SPÉCIFICATION TECHNIQUE

ISO/TS 22939

Première édition
2010-03-15

Qualité du sol — Mesure en microplaques de l'activité enzymatique dans des échantillons de sol en utilisant des substrats fluorogènes

Soil quality — Measurement of enzyme activity patterns in soil samples using fluorogenic substrates in micro-well plates

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO/TS 22939:2010
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/85de31bf-1dbd-46af-bb07-79eea6caada1/iso-ts-22939-2010

Numéro de référence
ISO/TS 22939:2010(F)

© ISO 2010

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 22939:2010
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/85de31bf-1dbd-46af-bb07-79eea6caada1/iso-ts-22939-2010

DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2010

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 v
1 Domaine d'application 1
2 Références normatives 1
3 Termes abrégés 1
4 Principe 1
5 Réactifs 2
6 Appareillage et matériaux 5
7 Mode opératoire 6
8 Calcul des résultats 8
9 Expression des résultats 8
10 Rapport d'essai 8
Annexe A (informative) **Lignes directrices pour l'utilisation de substrats fraîchement préparés** 9
Annexe B (informative) **Exemple d'un graphique de calcul** 11
Bibliographie 13

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)
ISO/TS 22939:2010
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/85de31bf-1dbd-46af-bb07-79eea6caada1/iso-ts-22939-2010

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.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)
ISO/TS 22939:2010
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/85de31bf-1dbd-46af-bb07-79eea6caada1/iso-ts-22939-2010

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 22939 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 190, *Qualité du sol*, sous-comité SC 4, *Méthodes biologiques*.

 © ISO 2010 – Tous droits réservés

Introduction

Les micro-organismes sont responsables de nombreux processus clés dans le cycle des éléments. Les enzymes sont responsables de la dégradation des molécules organiques et de leur minéralisation. Le principal postulat énoncé est l'origine microbienne des enzymes du sol, même si les exsudats de racines de plantes comprennent des enzymes. Les enzymes extracellulaires présentes dans le sol jouent un rôle majeur dans la biodégradation des macromolécules organiques. La surveillance simultanée de plusieurs activités enzymatiques importantes dans la biodégradation des composés organiques et dans la minéralisation de C, N, P et S dans le sol, peut révéler les effets nocifs causés par les produits chimiques et d'autres impacts anthropogènes. Cependant, les mesures effectuées dans des conditions de laboratoire sélectionnées utilisant des substrats artificiels ne peuvent pas se substituer aux vitesses effectives des processus enzymatiques se produisant in situ dans le sol.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO/TS 22939:2010
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/85de31bf-1dbd-46af-bb07-79eea6caada1/iso-ts-22939-2010

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO/TS 22939:2010
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/85de31bf-1dbd-46af-bb07-79eea6caada1/iso-ts-22939-2010

Qualité du sol — Mesure en microplaques de l'activité enzymatique dans des échantillons de sol en utilisant des substrats fluorogènes

1 Domaine d'application

La présente Spécification technique spécifie une méthode de mesure simultanée de plusieurs activités enzymatiques dans des échantillons de sol. Les activités enzymatiques du sol varient en fonction des saisons et dépendent des caractéristiques chimiques, physiques et biologiques du sol. Son application pour la détection des effets nocifs des produits chimiques toxiques ou d'autres impacts anthropogènes dépend de la comparaison simultanée des activités enzymatiques dans un sol de référence similaire au sol d'essai ou des essais d'exposition avec des produits chimiques ou des traitements.

2 Références normatives

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

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/TS 22939:2010
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/85de31bf-1dbd-46af-bb07-79eea6eaada1/iso-ts-22939-2010

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)*

3 Termes abrégés

E.C. code d'enzyme défini par le Comité de nomenclature de l'Union internationale de biochimie et de biologie moléculaire (NC-IUBMB)

MOS teneur en matière organique du sol

MUB tampon universel modifié

4 Principe

La présente Spécification technique décrit une méthode de mesure simultanée de plusieurs activités enzymatiques dans des échantillons de sol. Cette méthode repose sur l'utilisation d'échantillons de sol dilués dans un tampon contenant des substrats fluorogènes, qui sont incubés pendant 3 h à (30 ± 2) °C dans des plaques multipuits. Après incubation, les activités enzymatiques sont mesurées par fluorescence à l'aide d'un lecteur de microplaques (Références [1] et [2]). La méthode décrite utilise des plaques, étalons et substrats, séchées permettant le stockage et limitant le biais dû aux différences entre les lots de réactifs, et permettant également la comparaison des lots de réactifs. L'Annexe A décrit une méthode utilisant des réactifs fraîchement préparés et dont la période d'incubation est exactement définie. L'avantage de l'utilisation de substrats fraîchement préparés est qu'une lyophilisation est inutile.

