

Première édition
2009-10-15

Version corrigée
2010-01-15

Qualité du sol — Effets des polluants vis-à-vis des champignons mycorrhizogènes — Essai de germination des spores

Soil quality — Effects of pollutants on mycorrhizal fungi — Spore germination test

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO/TS 10832:2009](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/f989ee4b-a2c1-4f5b-ae28-a6d1bcb4d195/iso-ts-10832-2009)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/f989ee4b-a2c1-4f5b-ae28-a6d1bcb4d195/iso-ts-10832-2009>



Numéro de référence
ISO/TS 10832:2009(F)

© ISO 2009

PDF – Exonération de responsabilité

Le présent fichier PDF peut contenir des polices de caractères intégrées. Conformément aux conditions de licence d'Adobe, ce fichier peut être imprimé ou visualisé, mais ne doit pas être modifié à moins que l'ordinateur employé à cet effet ne bénéficie d'une licence autorisant l'utilisation de ces polices et que celles-ci y soient installées. Lors du téléchargement de ce fichier, les parties concernées acceptent de fait la responsabilité de ne pas enfreindre les conditions de licence d'Adobe. Le Secrétariat central de l'ISO décline toute responsabilité en la matière.

Adobe est une marque déposée d'Adobe Systems Incorporated.

Les détails relatifs aux produits logiciels utilisés pour la création du présent fichier PDF sont disponibles dans la rubrique General Info du fichier; les paramètres de création PDF ont été optimisés pour l'impression. Toutes les mesures ont été prises pour garantir l'exploitation de ce fichier par les comités membres de l'ISO. Dans le cas peu probable où surviendrait un problème d'utilisation, veuillez en informer le Secrétariat central à l'adresse donnée ci-dessous.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO/TS 10832:2009](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/f989ee4b-a2c1-4f5b-ae28-a6d1bcb4d195/iso-ts-10832-2009)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/f989ee4b-a2c1-4f5b-ae28-a6d1bcb4d195/iso-ts-10832-2009>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2009

Droits de reproduction réservés. Sauf prescription différente, 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 et les microfilms, sans l'accord écrit de l'ISO à l'adresse ci-après ou du 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
Web www.iso.org

Publié en Suisse

Sommaire

Page

Avant-propos	iv
Introduction.....	vi
1 Domaine d'application	1
2 Références normatives	1
3 Termes, définitions et termes abrégés.....	2
4 Méthodes d'essai.....	3
4.1 Principe.....	3
4.2 Conditions normales.....	3
5 Matériaux d'essai.....	3
5.1 Eau distillée.....	3
5.2 Matériel biologique.....	3
5.3 Substrat témoin	4
5.4 Substance de référence	4
5.5 Bleu trypan.....	4
5.6 Appareillage	5
6 Conservation et préparation des échantillons	5
7 Mode opératoire.....	6
7.1 Système biologique.....	6
7.2 Préparation du mélange d'essai	6
7.3 Mise en place de l'essai	7
7.4 Choix de la concentration soumise à essai.....	9
7.5 Conditions de culture.....	9
7.6 Arrêt de l'essai	9
8 Calculs et expression des résultats	10
8.1 Calculs.....	10
8.2 Expression des résultats.....	10
9 Critères de validité	10
10 Rapport d'essai.....	10
Annexe A (informative) Dispositif expérimental	12
Annexe B (informative) Exemple de tableau de résultats.....	13
Annexe C (informative) Exemple de résultats.....	14
Annexe D (informative) Données de fidélité.....	16
Bibliographie.....	18

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 Normes internationales sont rédigées conformément aux règles données dans les Directives ISO/CEI, Partie 2.

La tâche principale des comités techniques est d'élaborer les Normes internationales. Les projets de Normes internationales adoptés par les comités techniques sont soumis aux comités membres pour vote. Leur publication comme Normes internationales requiert l'approbation de 75 % au moins des comités membres votants.

