
**Qualité de l'eau et du sol —
Détermination de l'effet toxique
d'échantillons de sédiment et de
sol sur la croissance, la fertilité et
la reproduction de *Caenorhabditis
elegans* (Nematodes)**

iTeh STANDARD PREVIEW

(standards.iteh.ai)
*Water and soil quality — Determination of the toxic effect of
sediment and soil samples on growth, fertility and reproduction of
Caenorhabditis elegans (Nematoda)*

ISO 10872:2020

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/748a1e1b-c79d-40e5-8bb3-ac788df7568a/iso-10872-2020>



iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 10872:2020](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/748a1e1b-c79d-40e5-8bb3-ac788df7568a/iso-10872-2020)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/748a1e1b-c79d-40e5-8bb3-ac788df7568a/iso-10872-2020>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2020

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

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

Publié en Suisse

Sommaire

Page

Avant-propos.....	iv
Introduction.....	v
1 Domaine d'application	1
2 Références normatives	1
3 Termes et définitions	1
4 Principe	2
5 Réactifs et milieux	3
6 Appareillage	6
7 Substance de référence	7
8 Organismes	7
8.1 Organisme d'essai.....	7
8.2 Source nutritive.....	7
9 Cultures mères et pré-cultures	8
9.1 Cultures mères.....	8
9.1.1 <i>Caenorhabditis elegans</i>	8
9.1.2 <i>Escherichia coli</i>	8
9.2 Pré-culture.....	8
10 Mode opératoire	8
10.1 Préparation du milieu nutritif.....	8
10.2 Préparation du matériau d'essai et des témoins.....	9
10.2.1 Sol.....	9
10.2.2 Sédiment.....	9
10.2.3 Eau interstitielle éluatriat, extrait.....	10
10.2.4 Solution de substance de référence.....	10
10.3 Essai.....	10
10.4 Séparation des nématodes.....	10
10.5 Mesurages et calculs.....	11
10.5.1 Taux de récupération.....	11
10.5.2 Mâles.....	11
10.5.3 Croissance et fertilité.....	11
10.5.4 Reproduction.....	12
10.6 Planification de l'essai.....	13
11 Critères de validité	13
12 Expression des résultats	14
13 Rapport d'essai	14
Annexe A (informative) Détermination de la capacité maximale de rétention d'eau (CRE_{max})	16
Annexe B (informative) Illustrations et photos de vers adultes <i>C. elegans</i>	17
Annexe C (informative) Méthode micropipette (10.3)	19
Annexe D (informative) Données relatives à la performance	20
Bibliographie	24

Avant-propos

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

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

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

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

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

Le présent document a été élaboré par le comité technique ISO/TC 147, *Qualité de l'eau*, sous-comité SC 5, *Méthodes biologiques*.

Cette deuxième édition annule et remplace la première édition (ISO 10872:2010), qui a fait l'objet d'une révision technique. Les principales modifications par rapport à l'édition précédente sont les suivantes:

- modification du titre afin d'atteindre une meilleure perception dans le domaine de la toxicité du sol;
- pour les essais sur sols, modification de la méthode en termes de réduction de la teneur en eau du matériau d'essai;
- réactualisation des références et normes citées;
- ajout d'informations sur le sol témoin et de limitations applicables aux sols soumis à essai;
- révision éditoriale du document.

Il convient que l'utilisateur adresse tout retour d'information ou toute question concernant le présent document à l'organisme national de normalisation de son pays. Une liste exhaustive desdits organismes se trouve à l'adresse www.iso.org/fr/members.html.

Introduction

Les nématodes comptent parmi les métazoaires les plus abondants et les plus riches en espèces dans les sédiments^[1] et les sols^[2] et occupent des positions clés dans les réseaux trophiques benthiques et les réseaux trophiques terrestres, en raison du développement des différents types d'alimentation (bactérovores, alguivores, fongivores et herbivores, omnivores, prédateurs, voir Références [3] et [4]). De plus, ils sont tous reconnus comme des indicateurs environnementaux pour évaluer la toxicité des produits chimiques et la qualité des sédiments et des sols (voir Références [5], [6], [7], [8] et [9]).