© ISO 2010 – Tous droits réservés

5 Réactifs

5.1 Tampon

5.1.1 Généralités

Le choix du tampon dépend de l'échantillon de sol car le pH affecte fortement les activités enzymatiques. Le tampon acétate de sodium, 0,5 mol/l, à pH 5,5, a été utilisé pour les sols acides à forte teneur en matière organique. L'utilisation du tampon universel modifié (MUB), de pH équivalent à celui de l'échantillon de sol, confère la souplesse nécessaire pour couvrir une vaste gamme de sols différents. La stabilité adéquate des substrats à différents tampons doit être garantie. Une bonne stabilité a été observée dans un tampon acétate de sodium, 0,5 mol/l, à pH 5,5 (Référence [3]).

5.1.2 **Tampon acétate de sodium,** 0,5 mol/l, pH 5,5

— acétate de sodium, trihydrate 68,04 g;

— eau déionisée, qsp 1 000 ml;

— acide acétique > 99,8 %.

Dissoudre l'acétate de sodium trihydrate dans de l'eau (par exemple 800 ml) et ajuster le pH à 5,5 avec de l'acide acétique concentré (> 99,8 %; pour analyse). Ajuster à 1 000 ml. Stériliser à l'autoclave à (121 ± 3) °C pendant 20 min. Stocker au réfrigérateur pendant deux semaines maximum.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

5.1.3 **Tampon universel modifié (MUB)** (Référence [4])

5.1.3.1 Solution mère

ISO/TS 22939:2010
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/85de31bf-1dbd-46af-bb07-79eea6caada1/iso-ts-22939-2010

— tris(hydroxyméthyl)aminométhane 12,1 g;

— acide maléique 11,6 g;

— acide citrique 14,0 g;

— acide borique 6,3 g;

— hydroxyde de sodium (1 mol/l) 488 ml;

— eau déionisée, qsp 1 000 ml.

Dissoudre les ingrédients et stocker la solution au réfrigérateur.

5.1.3.2 Tampon final

— acide chlorhydrique (0,1 mol/l);

— hydroxyde de sodium (0,1 mol/l).

Verser 200 ml de solution mère (5.1.3.1) dans un bécher de 500 ml contenant un barreau magnétique et placer le bécher sur un agitateur magnétique. Ajuster au pH requis avec de l'acide chlorhydrique ou de l'hydroxyde de sodium. Compléter le volume à 1 000 ml avec de l'eau déionisée. Stériliser à l'autoclave à (121 ± 3) °C pendant 20 min.

 © ISO 2010 – Tous droits réservés

5.2 Substrats et étalons

5.2.1 Préparation des solutions étalons

5.2.1.1 Solution de 4-méthylumbelliférone (MUF)

— 4-méthylumbelliférone (MUF) 0,022 0 g;

— diméthylsulfoxyde (DMSO), qsp 25 ml.

La MUF en poudre peut être stockée à température ambiante, à l'abri de la lumière. Peser soigneusement la MUF et la dissoudre dans du DMSO dans une fiole jaugée ambrée, en évitant toute exposition à la lumière du jour. La solution ne peut pas être stockée.

5.2.1.2 Solution de 7-amino-4-méthylcoumarine (AMC)

— 7-amino-4-méthylcoumarine (AMC) 0,021 9 g;

— diméthylsulfoxyde (DMSO), qsp 25 ml.

L'AMC en poudre peut être stockée au réfrigérateur. Peser soigneusement l'AMC et la dissoudre dans du DMSO dans une fiole jaugée ambrée, en évitant toute exposition à la lumière du jour. La solution ne peut pas être stockée.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

5.2.2 Préparation des solutions de substrats

Les substrats fluorogènes disponibles dans le commerce se présentent sous forme de poudres qui peuvent être stockées congelées à (–20 ± 2) °C. Le jour de l'utilisation, peser la quantité requise pour une concentration de 1 000 µmol/l, 2 500 µmol/l ou 2 750 µmol/l dans un volume de 50 ml par exemple, en évitant toute exposition à la lumière. Peser la poudre dans une fiole jaugée ambrée et compléter le volume avec du DMSO.

