SPÉCIFICATION TECHNIQUE

ISO/TS 29843-1

Première édition
2010-10-01

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

Partie 1: Méthode par analyse des acides gras phospholipidiques (PLFA) et par analyse des lipides éther phospholipidiques (PLEL)

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

Soil quality — Determination of soil microbial diversity —

Part 1: Method by phospholipid fatty acid analysis (PLFA) and phospholipid ether lipids (PLEL) analysis

ISO/TS 29843-1:2010
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/[illegible]/iso-ts-29843-1-2010
743cd64ac9d3/iso-ts-29843-1-2010

Numéro de référence
ISO/TS 29843-1:2010(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 29843-1:2010
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d8c0ab9a-14e7-4f26-847f-743cd64ac9d3/iso-ts-29843-1-2010

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 2

5 Réactifs et matériaux 3
5.1 Sol 3
5.2 Réactifs 3
5.3 Tampons et étalons 4
5.4 Appareillage 4

6 Modes opératoires 5
6.1 Extraction des lipides (extraction de Bligh-Dyer) 5
6.2 Séparation des lipides par colonne SI 5
6.3 Analyse des PLFA 5
6.3.1 Hydrolyse alcaline douce 5
6.3.2 Colonne NH_2: Séparation des FAME issus des FAME hydroxy-substitués (PLOH) et des lipides insaponifiables 6
6.3.3 Colonne SCX: Séparation des PLFA non substitués à liaison ester (EL-PLFA) 6
6.3.4 Méthylation acide des lipides insaponifiables et séparation en UNOH et UNSFA 6
6.3.5 Dérivatisation des PLOH et UNOH au TMSI (voir 5.2.22) 6
6.3.6 Dérivatisation des MUFA au DMDS (voir 5.2.8) 7
6.4 Analyse des PLEL 7
6.4.1 Généralités 7
6.4.2 Méthylation acide 7
6.4.3 Clivage des liaisons éther avec de l'acide iodhydrique (HI) 7
6.4.4 Déshalogénation réductrice au zinc 7
6.5 Mesurage des fractions de PLFA/PLEL 7

7 Identification et calcul 8

Bibliographie 9

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

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 normatifs:

— 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 29843-1:2010
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d8c0ab9a-14e7-4f26-847f-743cd64ac9d3/iso-ts-29843-1-2010

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 29843-1 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 190, *Qualité du sol*, sous-comité SC 4, *Méthodes biologiques*.

L'ISO/TS 29843 comprend les parties suivantes, présentées sous le titre général *Qualité du sol — Détermination de la diversité microbienne du sol*:

— *Partie 1: Méthode par analyse des acides gras phospholipidiques (PLFA) et par analyse des lipides éther phospholipidiques (PLEL)*

— *Partie 2: Méthode par analyse des acides gras phospholipidiques (PLFA) en utilisant la «méthode simple d'extraction des PLFA»*

© ISO 2010 – Tous droits réservés

Introduction

Les phospholipides sont des composants essentiels des membranes de toutes les cellules vivantes, et leurs acides gras (PLFA: acides gras phospholipidiques) ou leurs chaînes latérales isopréniques à liaison éther (PLEL: lipides éther phospholipidiques) permettent d'effectuer une différenciation taxonomique dans des communautés microbiennes complexes (Références [5] et [7]). Cette approche est désormais bien établie dans le domaine de l'écologie des sols et sert d'outil phénotypique, et donc complémentaire, aux approches génotypiques (génétique moléculaire) pour déterminer la diversité microbienne.

Il existe différentes méthodes de dosage des acides gras présents dans le sol. Ces méthodes présentent, lors de leur application, différents niveaux de complexité et permettent d'obtenir différents niveaux de résolution concernant la description des communautés microbiennes du sol.

Le dosage des PLFA et des PLEL totaux fournit une mesure quantitative de la biomasse viable du sol: les micro-organismes des trois domaines de la biosphère (bactéries, champignons et archaebactéries). Les microbes viables ont une membrane intacte qui contient des phospholipides. Les enzymes cellulaires hydrolysent et libèrent le groupe phosphate dans les minutes, voire les heures suivant la mort cellulaire (Référence [6]).

En plus des descriptions taxonomiques, la technique PLFA permet de déterminer les modifications physiologiques au sein des consortiums microbiens. Par exemple, les PLFA monoéniques 16:1ω7c et 18:1ω7c sont progressivement convertis en acides gras cyclopropyliques cy17:0 et cy19:0 dans les bactéries Gram-négatives en réponse aux contraintes environnementales (Référence [2]).

