
**Qualité du sol — Détermination de la
biomasse microbienne du sol**

**Partie 2:
Méthode par fumigation-extraction**

*Soil quality — Determination of soil microbial biomass —
Part 2: Fumigation-extraction method*
(standards.iteh.ai)

ISO 14240-2:1997

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/3672fb9e-2ed2-4a5b-b16e-fa5859e70ed1/iso-14240-2-1997>



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 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.

La Norme internationale ISO 14240-2 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 190, *Qualité du sol*, sous-comité SC 4, *Méthodes biologiques*.

L'ISO 14240 comprend les parties suivantes, présentées sous le titre général *Qualité du sol — Détermination de la biomasse microbienne du sol*:

— *Partie 1: Méthode par respiration induite par le substrat*

— *Partie 2: Méthode par fumigation-extraction*

L'annexe A fait partie intégrante de la présente partie de l'ISO 14240. Les annexes B, C et D sont données uniquement à titre d'information.

[ISO 14240-2:1997](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/3672fb9e-2ed2-4a5b-b16e-fa5859e70ed1/iso-14240-2-1997)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/3672fb9e-2ed2-4a5b-b16e-fa5859e70ed1/iso-14240-2-1997>

© ISO 1997

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'éditeur.

Organisation internationale de normalisation
Case postale 56 • CH-1211 Genève 20 • Suisse
Internet central@iso.ch
X.400 c=ch; a=400net; p=iso; o=isocs; s=central

Imprimé en Suisse

Introduction

Le sol se compose d'éléments vivants et non vivants qui existent dans un milieu complexe et hétérogène. La microflore du sol est responsable de la dégradation de la matière organique, de la stabilité des agrégats et de la plupart des cycles nutritifs qui se produisent dans les sols. La détermination de la biomasse microbienne des sols a pour but de permettre d'évaluer le maintien permanent de la fertilité des sols, la capacité potentielle à dégrader les matières organiques, et les effets des matériaux ajoutés sur la population microbienne naturelle.

iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

[ISO 14240-2:1997](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/3672fb9e-2ed2-4a5b-b16e-fa5859e70ed1/iso-14240-2-1997)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/3672fb9e-2ed2-4a5b-b16e-fa5859e70ed1/iso-14240-2-1997>

Page blanche

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 14240-2:1997

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/3672fb9e-2ed2-4a5b-b16e-fa5859e70ed1/iso-14240-2-1997>

Qualité du sol — Détermination de la biomasse microbienne du sol —

Partie 2: Méthode par fumigation-extraction

1 Domaine d'application

La présente partie de l'ISO 14240 prescrit une méthode pour l'estimation de la biomasse microbienne des sols par mesurage de la matière extractible totale de biomasse organique, essentiellement à partir de microorganismes venant d'être tués. La méthode est également applicable à l'estimation de l'azote microbien et de l'azote microbien réagissant à la ninhydrine dans les sols; toutefois, seul le mesurage du carbone organique extractible est décrit dans le cadre de la présente partie de l'ISO 14240. La méthode par fumigation-extraction (FE) est applicable aux sols aérobies et anaérobies (saturés, irrigués) dans toute la gamme des pH du sol. La biomasse peut également être mesurée dans des sols contenant des substrats en décomposition active et dans des sols sursaturés de solution de sulfate de potassium.

NOTE — La fumigation au chloroforme affecte également la faune du sol. La contribution du carbone de ces organismes est généralement faible (< 5 %) et peut en règle générale être négligée.

2 Références normatives

Les normes suivantes contiennent des dispositions qui, par suite de la référence qui en est faite, constituent des dispositions valables pour la présente partie de l'ISO 14240. Au moment de la publication, les éditions indiquées étaient en vigueur. Toute norme est sujette à révision et les parties prenantes des accords fondés sur la présente partie de l'ISO 14240 sont invitées à rechercher la possibilité d'appliquer les éditions les plus récentes des normes indiquées ci-après. Les membres de la CEI et de l'ISO possèdent le registre des Normes internationales en vigueur à un moment donné.

ISO 10381-6:1993, *Qualité du sol — Échantillonnage — Partie 6: Lignes directrices pour la collecte, la manipulation et la conservation de sols destinés à une étude en laboratoire des processus microbiens aérobies.*

ISO 10694:1995, *Qualité du sol — Dosage du carbone organique et du carbone total après combustion sèche (analyse élémentaire).*

ISO 11465:1993, *Qualité du sol — Détermination de la teneur pondérale en matière sèche et en eau — Méthode gravimétrique.*

3 Définitions

Pour les besoins de la présente partie de l'ISO 14240, la définition suivante s'applique.