Dans d'autres circonstances, en particulier lorsqu'il existe une demande urgente du marché, un comité technique peut décider de publier d'autres types de documents:

- une Spécification publiquement disponible ISO (ISO/PAS) représente un accord entre les experts dans un groupe de travail ISO et est acceptée pour publication si elle est approuvée par plus de 50 % des membres votants du comité dont relève le groupe de travail;
- une Spécification technique ISO (ISO/TS) représente un accord entre les membres d'un comité technique et est acceptée pour publication si elle est approuvée par 2/3 des membres votants du comité.

Une ISO/PAS ou ISO/TS fait l'objet d'un examen après trois ans afin de décider si elle est confirmée pour trois nouvelles années, révisée pour devenir une Norme internationale, ou annulée. Lorsqu'une ISO/PAS ou ISO/TS a été confirmée, elle fait l'objet d'un nouvel examen après trois ans qui décidera soit de sa transformation en Norme internationale soit de son annulation.

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.

L'ISO/TS 10832 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 190, *Qualité du sol*, sous-comité SC 4, *Méthodes biologiques*.

La présente version corrigée de l'ISO/TS 10832:2009 inclut les corrections suivantes:

- À l'Article 1, à la fin de la dernière ligne, l'expression «aux déchets et aux mélanges sol et déchets» a été remplacée par «aux déchets, aux mélanges sol-déchets et aux boues».
- En 3.12, le terme «fraction massique» a été remplacé par le terme «concentration d'inhibition» et le symbole w_x a été modifié en Cl_x ; le terme «fraction massique» a été remplacé par le terme «concentration» dans la définition et une note a été ajoutée.

De plus, le terme «fraction massique» a été remplacé par le terme «concentration» en 4.1, à l'Article 6, en 7.4, 8.1 et 8.2 ainsi que dans les Annexes B, C et D; le symbole w_x a été modifié en Cl_x (ou le symbole w_{50} modifié en Cl_{50}) en 4.1, 5.4 (modifié), 8.1 et dans l'Annexe C.

- En 5.2.4, la rédaction de la dernière phrase a été améliorée.

- En 5.5, la Figure 1 a) a été remplacée.
- En 7.1.2, à la dernière ligne, la référence croisée «(5.6.2)» a été remplacée par l'expression «comme décrit en 7.3».
- En 7.2.2, 7.2.3, 7.2.4 et 7.2.5, la dernière phrase a été modifiée pour remplacer l'expression «Poursuivre l'essai» par «Procéder».
- En 7.3, la référence croisée «(3.9)» a été remplacée par l'expression «préparé conformément à 7.1.2».
- En 7.6, au début de l'avant-dernière phrase, le terme «sols» a été remplacé par l'expression «matrices solides». De plus, à la fin de la dernière phrase, l'expression «des spores à compter» a été modifiée en «de spore à considérer comme spore germée».
- À l'Article 9, la dernière phrase a été déplacée en 5.4.
- Dans les Tableaux B.1 et C.1, «mg/kg» a été modifié en «mg·kg⁻¹».

iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

[ISO/TS 10832:2009](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/f989ee4b-a2c1-4f5b-ae28-a6d1bcb4d195/iso-ts-10832-2009)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/f989ee4b-a2c1-4f5b-ae28-a6d1bcb4d195/iso-ts-10832-2009>

Introduction

Les champignons mycorhizogènes sont d'importants composants de la communauté microbienne du sol et sont des organismes clés dans les systèmes sol-plante. La symbiose racinaire qu'ils forment représente un lien direct entre le sol et la grande majorité des espèces de plantes vasculaires (80 %) dans les environnements naturels et agricoles. La plante hôte en tire plusieurs bénéfices, au nombre desquels on peut citer une stimulation de la croissance, une amélioration de la nutrition minérale, une plus grande résistance à la sécheresse et une protection contre les agents pathogènes et le stress lié aux métaux lourds.

Plusieurs études ont montré que les champignons mycorhizogènes sont sensibles aux polluants tels que les éléments traces métalliques et les hydrocarbures aromatiques polycycliques, ainsi qu'aux boues d'épuration, et ce même en l'absence d'effets phytotoxiques observés sur la plante hôte. Les champignons mycorhizogènes remplissant la plupart des critères requis des organismes bio-indicateurs (ubiquité dans le sol, sensibilité aux polluants, rôle écologique pertinent dans la santé des plantes et au sein des écosystèmes), il est apparu important de les prendre en considération dans l'appréciation de la toxicité et des risques environnementaux liés aux polluants, aux sols contaminés et à l'utilisation de boues d'épuration en agriculture.

