



Norme
internationale

ISO 18187

**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*

**Deuxième édition
2024-05**

Itch Standards
standards.itch.ai)
Document Preview

[ISO 18187:2024](https://standards.itch.ai/catalog/standards/iso/5faec532-51c1-4e56-b32f-787bfc7af2e7/iso-18187-2024)

<https://standards.itch.ai/catalog/standards/iso/5faec532-51c1-4e56-b32f-787bfc7af2e7/iso-18187-2024>

iTeh Standards
(<https://standards.iteh.ai>)
Document Preview

[ISO 18187:2024](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/5faec532-51c1-4e56-b32f-787bfc7af2e7/iso-18187-2024)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/5faec532-51c1-4e56-b32f-787bfc7af2e7/iso-18187-2024>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2024

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
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	4
5 Réactifs et matériaux	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	6
5.3 Substrats d'essai	6
5.4 Réactifs	7
6 Appareillage	9
7 Mode opératoire	10
7.1 Préparation des dilutions	10
7.2 Préparation des substances de référence et des témoins positifs	10
7.3 Mode opératoire de l'essai contact	11
7.3.1 Généralités	11
7.3.2 Aération	11
7.3.3 Désactivation	12
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	14
9 Validité de l'essai	14
10 Analyse statistique	15
11 Rapport d'essai	15
Annexe A (informative) Résultats de l'essai interlaboratoires	17
Annexe B (informative) Préparation des organismes d'essai	24
Annexe C (informative) Essais avec les substances chimiques	26
Bibliographie	28

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'ISO attire l'attention sur le fait que l'utilisation du présent document peut impliquer l'utilisation d'un ou de plusieurs brevets. L'ISO ne prend pas position quant à la preuve, à la validité ou à l'applicabilité de quelconques droits de propriété à ce propos. À la date de publication du présent document, l'ISO n'avait pas reçu notification qu'un ou plusieurs brevets pouvaient être nécessaires à sa mise en application. Toutefois, il y a lieu d'avertir les responsables de la mise en application du présent document que des informations plus récentes sont susceptibles de figurer dans la base de données de brevets, disponible à l'adresse www.iso.org/brevets. L'ISO ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié de tels droits de propriété et averti de leur existence.

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 www.iso.org/avant-propos.

Le présent document a été élaboré par le comité technique ISO/TC 190, *Qualité du sol*, sous-comité SC 4, *Caractérisation biologique*, en collaboration avec le comité technique CEN/TC 444, *Méthodes d'essai pour la caractérisation environnementale des matrices solides*, du Comité européen de normalisation (CEN) conformément à l'Accord de coopération technique entre l'ISO et le CEN (Accord de Vienne).

Cette deuxième édition annule et remplace la première édition (ISO 18187:2016), qui a fait l'objet d'une révision technique.

Les principales modifications sont les suivantes:

- le domaine d'application a été modifié afin d'inclure la possibilité d'appliquer l'essai contact pour l'évaluation des effets des produits chimiques (comme détaillé dans l'[Annexe C](#));
- des détails supplémentaires concernant d'autres facteurs d'interférence potentiels (pour les essais avec des plastiques et des déchets de faible densité) sur les performances de l'essai contact ont été fournis et des alternatives méthodologiques adéquates ont été proposées afin de réduire les incertitudes du résultat de l'essai;
- les critères de validité ont été actualisés afin d'inclure la gamme d'inhibition de l'activité déshydrogénase attendue avec trois autres substances de référence (c'est-à-dire sulfate de cuivre (II) pentahydraté, 3,5-dichlorophénol, sulfate de zinc heptahydraté) qui sont ajoutées au sable de quartz et utilisées en tant que témoins positifs alternatifs pour les essais de qualité des déchets;
- dans l'[Article B.4](#), le séquençage génomique est proposé pour confirmer l'identité de *Arthrobacter globiformis*, plutôt que les bandelettes d'identification microbiologique qui ne sont plus recommandées.