L'organisme d'essai *Caenorhabditis elegans* (Maupas, N2 var. Bristol) est un nématode bactérovore que l'on trouve principalement dans les matières végétales en décomposition riches en microbes (voir Référence [10]) et appartient à la famille des Rhabditidae, souvent présents dans les sols terrestres et les sédiments aquatiques (voir Références [11] et [12]). De plus, des individus de *C. elegans* ont déjà été trouvés dans les sédiments de systèmes d'eau douce polysaprobés (voir Références [13] et [14]). En raison de sa facilité de culture et de son cycle de vie court,^[15] *C. elegans* est devenu un organisme modèle bien étudié dans le domaine de la recherche biomédicale et écotoxicologique (voir Références [16], [17] et [18]).

L'essai est conçu pour mesurer la réponse aux substances dissoutes et liées à des particules.^[19] Il s'applique aux sédiments, aux sols, aux déchets, à l'eau interstitielle, aux éluviats et aux extraits aqueux (voir, par exemple, Références [20], [21], [22] et [23]).

iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

ISO 10872:2020

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/748a1e1b-c79d-40e5-8bb3-ac788df7568a/iso-10872-2020>

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 10872:2020

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/748a1e1b-c79d-40e5-8bb3-ac788df7568a/iso-10872-2020>

Qualité de l'eau et du sol — Détermination de l'effet toxique d'échantillons de sédiment et de sol sur la croissance, la fertilité et la reproduction de *Caenorhabditis elegans* (Nématodes)

AVERTISSEMENT — Il convient que l'utilisateur du présent document connaisse bien les pratiques courantes de laboratoire. Le présent document n'a pas pour but de traiter de tous les problèmes de sécurité qui sont, le cas échéant, liés à son utilisation. Il incombe à l'utilisateur d'établir des pratiques appropriées en matière d'hygiène et de sécurité.

IMPORTANT — Il est absolument essentiel que les essais réalisés conformément au présent document soient effectués par du personnel ayant suivi une formation appropriée.

1 Domaine d'application

Le présent document spécifie une méthode de détermination de la toxicité d'échantillons environnementaux sur la croissance, la fertilité et la reproduction de *Caenorhabditis elegans*. La méthode s'applique aux sédiments d'eau douce contaminés (salinité maximale de 5 g/l), sols et déchets, ainsi qu'à l'eau interstitielle, aux éluviats et aux extraits aqueux obtenus à partir de sédiments contaminés, sols et déchets.

2 Références normatives

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

ISO 5667-16, *Qualité de l'eau — Échantillonnage — Partie 16: Lignes directrices pour les essais biologiques des échantillons*

ISO 7027-2, *Qualité de l'eau — Détermination de la turbidité — Partie 2: Méthodes semi-quantitatives pour l'évaluation de la transparence des eaux*

3 Termes et définitions

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

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

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

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

3.1

boîte de gélose

boîte de Petri remplie de gélose de croissance des nématodes (NGM)

3.2

témoin aqueux

eau servant de témoin négatif pour les essais sur échantillons aqueux

3.3
sédiment témoin artificiel
sédiment artificiel défini

3.4
culture mère bactérienne
culture mère de bactéries utilisée comme nourriture

3.5
blanc
réplicat supplémentaire ne contenant pas d'organisme d'essai mais traité de la même façon que les autres répliqués d'un échantillon

3.6
témoin
traitement servant de témoin négatif auquel est comparé l'effet sur le matériau d'essai correspondant

3.7
sol témoin
sol standard défini

3.8
larve dauer
stade de développement adopté par *C. elegans* pour supporter des périodes de pénurie alimentaire

Note 1 à l'article: à l'article Les larves dauer poursuivent leur développement normal en cas d'apport de nourriture.