3.1 biomasse microbienne du sol

masse de cellules microbiennes intactes dans un sol donné

NOTE — Ce paramètre peut être estimé à partir du mesurage de la teneur en carbone ou en azote de ces cellules ou par le mesurage de leur aptitude à minéraliser une source de carbone ajoutée. Les cellules mortes et les fragments cellulaires peuvent être décelés en effectuant des analyses du carbone ou de l'azote, mais seules les cellules intactes seront détectées lors du mesurage de la respiration.

4 Principe

Par fumigation, les cellules microbiennes intactes sont lysées et la matière organique microbienne libérée. La matière organique non vivante du sol n'est pas sérieusement affectée par une telle fumigation. Les échantillons de sol sont fumigés au chloroforme pendant 24 h. Le carbone organique extrait par le sulfate de potassium à 0,5 mol/l est déterminé dans des échantillons fumigés et non fumigés, et l'augmentation du carbone organique extrait est utilisée pour déterminer le carbone de la biomasse microbienne. Cette méthode est généralement désignée sous le nom de fumigation-extraction (FE).

5 Réactifs et matériaux

5.1 Sols

Les lignes directrices relatives à la collecte, à la manipulation et à la conservation des sols (voir l'ISO 10381-6) doivent être suivies, dans la mesure du possible. Tamiser les échantillons de sol à environ 40 % de la capacité de rétention d'eau (CRE) si des échantillons homogènes sont requis.

Déterminer la capacité de rétention d'eau conformément à l'annexe A.

La teneur en eau des échantillons doit être supérieure à 30 % de la capacité de rétention d'eau du sol afin d'assurer une répartition uniforme du chloroforme et une fumigation efficace. Veiller à éviter de salir et de compacter le sol humide dans cette méthode. Les échantillons de sols saturés en eau ne doivent pas être séchés avant l'analyse.

5.2 Réactifs

Des réactifs de qualité analytique reconnue doivent être utilisés.

5.2.1 Graisse silicone, de viscosité moyenne.

5.2.2 Chloroforme exempt d'éthanol.

ISO 14240-2:1997

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/3672fb9e-2ed2-4a5b-b16e-6585970ad16e/iso-14240-2-1997>

AVERTISSEMENT — À la lumière, le chloroforme exempt d'éthanol se dégrade rapidement pour former du phosgène à l'état de gaz (COCl_2) qui est inodore et très toxique.

5.2.3 Sulfate de potassium, solution, $c(\text{K}_2\text{SO}_4) = 0,5 \text{ mol/l}$ ($\rho = 87,135 \text{ g/l}$).

5.2.4 Chaux sodée.

6 Appareillage

6.1 Local, ou incubateur, pouvant être maintenu à $(25 \pm 2) \text{ }^\circ\text{C}$.

6.2 Dessiccateur, protégé contre l'implosion.

6.3 Papier filtre¹⁾.

6.4 Bêchers en verre.

6.5 Boîtes de Petri.

¹⁾ Whatman N° 42, Schleicher & Schüll 595 1/2, Machery & Nagel 261 G 1/4 sont des exemples de produits appropriés disponibles sur le marché. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la présente partie de l'ISO 14240 et ne signifie nullement que l'ISO approuve ou recommande l'emploi exclusif des produits ainsi désignés.

6.6 Flacons en polyéthylène, de 250 ml de capacité.

6.7 Chaîne de vide (pompe à eau ou électrique).

6.8 Agitateur horizontal ou de type rotatif.

6.9 Congélateur, fonctionnant de -15 °C à -20 °C .

6.10 Granules régulateurs d'ébullition.

7 Fumigation et extraction

7.1 Fumigation

Garnir le dessiccateur (6.2) d'un papier filtre humide (6.3) pour la fumigation des échantillons de sol.