La germination des spores chez un champignon mycorhizogène à arbuscules, *Glomus mosseae*, forme la base de l'essai proposé. Cet essai concerne la première phase de la symbiose, tandis qu'un autre essai, basé sur la colonisation racinaire de la plante hôte, est également en cours d'étude.

Cet essai peut être réalisé directement avec des boues ou des sols sans aucune étape d'extraction.

ITeH STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO/TS 10832:2009](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/f989ee4b-a2c1-4f5b-ae28-a6d1bcb4d195/iso-ts-10832-2009)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/f989ee4b-a2c1-4f5b-ae28-a6d1bcb4d195/iso-ts-10832-2009>

Qualité du sol — Effets des polluants vis-à-vis des champignons mycorrhizogènes — Essai de germination des spores

1 Domaine d'application

La présente Spécification technique spécifie une méthode d'évaluation des effets de polluants sur la germination des spores d'un champignon mycorrhizogène, *Glomus mosseae*. Ce bio-essai de toxicité aiguë directe permet d'évaluer les effets potentiels de polluants et de sols contaminés sur des micro-organismes bénéfiques du sol qui sont importants pour la croissance des plantes dans le concept d'une agriculture durable.

La présente Spécification technique est applicable:

- aux substances chimiques, et
- aux sols contaminés, aux déchets, aux mélanges sol-déchets et aux boues.

(standards.iteh.ai)

2 Références normatives

[ISO/TS 10832:2009](#)

Les documents de référence suivants sont indispensables pour 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 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 11263, *Qualité du sol — Dosage du phosphore — Dosage spectrométrique du phosphore soluble dans une solution d'hydrogénocarbonate de sodium*

ISO 11268-1, *Qualité du sol — Effets des polluants vis-à-vis des vers de terre (Eisenia fetida) — Partie 1: Détermination de la toxicité aiguë en utilisant des substrats de sol artificiel*

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*

3 Termes, définitions et termes abrégés

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

3.1 champignon mycorrhizogène
micro-organisme ubiquiste formant une association symbiotique avec les racines d'espèces de plantes vasculaires

3.2 BEG
IBG
Banque internationale des glomérromycètes

3.3 spore
unité reproductrice asexuée d'un champignon

3.4 sporocarpe
groupe de spores entouré de mycélium

3.5 mycélium
réseau ramifié formé d'hyphes

3.6 hyphes
filaments qui composent le mycélium d'un champignon

3.7 substrat témoin
substrat inerte n'affectant pas la germination des spores, utilisé comme témoin ou diluant

3.8 matrice
sol, boues ou déchets soumis à essai

3.9 sandwich
dispositif formé de deux membranes filtrantes en nitrocellulose contenant les spores

NOTE Les deux membranes sont maintenues ensemble au moyen de deux cadres de diapositive.

3.10 coloration au bleu trypan
coloration non vitale au bleu trypan utilisée pour rendre visibles les structures des champignons mycorrhizogènes (colorées en bleu)

3.11 mélange d'essai
mélange d'une substance ou d'une matrice d'essai avec un substrat témoin

3.12 concentration d'inhibition
 CI_x
concentration de substance ou de matrice d'essai induisant une inhibition de x % de la germination des spores par rapport au témoin

NOTE La «fraction massique» est généralement connue sous le terme «concentration» dans les méthodes biologiques.

4 Méthodes d'essai

4.1 Principe

Des spores de *Glomus mosseae* sont placées entre deux membranes filtrantes en nitrocellulose, formant un sandwich (3.9) que l'on place dans une boîte de Petri contenant le mélange d'essai (3.11) qui contient la substance ou la matrice d'essai (3.8) à différentes concentrations, diluée ou non avec le substrat témoin (3.7).

Le pourcentage de spores germées est déterminé au bout de 14 jours.

Les résultats sont comparés à un substrat témoin et utilisés pour estimer la concentration d'inhibition à 50 % (CI_{50}) de la germination des spores.

La détermination d'une autre CI_x est également possible, mais pas nécessaire.