ISO/TS 22939:2010
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e2b1b1b1-b1b7-79eea6caada1/iso-ts-22939-2010

Il convient que le volume soit suffisamment important pour peser et mesurer les volumes de manière fiable. Il dépend également du nombre de plaques nécessaires.

Les distributeurs couramment utilisés peuvent distribuer simultanément un seul volume (par exemple 40 µl) dans huit lignes. Pour faciliter l'utilisation de ces instruments d'une bonne précision volumétrique, il convient de préparer des solutions de substrats de 2 500 µmol/l. Cependant, pour les substrats 4-MUF-β-D-glucopyranoside et 4-MUF-phosphate, une solution d'une concentration de 2 750 µmol/l est nécessaire pour produire la même concentration finale de 500 µmol/l. Ces deux solutions sont ensuite diluées simultanément durant l'ajout de l'échantillon; 20 µl de diméthylsulfoxyde sont ajoutés dans les puits de ces deux substrats pour en faciliter la dissolution. Pour mesurer l'activité de la chitinase, une concentration inférieure est requise pour éviter toute inhibition du substrat et la préparation d'une solution d'une concentration de 1 000 µmol/l de 4-MUF-*N*-acétyl-β-D-glucosaminide peut être utilisée pour produire la concentration finale de 200 µmol/l.

5.2.3 Préparation des plaques multipuits

Les solutions de substrats et solutions étalons sont introduites dans les plaques multipuits et séchées (par exemple lyophilisées) sur les plaques directement après distribution. Les plaques sèches peuvent être stockées à (–20 ± 2) °C pendant une année. Toute exposition à la lumière doit être évitée pendant la manipulation et le stockage des substrats et des étalons. Une plaque multipuits séparée pour les substrats et les étalons s'est révélée appropriée.

© ISO 2010 – Tous droits réservés

5.2.4 Préparation des plaques étalons

Des mesures répliquées adéquates, par exemple trois à quatre réplicats, sont nécessaires en raison du faible volume d'échantillon. La normalisation requiert plusieurs concentrations de MUF ou d'AMC en double. Toute exposition à la lumière doit être évitée pendant la dilution des étalons. Calculer le volume nécessaire en fonction du nombre d'échantillons et de plaques multipuits préparés. Un exemple de préparation des étalons couvrant une vaste gamme d'activités enzymatiques est donné ci-après. Toutefois, des modifications peuvent être apportées en fonction de la gamme d'activités enzymatiques des échantillons étudiés.

La solution mère de MUF d'une concentration de 5 mmol/l est utilisée pour produire les dilutions contenant 1 000 µmol/l, 500 µmol/l, 250 µmol/l, 125 µmol/l, 50 µmol/l, 25 µmol/l et 5 µmol/l de MUF. Dans les plaques multipuits, distribuer les volumes nécessaires (par exemple 40 ml) aux concentrations de 0 µmol/l, 1,0 µmol/l, 5,0 µmol/l, 10 µmol/l, 25 µmol/l, 50 µmol/l, 100 µmol/l et 200 µmol/l en double. Cette étape est essentielle pour l'incertitude de mesure.

NOTE 1 Cet ensemble de solutions mères permet d'utiliser des distributeurs automatiques qui permettent d'obtenir une précision nettement supérieure au pipetage manuel.

La solution mère d'AMC d'une concentration de 5 mmol/l est utilisée pour produire les dilutions contenant 250 µmol/l, 125 µmol/l, 50 µmol/l, 25 µmol/l, 5 µmol/l, 2,5 µmol/l et 0,5 µmol/l d'AMC. Dans les plaques multipuits, distribuer les volumes nécessaires (par exemple 40 ml) aux concentrations de 0 µmol/l, 0,1 µmol/l, 0,5 µmol/l, 1,0 µmol/l, 5,0 µmol/l, 10 µmol/l, 25 µmol/l et 50 µmol/l en double. Cette étape est essentielle pour l'incertitude de mesure.

NOTE 2 Cet ensemble de solutions mères permet d'utiliser des distributeurs automatiques qui permettent d'obtenir une précision nettement supérieure au pipetage manuel.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

5.2.5 Préparation des plaques de substrats

Toute exposition à la lumière doit être évitée pendant la dilution des substrats. Lorsque les plaques multipuits sont utilisées avec des substrats secs d'une concentration finale en substrat de 500 µmol/l et d'un volume d'échantillon de 200 µl, un volume de 40 µl de la solution à 2 500 µmol/l pour les substrats est ajouté en double dans les puits. Pour le 4-MUF-β-D-glucopyranoside et le 4-MUF-phosphate, une solution substrat de 2 750 µmol/l est ajoutée en double dans les puits. Pour mesurer l'activité de la chitinase, 40 µl du substrat 4-MUF-*N*-acétyl-β-D-glucosaminide sont ajoutés sous forme de solution à 1 000 µmol/l pour atteindre une concentration finale de 200 µmol/l.