Peser au moins trois échantillons de sol humide (5.1), contenant chacun une masse équivalant à 25 g à 50 g de sol sec en les transvasant dans des béciers en verre (6.4) ou dans des boîtes de Petri (6.5) et les placer dans un dessiccateur avec un bécher contenant 25 ml de chloroforme exempt d'éthanol (5.2.2) et quelques granules régulateurs d'ébullition (6.10) ainsi qu'un bécher contenant de la chaux sodée (5.2.4). Faire le vide dans le dessiccateur jusqu'à forte ébullition du chloroforme pendant environ 2 min. Fermer le robinet du dessiccateur et incuber à l'obscurité (voir 6.1) à $(25 \pm 2)\text{ °C}$ pendant 22 h à 24 h.

S'il n'y a pas suffisamment de sol, utiliser des échantillons plus faibles à condition que le rapport de la masse de sol au volume d'extractant reste le même (1:4). Dans les sols contenant plus de 20 % de matière organique (déterminée conformément à l'ISO 10694), augmenter le rapport sol:extrait au-dessus de 1:4 (jusqu'à un maximum de 1:30 pour les sols contenant 95 % de matière organique, par exemple couche L) afin d'obtenir un extrait suffisant de matière. Noter la masse de sol utilisée.

À l'issue de la fumigation, retirer le bécher contenant le chloroforme et le papier filtre du dessiccateur. Éliminer les vapeurs de chloroforme du sol par mise sous vide répétée du dessiccateur (6 fois de 2 min chacune). Les échantillons sont prêts pour l'extraction.

Placer trois échantillons témoins humides non fumigés (50 g de masse sèche) dans des flacons en polyéthylène (6.6) et extraire immédiatement avec 200 ml de sulfate de potassium (5.2.3), comme indiqué en 7.2.

7.2 Extraction

Pour extraire le carbone organique, transférer quantitativement le sol dans des flacons en polyéthylène (6.6), ajouter 200 ml de sulfate de potassium (5.2.3), agiter les flacons à l'aide d'un agitateur horizontal (6.8) à 200 tr/min pendant 30 min ou à l'aide d'un agitateur rotatif à 60 tr/min pendant 45 min, puis filtrer les extraits sur un papier filtre plié (6.3). Extraire les témoins non fumigés et les filtrer de la même manière.

Si l'analyse n'est pas immédiate, conserver les extraits d'échantillons de sol fumigés et non fumigés au congélateur (6.9) entre -15 °C et -20 °C . Homogénéiser les extraits congelés avant utilisation, après décongélation à température ambiante.

NOTES

1 Un précipité blanc se produit au cours de la conservation des extraits de sol de sulfate de potassium (en particulier dans le cas d'échantillons congelés) car ils sont généralement sursaturés en sulfate de calcium (CaSO_4). Il n'est pas nécessaire de dissoudre cet excès de CaSO_4 car il ne perturbe aucune des procédures analytiques décrites dans la présente méthode.

2 Les membranes cellulaires des jeunes racines vivantes sont également affectées par la fumigation au chloroforme. Il convient d'utiliser le mode opératoire de pré-extraction donné à l'annexe B dans les sols contenant de grandes quantités de racines vivantes.

8 Détermination du carbone dans les extraits

La teneur en carbone des microorganismes présents dans un échantillon de sol est déterminée analytiquement et peut être utilisée pour effectuer des comparaisons entre différents échantillons de sol. Lorsqu'un chiffre de biomasse microbienne réelle est requis, ces valeurs sont multipliées par un facteur de conversion déduit d'expériences établissant une corrélation entre une masse cellulaire connue et l'analyse de carbone après fumigation-extraction. Tous les facteurs de conversion utilisés sont liés à ce facteur initial.

Déterminer la teneur en carbone dans les extraits soit par oxydation au dichromate (8.1), soit par analyse spectrométrique (8.2).

8.1 Carbone de la biomasse microbienne par oxydation du dichromate

8.1.1 Principe

En présence d'un acide fort, la matière organique est oxydée et Cr(VI) réduit en Cr(III). La quantité de dichromate restante est titrée en retour.

8.1.2 Réactifs supplémentaires

8.1.2.1 Dichromate de potassium, $c(\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7) = 0,0667 \text{ mol/l}$ (19,6125 g de dichromate de potassium séché par litre d'eau).

AVERTISSEMENT — En raison du danger du dichromate de potassium, il convient de prendre de grandes précautions lors de son utilisation et de son rejet éventuel.

8.1.2.2 Acide phosphorique, H_3PO_4 , $\rho = 1,71 \text{ g/ml}$.

8.1.2.3 Acide sulfurique, H_2SO_4 , $\rho = 1,84 \text{ g/ml}$.

8.1.2.4 Sulfate d'ammonium et de fer(II), solution de titrage, $c[(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}] = 0,040 \text{ mol/l}$.