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

Le présent document 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 bactérienne des sols, ubiquitaire, présentant une forte affinité vis-à-vis des surfaces^{[1][2]} 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^{[3][4][5][6][7]}.

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 [8].

Le présent document se base également sur la Référence [9].

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 dans l'[Annexe A](#) et dans la Référence [10].

iTeh Standards
(<https://standards.iteh.ai>)
Document Preview

[ISO 18187:2024](#)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/5faec532-51c1-4e56-b32f-787bfc7af2e7/iso-18187-2024>

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

1 Domaine d'application

Le présent document 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. Bien qu'il ne s'agisse pas de sa principale finalité, l'essai contact peut également être utilisé pour l'évaluation des effets des produits chimiques, comme décrit dans l'Annexe C. L'essai permet d'obtenir un résultat en 6 h et peut donc être utilisé pour le criblage de matériaux d'essai potentiellement contaminés.

2 Références normatives

Les documents suivants sont cités dans le texte de sorte qu'ils 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 5667-15, *Qualité de l'eau — Échantillonnage — Partie 15: Lignes directrices pour la conservation et le traitement des échantillons de boues et de sédiments*

ISO 18400-206, *Qualité du sol — Échantillonnage — Partie 206: Collecte, manipulation et conservation de sols destinés à l'évaluation de paramètres biologiques fonctionnels et structurels en laboratoire*

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.

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 <https://www.electropedia.org/>

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* (3.13) B ou *inoculum* (3.12)].

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

3.3

témoin positif

échantillon d'un *substrat témoin* (3.6) contenant un mélange de solutions connues [eau distillée, *milieu* (3.13) 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 A.

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 B.

3.6

substrat témoin

substrat de référence ou standard, utilisé comme témoin et comme substrat de dilution pour la préparation des séries de dilutions/concentrations des *substrats d'essai* (3.7), d'une substance de référence ou d'un produit chimique

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 soumis à essai (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, dans des réactions d'oxydoréduction et de biosynthèse (la chaîne respiratoire, par exemple) nécessitant l'intégrité cellulaire pour être produites

Note 1 à l'article: Ces enzymes peuvent réduire la résazurine en résorufine dans l'environnement extracellulaire^[2].

Note 2 à l'article: Voir Référence ^[1].

3.10

CEx

concentration d'effet pour un effet de 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 CEx est exprimée sous la forme d'un pourcentage de sol ou de déchet soumis à essai (matière sèche) dans le mélange de sol (masse de matière sèche). Pour les produits chimiques, la concentration CEx est exprimée en masse de substance d'essai dans le substrat (équivalent sec), en milligrammes par kilogramme.

3.11

bactéries lyophilisées

culture bactérienne conservée en éliminant l'eau d'une suspension de cellules congelées, par sublimation sous vide

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 ensemercer 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 [\[12\]](#)).

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: Il s'agit du jour où le *substrat d'essai* ([3.7](#)) 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 nécessaire à l'enzyme pour réagir (à partir de l'ajout de la solution de résazurine jusqu'à la fin de la réaction cinétique)

3.17

penne

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 penne (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 préculture selon le mode opératoire d'essai.

3.20

dilution minimale sans effet

DMSE

plus faible niveau de dilution pour lequel l'essai n'aboutit pas à une réduction significative 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, la résazurine, indicateur coloré d'oxydoréduction non toxique, est ajoutée. L'activité déshydrogénase entraîne une transformation de la résazurine en résorufine dans l'environnement extracellulaire.^[2] La résorufine peut être détectée par fluorométrie (excitation à 535 nm, émission à 590 nm) en présence de matériau solide. L'augmentation de la 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 matériaux

5.1 Micro-organismes d'essai

ISO 18187:2024

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/5faec532-51e1-4e56-b32f-787bfc7af2e7/iso-18187-2024>