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

Il existe d'autres méthodes de dosage des PLFA (Références [3] et [6]) en plus de la méthode décrite dans la présente partie de l'ISO/TS 29843. Avec ces méthodes, seuls les PLFA bactériens et fongiques peuvent être estimés. Il est impossible de doser les acides gras hydroxy-substitués (PLOH), les acides gras sans liaison ester (NEL) et les PLEL.

ISO/TS 29843-1:2010
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d8c0ab9a-14e7-4f16-8475f-743cd64ac9d3/iso-ts-29843-1-2010

© ISO 2010 – Tous droits réservés

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO/TS 29843-1:2010
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d8c0ab9a-14e7-4f26-847f-743cd64ac9d3/iso-ts-29843-1-2010

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

Partie 1:
Méthode par analyse des acides gras phospholipidiques (PLFA) et par analyse des lipides éther phospholipidiques (PLEL)

1 Domaine d'application

La présente partie de l'ISO/TS 29843 spécifie une méthode étendue permettant d'extraire et de doser les acides gras phospholipidiques (PLFA) et les lipides éther phospholipidiques (PLEL) du sol.

L'ISO/TS 29843-2 spécifie une méthode simple permettant d'extraire uniquement les PLFA du sol.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

2 Références normatives

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/TS 29843-1:2010
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d8c0ab9a-14c7-4126-847f-743cd64ac9d3/iso-ts-29843-1-2010

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*

3 Termes abrégés

FAME	ester(s) méthylique(s) d'acide gras
(EL-)PLFA	acide(s) gras phospholipidique(s) (à liaison ester)
PLEL	lipide(s) éther phospholipidique(s)
SATFA	acide(s) gras saturé(s)
MUFA	acide(s) gras monoinsaturé(s)
PUFA	acide(s) gras polyinsaturé(s)
PLOH	acide(s) gras hydroxy-substitué(s)
NEL-PLFA	acide(s) gras phospholipidique(s) sans liaison ester
UNSFA	acide(s) gras non substitué(s)
UNOH	acide(s) gras hydroxy-substitué(s)
GC/MS	chromatographie en phase gazeuse/spectrométrie de masse

