solvant intermédiaire

Sulfoxyde de diméthyle (DMSO), à une concentration maximale de 1 %.

NOTE Tout autre solvant approprié miscible à l'eau dont l'innocuité génotoxique a été préalablement établie peut être utilisé.

## 6 Protocoles

### 6.1 Préparation du sol à soumettre à essai

#### 6.1.1 Substances chimiques

Les substances chimiques peuvent être soumises à essai: leur préparation est expliquée dans l'[Annexe B](#).

#### 6.1.2 Sols et matrices solides

Quel que soit le sol à soumettre à essai (échantillons provenant d'un site contaminé ou d'un sol dépollué ou d'autres matrices solides telles que des composts, boues, déchets ou matières fertilisantes, etc.), il est recommandé qu'il possède, après tamisage, des valeurs de pH qui ne soient pas toxiques pour *Vicia faba*. Il est recommandé que les sols à soumettre à essai soient tamisés à 4 mm, mélangés minutieusement et stockés aussi brièvement que possible à l'abri de la lumière à une température de  $4 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$  conformément à l'ISO 10381-6 en utilisant des contenants qui réduisent le plus possible les pertes des contaminants du

sol par volatilisation et par sorption sur les parois des contenants. Il est recommandé de ne pas corriger le pH du sol.

Pour chaque sol à soumettre à essai, il est recommandé de déterminer les caractéristiques suivantes:

- classification de la texture du sol,
- pH conformément à l'ISO 10390,
- teneur en eau conformément à l'ISO 11465,
- capacité de rétention d'eau conformément à l'Annexe B de l'ISO 11269-2:2012,
- capacité d'échange cationique conformément à l'ISO 11260,
- teneur en matière organique conformément à l'ISO 10694.

Les mélanges de sol sont placés dans des pots en plastique avec une teneur en humidité de 70 % de la capacité de rétention en eau.

### 6.1.3 Sol témoin

Tout sol naturel de référence ou standard peut être utilisé comme sol témoin, par exemple les sols LUFA<sup>1)</sup> préférablement séchés à température ambiante, tamisés entre 2 mm et 5 mm, avec une teneur en argiles < 25 % (< 2 µm), une teneur en limons < 45 % (2 µm – 50 µm), une teneur en matière organique du sol entre 1,5 % et 5 %, pH<sub>eau</sub> entre 5 et 8.

Lorsque des sols de qualité connue et inconnue sont comparés, il est recommandé que le sol témoin et le sol à soumettre à essai soient du même type de texture et soient, dans la mesure du possible, similaires à tous égards autres que la présence des substances chimiques ou contaminants à soumettre à essai. En effet, des différences significatives dans les caractéristiques de sol autres que la présence de contaminants peuvent conduire à des différences dans la division cellulaire de la plante, donc dans la fréquence des micronoyaux et peuvent induire de faux résultats positifs.

NOTE Bien que l'indice mitotique ne soit pas modifié par un pH entre 4 et 9, il est recommandé d'utiliser le sol témoin avec un pH<sub>eau</sub> entre 5 et 8 pour une meilleure évaluation de la génotoxicité des substances chimiques.

### 6.1.4 Extraits aqueux du sol

Les extraits aqueux des sols et des matrices solides sont préparés aussi rapidement que possible après réception de l'échantillon au laboratoire, à l'aide d'un essai de lixiviation conformément à l'un des protocoles décrits dans l'ISO/TS 21268-1, l'ISO/TS 21268-2 ou l'EN 14735. Cependant, les lixiviats obtenus ne doivent pas être filtrés mais peuvent être décantés durant 2 h. Dans ce cas, la phase surnageante est échantillonnée et stockée à l'abri de la lumière à une température maximale de 4 °C ± 3 °C jusqu'à ce que l'essai soit réalisé, ce qui doit avoir lieu au maximum 24 h après l'étape de lixiviation. Le milieu de Hoagland est utilisé pour le témoin négatif et pour préparer les dilutions de l'extrait aqueux.

## 6.2 Préparation des graines

Les graines (approximativement en quantité trois fois supérieure à la quantité nécessaire) sont prélevées dans le stock de graines entreposé à une température de 4 °C à l'abri de la lumière. Ensuite, une étape de germination est nécessaire pour obtenir les racines secondaires: les graines sont nettoyées avec de l'eau déminéralisée et immergées dans l'eau déminéralisée à température ambiante pendant une période de 6 h à 24 h afin de les hydrater. Les téguments des graines sont ensuite enlevés et les graines sont mises

---

1) Les sols LUFA sont un exemple de produit approprié disponible dans le commerce. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs du présent document et ne signifie nullement que l'ISO approuve ou recommande l'emploi exclusif du produit ainsi désigné.

à germer verticalement à  $24\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  dans du coton (n'ayant pas été traité au chlore) humidifié de façon continue à l'abri de la lumière.

NOTE D'autres matériaux de germination peuvent être utilisés: vermiculite, tourbe, etc.

Après environ trois jours, seules les graines ayant une racine principale d'une longueur comprise entre 3 cm et 5 cm sont choisies. Leur extrémité (environ 5 mm) est ensuite coupée afin d'interrompre la croissance de cette racine principale et de stimuler celle des racines secondaires.

Pour l'exposition en phase solide, les graines avec la racine primaire sont directement placées dans les sols pour le début de l'exposition des racines secondaires.

Pour l'exposition en phase liquide, les graines sont ensuite placées, de façon à immerger uniquement la racine, au-dessus d'un récipient contenant du milieu nutritif [milieu de Hoagland (5.4.4)] à une température de  $24\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  afin d'induire la germination des racines secondaires. Ce milieu préalablement oxygéné est renouvelé chaque 24 h. Les racines secondaires des graines atteignent une longueur de 1 cm à 2 cm après une période de quatre jours; les graines pourvues de ces racines secondaires sont ensuite utilisées pour l'essai.

Cette étape de germination des graines de *Vicia faba*, nécessaire dans les deux modes d'exposition, peut débuter avant le début de l'essai quatre jours et huit jours respectivement pour l'exposition en phase solide et pour l'exposition en phase liquide.

## 6.3 Réalisation de l'essai

### 6.3.1 Sols et matrices solides

Les concentrations sont choisies dans une série géométrique avec un facteur ne dépassant pas deux et doivent couvrir une large gamme de concentrations (par exemple de 0,01 % à 100 %). Ces mélanges sont préparés par mélange du sol avec un sol de référence.

Chaque essai doit inclure un témoin négatif sans aucun échantillon et un témoin positif (voir 5.3).

L'exposition directe des organismes végétaux aux différentes concentrations du sol est réalisée en plaçant les graines germées (au moins trois par concentration) dans un pot en plastique contenant 200 g de sol à soumettre à essai ou de mélanges (voir la Figure 1) durant un temps d'exposition permettant d'obtenir au moins dix racines de 1 cm de longueur, soit entre trois et cinq jours.