ISO/TS 22939:2010
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/3d0b1d1b-1ea1-4b6b-97c1-f0b7c4d1b0f7/iso-ts-22939-2010

Cette concentration a été utilisée pour différents sols, en supposant que le taux de saturation est approximatif. Lors des essais de validation pour une vaste gamme de sols, il convient de vérifier que les concentrations en substrats sont appropriées et/ou d'envisager une approche de cinétique enzymatique.

Si une plaque à 96 puits et un distributeur automatique sont utilisés pour huit substrats, alors 12 réplicats sont disponibles. En cas d'utilisation de quatre réplicats, il est possible d'analyser trois échantillons différents ou différents taux de dilution sur une plaque.

5.2.6 Séchage des plaques multipuits

La manipulation dépend de l'instrument, par exemple lyophilisateur, utilisé. Toute exposition à la lumière doit être évitée pendant le traitement des plaques multipuits.

5.2.7 Substrats fluorogènes

Le Tableau 1 dresse une liste des substrats fluorogènes et des étalons disponibles dans le commerce[1)].

---

1) Glycosynth et Sigma sont des exemples de producteurs de molécules fluorogènes. 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 ces producteurs. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

 © ISO 2010 – Tous droits réservés

Tableau 1 — Substrats fluorogènes artificiels disponibles dans le commerce pour mesurer l'activité enzymatique

Enzyme	NC-IUBMB (voir Article 3)	Substrat	Élément	Macromolécule dégradée
Arylsulfatase	E.C. 3.1.6.1	4-MUF-sulfate	Soufre	Minéralisation du soufre organique
α-Glucosidase	E.C. 3.2.1.20	4-MUF-α-D-glucopyranoside	Carbone	Amidon et glycogène
Cellobiosidase	E.C. 3.2.1.91	4-MUF-β-cellobiopyranoside	Carbone	Cellulose
β-Xylosidase	E.C. 3.2.1.37	4-MUF-β-D-xylopyranoside	Carbone	Xylane, xylobiose
β-Glucosidase	E.C. 3.2.1.21	4-MUF-β-D-glucopyranoside	Carbone	Cellulose
Phosphodiestérase (PDE)	E.C. 3.1.4.1	bis-(4-MUF)-phosphate	Phosphore	Hydrolyse des diesters de phosphate
Chitinase	E.C. 3.2.1.30	4-MUF-*N*-acétyl-β-D-glucosaminide	Carbone	Rupture des liaisons β-1-4-glycosidiques dans le *N*-acétyl-glucosaminide (chitine) et le chitobiose
Phosphomonoestérase (PME)	E.C. 3.1.3.2	4-MUF-phosphate	Phosphore	Hydrolyse des monoesters de phosphate
Leucine-aminopeptidase	E.C. 3.4.11.1	L-leucine-AMC	Azote	Hydrolyse des oligopeptides → acides aminés
Alanine-aminopeptidase	E.C. 3.4.11.12	L-alanine-AMC	Azote	Hydrolyse des oligopeptides → acides aminés
MUF = 4-méthylumbelliférone AMC = 7-amino-4-méthylcoumarine				

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)
ISO/TS 22939:2010
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/85de31bf-1dbd-46af-bb07-79cea6caada1/iso-ts-22939-2010

6 Appareillage et matériaux

6.1 Équipement pour l'homogénéisation des échantillons de sol.

6.1.1 Tamis, d'une taille de grille de 4 mm, par exemple.

NOTE D'autres tailles de grille peuvent être utilisées en fonction de la texture du sol.

6.1.2 Homogénéisateur mécanique[2].

Pour certains types de sol, un désagrégateur à ultrasons a été utilisé.

6.2 Verrerie de laboratoire habituelle.

6.3 Plaques multipuits[3], avec couvercles.

---

2) L'homogénéisateur à tige Bamix et OmniMixer sont des exemples d'homogénéisateurs appropriés. 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 ces produits. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

3) Il existe des différences de fluorescence de fond entre les marques et les analyses MUF et AMC peuvent nécessiter différentes marques.

© ISO 2010 – Tous droits réservés