NOTE La présente méthode peut être utilisée pour déterminer l'effet d'une concentration unique.

4.2 Conditions normales

Utiliser une chambre de culture ou une pièce climatisée à $(24 \pm 2)^\circ\text{C}$.

L'incubation est effectuée à l'obscurité (chambre obscure ou boîtes de Petri entourées de papier d'aluminium).

5 Matériaux d'essai

5.1 Eau distillée

Il convient que le pH de l'eau distillée soit neutre et jamais inférieur à 5,5.

[ISO/TS 10832:2009](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/f989ee4b-a2c1-4f5b-ae28-a6d1bcb4d195/iso-ts-10832-2009)

5.2 Matériel biologique

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/f989ee4b-a2c1-4f5b-ae28-a6d1bcb4d195/iso-ts-10832-2009>

5.2.1 Champignon

Groupe taxonomique: Eumycota, ordre des Gloméromycètes (Glomeromycota).

Espèce: *Glomus mosseae* (Nicolson & Gerdeman) Gerdeman & Trappe (BEG 12).

5.2.2 Stade de vie

Utiliser des spores matures.

5.2.3 Identification

Numéro d'identification Genbank: U96139 (sous-unité 18S de l'ADNr); YO7656 (séquence partielle de la sous-unité 25S de l'ADNr) (25, 26).

5.2.4 Matériel

Utiliser des sporocarpes (3.4) contenant des spores (3.3) (voir Figure 1) achetés dans le commerce¹⁾. Utiliser des cultures en pot de moins de cinq mois pour extraire les sporocarpes.

Le pourcentage de germination des spores doit être supérieur à 75 %. Conserver les spores et les sporocarpes dans de l'eau distillée (5.1) à 4 °C.

1) Les sporocarpes du champignon *Glomus mosseae*, produits et distribués par BioRize, sont un exemple de produit approprié disponible sur le marché. 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.

Les sporocarpes doivent être utilisés dans un délai d'une semaine et les spores dans un délai de deux jours.

5.3 Substrat témoin

Utiliser du sable ou un sol artificiel conformément à l'ISO 11268-1 comme substrat témoin (3.7).

Utiliser un sable d'une teneur en silice supérieure à 99 %, de pH compris entre 6,6 et 7,5, d'une granulométrie de 0,8 mm à 1,6 mm, lavé trois fois à l'eau distillée (pH > 6) (5.1) puis séché. Le pH final doit être supérieur à 6 (voir l'ISO 10390).

Vérifier que la germination des spores dans le substrat témoin avant la mise en place du bio-essai est supérieure à 75 %.

5.4 Substance de référence

Utiliser le nitrate de cadmium ($\text{CdNO}_3, 4\text{H}_2\text{O}$).

À titre d'information, la valeur de Cl_{50} dans le sable, mesurée au cours d'un essai comparatif ($n = 4$) réalisé avec du nitrate de cadmium, était comprise entre $0,15 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ et $1,7 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$.

5.5 Bleu trypan

Utiliser le bleu trypan²⁾, 0,5 g dans 50 ml de HCl 1 %, 450 ml d'eau et 500 ml de glycérol.