3.9
organismes d'essai exposés

individus de *C. elegans* introduits au début de l'essai 10872:2020

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/748a1e1b-c79d-40e5-8bb3-ac788df7568a/iso-10872-2020>

3.10
milieu nutritif
suspension bactérienne aqueuse définie

3.11
stade J₁
premier des quatre stades juvéniles (J₁ à J₄) au cours du développement de *C. elegans*

3.12
capacité maximale de rétention d'eau
CRE_{max}
quantité maximale d'eau qu'un échantillon de sol est capable d'absorber et de retenir malgré la gravité

3.13
culture nocturne
culture définie d'*Escherichia coli* dans du milieu Bouillon de Lysogénie (LB)

3.14
boîte sans nourriture
boîte de gélose (3.1) avec des larves dauer

3.15
matériau d'essai
portion discrète d'un échantillon environnemental contaminé ou solution de la substance de référence

4 Principe

Les organismes juvéniles de l'espèce *C. elegans* sont exposés à l'échantillon environnemental pendant une période de 96 h. Dans les témoins, les organismes d'essai exposés peuvent accomplir un cycle de

vie complet au cours de cette période. La toxicité peut être quantifiée par l'intensité de l'effet sous la forme d'un pourcentage d'inhibition. Un effet toxique de l'échantillon environnemental est observé si l'inhibition de la croissance, de la fertilité ou de la reproduction de *C. elegans* comparée au témoin (témoin aqueux, sédiment ou sol témoin) dépasse une certaine valeur seuil (par exemple, comme proposé dans les publications suivantes: milieu aqueux: 10 %, 20 %, 10 % d'inhibition, respectivement (voir Référence [24]); sédiments d'eau douce: 25 %, 20 %, 50 % d'inhibition, respectivement (voir Référence [21]); sol: 10 %, 20 %, 40 % d'inhibition, respectivement (voir Référence [20]), et le résultat des critères de toxicité dans le matériau d'essai est statistiquement significativement moins élevé que celui des témoins ($p < 0,05$).

5 Réactifs et milieux

Utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue.

5.1 Eau, distillée ou déionisée ou eau d'une pureté équivalente, conductivité $\leq 10 \mu\text{S/cm}$.

5.2 Milieu LB

Dissoudre

- 0,5 g de peptone de caséine;
- 0,25 g d'extrait de levure;
- 0,5 g de chlorure de sodium (NaCl);

dans 50 ml d'eau dans une fiole de 250 ml et autoclaver pendant 20 min à 121 °C.

5.3 Solution mère de cholestérol ISO 10872:2020

Dissoudre 500 mg de cholestérol en poudre dans 100 ml d'éthanol absolu (pureté > 99 %) en agitant et en chauffant légèrement ($< 50 \text{ °C}$). Remplacer l'éthanol perdu par évaporation.

5.4 Solution mère de chlorure de calcium, 1 mol/l CaCl_2

Dissoudre 7,35 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dans 50 ml d'eau et autoclaver pendant 20 min à 121 °C.

5.5 Solution mère de sulfate de magnésium, 1 mol/l MgSO_4

Dissoudre 12,35 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dans 50 ml d'eau et autoclaver pendant 20 min à 121 °C.

5.6 Hydroxyde de potassium, KOH, pastilles.

5.7 Solution tampon de phosphate de potassium, 1 mol/l KH_2PO_4

Dissoudre 13,6 g de KH_2PO_4 dans 100 ml d'eau, ajuster le pH à $6,0 \pm 0,2$ avec du KOH (5.6) et autoclaver pendant 20 min à 121 °C.