Le sulfate d'ammonium et de fer(II) (15,69 g) est dissous dans de l'eau distillée acidifiée avec 20 ml d'acide sulfurique (8.1.2.3) et le tout est complété à 1 000 ml avec de l'eau distillée.

8.1.2.5 Complexe de sulfate de fer(II) et de phénanthroline-1,10, solution à 0,025 mol/l.

8.1.2.6 Mélange d'acides: deux volumes d'acide sulfurique (8.1.2.3) sont mélangés à un volume d'acide phosphorique (8.1.2.2).

8.1.3 Appareillage complémentaire

8.1.3.1 Réfrigérant de Liebig (eau refroidie).

8.1.3.2 Ballon à fond rond, de 250 ml de capacité.

8.1.3.3 Burette, de 10 ml de capacité, graduée tous les 0,05 ml.

8.1.3.4 Pipette, de 2 ml de capacité.

8.1.4 Mode opératoire

Ajouter 2 ml de solution de dichromate de potassium (8.1.2.1) à l'aide d'une pipette (8.1.3.4) (P_D) et 15 ml du mélange d'acides (8.1.2.6) à 8 ml d'extrait filtré (7.1) (P_S) dans un ballon à fond rond de 250 ml (8.1.3.2). Faire bouillir doucement sous reflux (8.1.3.1) l'ensemble du mélange pendant 30 min, laisser refroidir et diluer avec 20 ml à 25 ml d'eau ajoutée à travers le réfrigérant pour le rincer.

Minéraliser de la même manière les répétitions du blanc contenant 8 ml de solution de sulfate de potassium (5.2.3).

NOTE — Ces essais à blancs minéralisés sont également connus sous le nom «d'essais à blanc reflusés».

Déterminer l'excès de dichromate par titrage en retour (8.1.3.3) avec une solution de titrage de sulfate d'ammonium et de fer(II) (8.1.2.4), en utilisant quelques gouttes d'une solution de complexe de sulfate de fer(II) et de phénanthroline-1,10 (8.1.2.5) comme indicateur.

8.1.5 Calcul des résultats

Calculer le carbone organique extractible à l'aide des équations (1) et (2).

$$C (\mu\text{g/ml}) = [(V_H - V_S) / V_C] \times MP_D \times E \times 1\,000 / P_S \quad \dots (1)$$

où

V_S est le volume de solution de titrage (8.1.2.4) consommé par l'échantillon, en millilitres;

V_H est le volume de solution de titrage (8.1.2.4) consommé par l'essai à blanc reflué, en millilitres;

V_C est le volume de solution de titrage (8.1.2.4) consommé par l'essai à blanc non reflué, en millilitres;

M est la concentration de la solution de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, en moles par litre;

P_D est le volume ajouté de solution de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, en millilitres;

P_S est le volume d'échantillon ajouté, en millilitres;

E est égal à 3 {conversion du carbone organique C[C] en CO_2 [C(+IV)]}.

$$C (\mu\text{g/g de sol sec}) = C (\mu\text{g/ml}) \times (P_K / D_W + S_W) \quad \dots (2)$$

où

P_K est la masse d'extractant, en grammes;

D_W est la masse sèche de l'échantillon (déterminée conformément à l'ISO 11465), en grammes;

S_W est l'eau du sol (en grammes d'eau/grammes de sol sec) (déterminée conformément à l'ISO 11465).

Calculer le carbone de la biomasse, B_C , à l'aide de l'équation (3).

$$B_C = E_C / k_{EC} \quad \dots (3)$$

où

E_C = (masse de carbone organique extrait des sols fumigés) – (masse de carbone organique extrait des sols non fumigés);

$k_{EC} = 0,38$.

NOTE — Le facteur k_{EC} a été calculé en rapprochant les résultats de la méthode par fumigation-incubation de ceux de la méthode par fumigation-extraction (12 sols).

8.2 Carbone de la biomasse microbienne par analyse spectrométrique du carbone

8.2.1 Principe

Le carbone organique extractible du sol est oxydé en dioxyde de carbone, en présence de persulfate de potassium ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$), puis mesuré par détection spectrophotométrique infrarouge (IR) ou ultraviolet (UV).