L'organisme utilisé pour cet essai est *Arthrobacter globiformis* (Conn 1982) Conn et Dimmick 1947¹⁾, qui est courant dans les sols. Les espèces de *Arthrobacter* appartiennent à la famille des *Micrococaceae*. Il s'agit principalement de micro-organismes aérobies stricts, même si certaines espèces peuvent présenter un mécanisme anaérobie dans des conditions limitantes en oxygène.^[13] *Arthrobacter* spp. sont chimiohétérotrophes et présentent des caractéristiques pléomorphes dans la mesure où ils présentent une modification de leur morphologie, de bâtonnet 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.^[14] Cependant, cette caractéristique n'induit aucune différence en matière de sensibilité entre les essais, dans la mesure où un inoculum en phase de croissance exponentielle est utilisé 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 parties aliquotes lyophilisées ou congelées disponibles dans le commerce issues de collections de cultures disponibles, par exemple auprès du Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (souche 20124), ou auprès de l'ARS Culture Collection

1) Souche ATCC 8010TM *Arthrobacter globiformis* (Conn) Conn et Dimmick.

NCAUR²⁾. Les suspensions bactériennes utilisées pour les mesurages 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](#).

5.2 Substrats témoins

5.2.1 Généralités

Il convient d'utiliser les substrats témoins sélectionnés en fonction des options présentées en [5.2.2](#) et [5.2.3](#) pour préparer à la fois des témoins négatifs (ajout d'eau distillée, voir [5.2.2](#), [5.2.3](#)) et positifs (ajout de la substance de référence, voir [7.2](#)). L'humidification des substrats témoins (sols ou déchets) doit être effectuée un ou deux jours avant le début de l'essai (voir [Tableau 1](#)). Conserver le ou les substrats à (4 ± 2) °C jusqu'au début de l'essai.

5.2.2 Témoin pour les sols

Il existe trois choix possibles de sol témoin (voir également Référence [\[15\]](#)). Le sol de référence [point a)] est préféré, mais si un tel sol n'est pas disponible, un sol naturel standard ou un sol artificiel standard peut être utilisé. Dans tous les cas, il convient d'ajuster la teneur en eau du sol témoin à 20 %.

- a) Si des sols de référence provenant de zones non contaminées proches d'un site contaminé sont disponibles, il convient de les traiter et de les caractériser comme les sols devant être soumis à essai. Si une contamination toxique ou des propriétés inhabituelles du sol ne peuvent être exclues, il convient de privilégier les sols témoins standard b) ou c).
- b) Sol naturel standard présentant les caractéristiques suivantes: $C_{org} \leq (1,7 \text{ à } 2,6) \%$; teneur en sable (granulométrie de 0,063 mm à 2 mm) de 50 % à 75 %; < 20 % de particules de moins de 0,02 mm; pH compris entre 5 et 7,5.
EXEMPLE Sol standard LUFA de type 2.2³⁾.
- c) Sol artificiel standard ou sable de quartz (50 % à 75 % de sable présentant une granulométrie comprise entre 0,063 mm et 2 mm; pH 5,5 à 6,5).

Le substrat appelé sol artificiel standard^[16] a la composition suivante:

	Pourcentage exprimé sur la base de la masse sèche
— Tourbe de sphaigne finement broyée et sans résidus de plante visible (granulométrie ≤ 1 mm)	5 %
— Argile kaolinique contenant moins de 30 % de kaolinite	20 %
— Sable de quartz industriel (majoritairement constitué de sable fin, 50 % à 75 % des grains présentant une granulométrie comprise entre 0,063 mm et 2 mm)	74 %

2) 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.

3) Le sol standard LUFA de type 2.2 est l'appellation commerciale d'un produit fourni par LUFA Speyer. Cette information n'est donnée aux utilisateurs de la présente Norme internationale que par souci de commodité et ne constitue en rien une recommandation de ce produit par l'ISO. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.