5.8 Milieu gélosé de croissance des nématodes (gélose NGM)

Dissoudre

- 2,5 g de peptone de caséine;
- 17 g de gélose bactériologique;
- 3 g de NaCl;

ISO 10872:2020(F)

dans 900 ml d'eau dans une fiole de 1 000 ml et autoclaver pendant 20 min à 121 °C. Après refroidissement à 55 °C, ajouter les solutions stériles suivantes:

- 1 ml de solution mère de cholestérol (voir en [5.3](#));
- 1 ml de solution mère de chlorure de calcium (voir en [5.4](#));
- 1 ml de solution mère de sulfate de magnésium (voir en [5.5](#));
- 25 ml de solution tampon de phosphate de potassium (voir en [5.7](#));

et compléter à 1 000 ml avec de l'eau stérile.

Transférer des portions de gélose NGM (20 ml à 25 ml environ) dans des boîtes de Petri stériles.

5.9 Milieu M9

Dissoudre

- 6 g de Na_2HPO_4 ;
- 3 g de KH_2PO_4 ;
- 5 g de NaCl ;
- 0,25 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$;

dans 1 000 ml d'eau dans une fiole de 1 000 ml.

5.10 Solution mère de rose Bengale

Ajouter environ 30 mg de rose Bengale à 100 ml d'eau et agiter soigneusement.

5.11 Suspension de Ludox

Diluer du Ludox TM 50¹⁾ (silice colloïdale; masse volumique: $1,4 \text{ g/cm}^3$) avec de l'eau, jusqu'à une masse volumique de $(1,13 \pm 0,005) \text{ g/cm}^3$ [mélanger environ 1 part de Ludox TM 50¹⁾ avec 2 parts d'eau et contrôler la masse volumique en pesant 1 ml de la suspension sur une balance; 1 ml de la suspension pèse $(1,13 \pm 0,005) \text{ g}$]. Pour une plaque multi-puits de 12 ou 24 puits, environ 75 ml ou 150 ml de suspension de Ludox sont respectivement nécessaires.

5.12 Sédiment témoin artificiel

Mélanger soigneusement les composés suivants dans les proportions indiquées:

- Al_2O_3 , 20 % (fraction massique);
- CaCO_3 , 1 % (fraction massique);
- dolomite (argile), 0,5 % (fraction massique);
- Fe_2O_3 , 4,5 % (fraction massique);
- sable de silice (par exemple: W4, granulométrie moyenne: 0,063 mm), 30 % (fraction massique);
- sable de silice (de 0,1 mm à 0,4 mm), 40 % (fraction massique);

1) Ludox™ 50 est un exemple de produit approprié disponible sur le marché. Cette information est donnée par souci de commodité à l'intention des utilisateurs du présent document et ne saurait constituer un engagement de l'ISO à l'égard de ce produit.

- tourbe (tourbe décomposée à partir de haute tourbière, non traitée, finement moulue et tamisée à < 1 mm), 4 % (fraction massique).

Le sédiment sec peut être conservé sans limitation.

Ce sédiment sert de témoin négatif pour les essais sur sédiments.

AVERTISSEMENT — Les sédiments artificiels ayant une teneur en kaolin supérieure à 5 % (OCDE 218 par exemple) peuvent provoquer des effets négatifs sur la croissance, la fertilité et la reproduction de *C. elegans*. Si un sédiment témoin artificiel différent de celui proposé dans la présente norme est utilisé, la teneur en kaolin doit être inférieure ou égale à 5 % (fraction massique).

AVERTISSEMENT — Si possible, il est conseillé d'utiliser un sédiment de référence spécifique du site, en plus du sédiment témoin artificiel; le sédiment de référence doit remplir les critères suivants: limite de contamination; les propriétés importantes du sédiment doivent être similaires à celles de l'échantillon soumis à essai (par exemple, distribution granulométrique, teneur en matière organique).