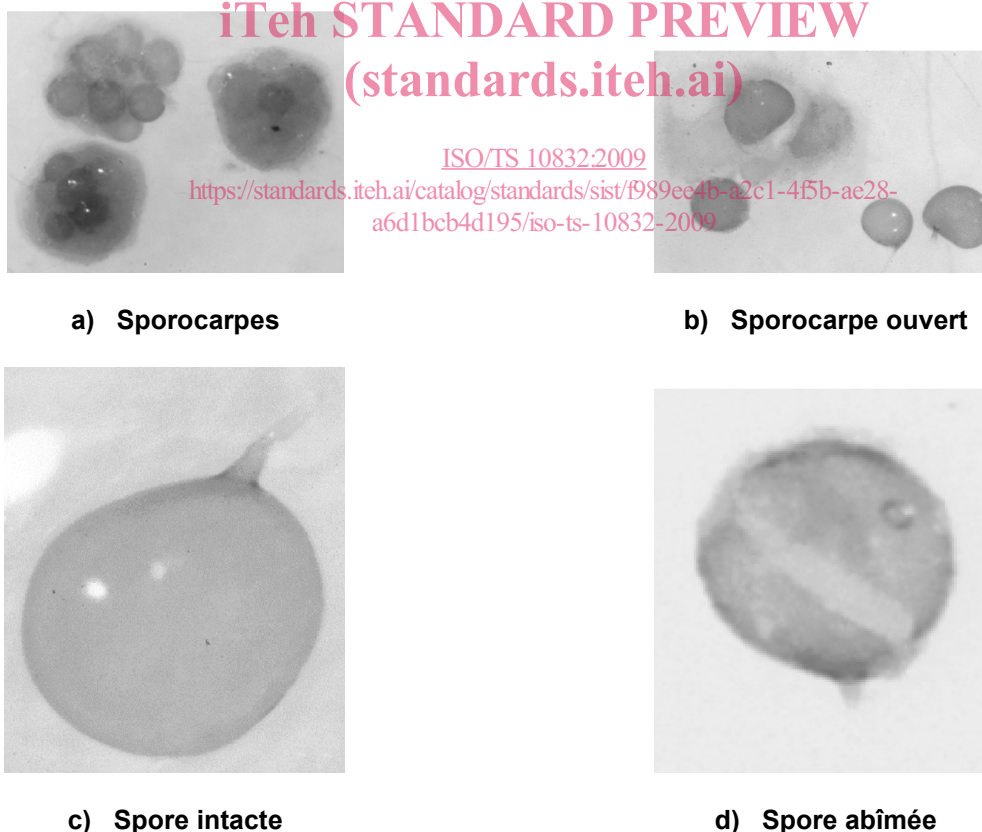


Figure 1 — Sporocarpes et spores de *Glomus mosseae*

2) Le bleu trypan référencé 93595, distribué par Sigma Aldrich, est un exemple de produit approprié disponible sur le marché. 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.

5.6 Appareillage

- 5.6.1 **Microscope binoculaire**, grandissement $\times 32$.
- 5.6.2 **Boîtes de Petri stériles en plastique**, diamètre 9 cm.
- 5.6.3 **Cadres de diapositive**, 24 mm \times 36 mm.
- 5.6.4 **Membranes filtrantes en nitrocellulose**, diamètre 47 mm, porosité 0,45 μm , blanches, quadrillage 3 mm.
- 5.6.5 **Pincés ultra-fines**³⁾.
- 5.6.6 **Papier filtre**.
- 5.6.7 **Microtube en plastique**, de contenance 1,5 ml.
- 5.6.8 **Film plastique**.
- 5.6.9 **Micropipette et pointes coupées à l'extrémité**.
- 5.6.10 **Balance**, capable de peser de 0 g à 200 g avec une précision de 0,001 g.
- 5.6.11 **Entonnoir**.

iTeh STANDARD PREVIEW

6 Conservation et préparation des échantillons

Les échantillons de sol doivent être conservés comme spécifié dans l'ISO 10381-6. Les échantillons de déchets et de boues sont conservés à $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$ dans des récipients hermétiques. Il convient de ne pas remplir complètement les récipients utilisés pour les boues et déchets microbiologiquement actifs.

Il convient de déterminer les paramètres suivants pour les sols, les déchets et les boues devant être soumis à essai:

- pH (voir l'ISO 10390); utiliser un sol dont le pH n'est pas inférieur à 5,5 (voir Référence [18]);
- teneur en eau (voir l'ISO 11465);
- capacité de rétention d'eau (voir l'ISO 11274);
- teneur en phosphore disponible (voir l'ISO 11263);
- la concentration en phosphore soluble doit être inférieure à $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (voir Références [1], [2], [7] et [23]).

Utiliser des sols ou des déchets de granulométrie inférieure à 4 mm pour réaliser le bio-essai; sinon, il convient de broyer les déchets et de les passer au tamis de 4 mm et de passer les sols au tamis de 4 mm avant de préparer le mélange d'essai.

3) Les pincés coupantes ultra-fines référencées T5130 n°5, distribuées par Oxford Instruments, sont un exemple de produit approprié disponible sur le marché. 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.