8.2.2 Réactifs supplémentaires

8.2.2.1 **Persulfate de potassium** ($K_2S_2O_8$).

8.2.2.2 **Acide phosphorique** (voir 8.1.2.2)

8.2.2.3 **Polyphosphate de sodium** [$(NaPO_3)_n$] (extra pur).

8.2.2.4 **Réactif au persulfate de potassium.**

Dissoudre 20 g de persulfate de potassium (8.2.2.1) dans 900 ml d'eau distillée, acidifier la solution à pH 2 à l'aide d'acide phosphorique (8.2.2.2) et compléter à un volume final de 1 000 ml avec de l'eau distillée.

8.2.2.5 **Réactif au polyphosphate de sodium.**

Dissoudre 50 g de polyphosphate de sodium (8.2.2.3) dans 900 ml d'eau distillée, acidifier la solution à pH 2 à l'aide d'acide phosphorique (8.2.2.2) et compléter à un volume final de 1 000 ml avec de l'eau distillée.

8.2.3 Appareillage complémentaire

8.2.3.1 **Analyseur automatique de carbone à détection infrarouge²⁾ ou système en flux continu avec détection colorimétrique³⁾**

Pour les besoins de la présente partie de l'ISO 14240, la détermination du carbone de la biomasse microbienne est basée sur l'oxydation au persulfate activé par UV du carbone organique.

8.2.4 Mode opératoire

Dans le cas de la méthode automatisée d'oxydation au persulfate activé par UV, mélanger 5 ml d'extrait de sol au sulfate de potassium (7.1) à 5 ml de réactif au polyphosphate de sodium (8.2.2.5). Tout précipité de $CaSO_4$ dans les extraits de sol est dissous par cette procédure. Le réactif au persulfate de potassium (8.2.2.4) est amené automatiquement dans la chambre d'oxydation aux UV, où les rayons ultraviolets activent l'oxydation en CO_2 . Le CO_2 résultant est mesuré par absorption infrarouge ou détection spectrophotométrique.

8.2.5 Calcul des résultats

Calculer le carbone organique extractible (C) à l'aide de l'équation (4).

$$C (\mu\text{g/g de sol sec}) = [(V \times D_V) - (B \times D_B)] \times (P_K / D_W + S_W) \quad \dots (4)$$

où

V est le C ($\mu\text{g/ml}$) de l'échantillon;

B est le C ($\mu\text{g/ml}$) du blanc;

D_V est la dilution de l'échantillon avec le phosphate de sodium, en millilitres;

D_B est la dilution du blanc avec le phosphate de sodium, en millilitres;

²⁾ Dohrman DC 80, Maihak Tocor A sont des exemples d'appareils appropriés disponibles sur le marché. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la présente partie de l'ISO 14240 et ne signifie nullement que l'ISO approuve ou recommande l'emploi exclusif des appareils ainsi désignés.

³⁾ Skalar, Persorp Alpkem sont des exemples d'appareils appropriés disponibles sur le marché. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la présente partie de l'ISO 14240 et ne signifie nullement que l'ISO approuve ou recommande l'emploi exclusif des appareils ainsi désignés.

P_k voir l'équation (2);

D_W voir l'équation (2);

S_W voir l'équation (2).

Calculer la biomasse, B_C , à l'aide de l'équation (5).

$$B_C = E_C / k_{EC} \quad \dots (5)$$

où

E_C = (carbone organique extrait des sols fumigés) – (carbone organique extrait des sols non fumigés);

$k_{EC} = 0,45$.

NOTES

1 Le facteur k_{EC} a été calculé en rapprochant les résultats de la méthode par fumigation-incubation de ceux de la méthode par fumigation-extraction (23 sols).

2 Il est possible d'utiliser la méthode par fumigation-extraction en l'associant à des études de décompositions de substrats organiques marqués ^{14}C .

9 Fidélité

Les détails d'un essai interlaboratoire relatif à la fidélité de la méthode sont résumés dans l'annexe C. Les valeurs provenant de cet essai interlaboratoire ne sont pas applicables à d'autres gammes de concentrations ou d'autres matrices que celles données.

[ISO 14240-2:1997](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/3672fb9e-2ed2-4a5b-b16e-fa5859e70ed1/iso-14240-2-1997)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/3672fb9e-2ed2-4a5b-b16e-fa5859e70ed1/iso-14240-2-1997>