5.13 Sol témoin

Sol standard St. 2.2, de l'institut LUFA:

- type de sol: sable limoneux;
 - carbone organique: $(2,0 \pm 0,5)$ % (fraction massique);
 - pH (CaCl_2): $5,5 \pm 0,5$;
 - capacité d'échange cationique: $(10,0 \pm 0,4)$ mmol_c/100 g;
- NOTE mmol_c/100 g est synonyme de meq/100 g.
- capacité de rétention d'eau: $(48,2 \pm 5)$ %;
 - teneur en argile: $(7,5 \pm 2,5)$ % (fraction massique) de particules < 0,002 mm;
 - teneur en limon: $(12,5 \pm 2,5)$ % (fraction massique) de particules de 0,002 mm à 0,063 mm;
 - teneur en sable: $(80,0 \pm 5,0)$ % (fraction massique) de particules de 0,063 mm à 2 mm.

Ce sol sert de témoin négatif pour les essais sur sols.

NOTE LUFA signifie Landwirtschaftliche Untersuchungs- und Forschungsanstalt Speyer.

AVERTISSEMENT — Si les sols soumis à essai contiennent plus de 30 % d'argile (même dans les sols non contaminés), des effets inhibiteurs sur la croissance et la reproduction de *C. elegans* peuvent dépasser le seuil de toxicité. Dans ce cas, un sol de référence ayant une teneur en argile similaire doit être soumis à essai en complément du sol témoin.

AVERTISSEMENT — Les sols artificiels ayant une teneur en kaolin supérieure à 5 % (OCDE 207 par exemple) peuvent provoquer des effets négatifs sur la croissance, la fertilité et la reproduction de *C. elegans*. Si un sol témoin artificiel différent de celui proposé dans la présente norme est utilisé, la teneur en kaolin doit être inférieure ou égale à 5 % (fraction massique).

5.14 Chlorure d'hexadécylbenzyltriméthylammonium monohydrate, solution mère (BAC-C16)

Dissoudre 30 mg de BAC-C16 ($\text{C}_{25}\text{H}_{46}\text{ClN}$, H_2O ; numéro CAS: 122-18-9) dans 1 000 ml d'eau.

5.15 Glycérol (>98 %; Ph. Eu., anhydre)

5.16 **Formazine**: solution d'étalonnage de turbidité 4 000 NTU

6 Appareillage

6.1 **Autoclave**

6.2 **Installations**, à température constante à 20 °C et 37 °C, par exemple incubateur ou chambre thermostatée.

6.3 **Spatule de Drigalski**, spatule en verre pour répartir les bactéries sur une boîte de gélose.

6.4 **Erlenmeyers**, d'un volume de 250 ml, par exemple.

6.5 **Flacons en plastique**, autoclavables et hermétiquement clos, d'un volume de 1,5 ml.

6.6 **Gaze filtrante**, 5 µm, 10 µm.

6.7 **Congélateur**, pouvant être maintenu à une température de -20 °C.

6.8 **Micropipette (voir [Annexe C](#))**.

Étirer une pipette Pasteur sur un bec Bunsen pour former un fin capillaire. Raccorder la pipette Pasteur à une poire à son extrémité la plus épaisse.

6.9 **Microscope**, grossissement 100x, avec graduation.

6.10 **Thermomètre**, minimum-maximum.

6.11 **Agitateur**, pour les Erlenmeyers de 250 ml.

6.12 **Microscope stéréoscopique**, grossissement de 4x à 20x, à lumière transmise.

6.13 **Paillasse propre**

6.14 **Boîtes de Petri stériles**, de 3 cm, 6 cm ou 10 cm de diamètre.

6.15 **Spectromètre**, capable de fonctionner à une longueur d'onde de 600 nm.

6.16 **Agitateur pour tubes à essai**

6.17 **Balance**, lisible à 0,001 g.

6.18 **Étuve**, à une température d'environ 80 °C.

6.19 **Plaque multi-puits**, avec 12 puits, 3,5 cm²/puits (sédiment, eau); avec 24 puits, 1,9 cm²/puits (sol).

6.20 **Tubes à centrifuger**, de 10 ml à 15 ml.

6.21 **Centrifugeuse à rotor oscillant**

6.22 **Pipettes à piston**, de 10 ml à 100 ml et de 100 ml à 1 000 ml.