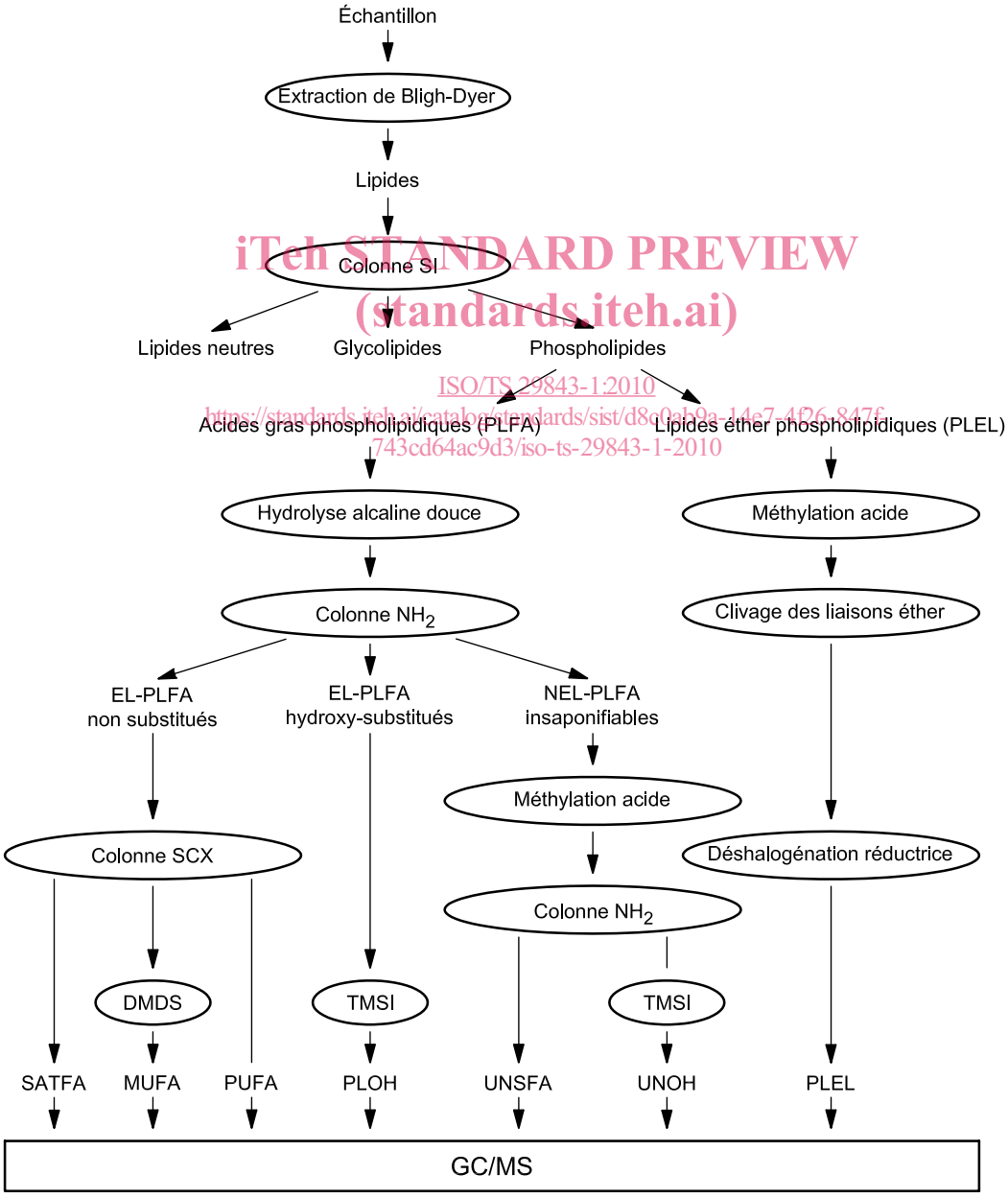
© ISO 2010 – Tous droits réservés

SCX colonne échangeuse de cations

CLHP chromatographie liquide à haute performance

4 Principe

Les lipides sont extraits en appliquant le mode opératoire d'extraction de Bligh et Dyer (Référence [9]). Les extraits lipidiques sont séparés par chromatographie en phase liquide en utilisant une colonne de silice (colonne SI). Les phospholipides sont transformés en esters méthyliques d'acides gras (FAME) par hydrolyse alcaline douce et en lipides éther phospholipidiques (PLEL) par hydrolyse acide et méthylation. La séparation des FAME en acides gras saturés (SATFA), monoinsaturés (MUFA), polyinsaturés (PUFA), hydroxy-substitués (PLOH), non substitués sans liaison ester (NEL-UNSFA) et hydroxy-substitués sans liaison ester (NEL-UNOH) est effectuée sur des colonnes d'extraction en phase solide. Les différents FAME sont mesurés par chromatographie en phase gazeuse/spectrométrie de masse (GC/MS). Une vue d'ensemble schématique des modes opératoires est illustrée à la Figure 1.



iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)
ISO/TS 29843-1:2010
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d8c0ab9a-14e7-4f26-847f-743cd64ac9d3/iso-ts-29843-1-2010

Figure 1 — Vue d'ensemble schématique de l'analyse des PLFA et des PLEL

© ISO 2010 – Tous droits réservés

5 Réactifs et matériaux

5.1 Sol

Prélever des échantillons de sol et les préparer conformément à l'ISO 10381-6. Si les échantillons tamisés à l'état frais ne sont pas analysés immédiatement, ils peuvent être conservés à –20 °C ou stockés dans du chloroforme après extraction des lipides (voir 6.1).

5.2 Réactifs

Au cours de l'analyse, sauf indication contraire, utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue.

5.2.1 Acétone, C_3H_6O, pour l'analyse des résidus.

5.2.2 Acétonitrile, CH_3CN, pour chromatographie liquide à haute performance (CLHP).

5.2.3 Bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide (BSTFA).

5.2.4 Celite 545[1)], granulométrie de 0,02 mm à 0,10 mm.

5.2.5 Chloroforme, $CHCl_3$.

5.2.6 Dichlorométhane, CH_2Cl_2, pour l'analyse des résidus.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

5.2.7 Éther diéthylique, $(C_2H_5)_2O$.

5.2.8 Disulfure de diméthyle (DMDS), $(CH_3S)_2$.

ISO/TS 29843-1:2010
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d8c0ab9a-14e7-4f26-847f-743cd64ac9d3/iso-ts-29843-1-2010

5.2.9 Acide acétique, CH_3COOH.

5.2.10 Acétate d'éthyle, C_4H_8O.

5.2.11 Hexaméthyldisilasane (HMDS).

5.2.12 Hexane, C_6H_{14}, pour l'analyse des résidus.

5.2.13 Hydroxyde de potassium, KOH.

5.2.14 Méthanol, CH_3OH, pour l'analyse des résidus.

5.2.15 Sulfate de sodium, Na_2SO_4.

5.2.16 Thiosulfate de sodium, $Na_2S_2O_3$, 5 H_2O.

5.2.17 Colonne aminopropyle [Chromabond[2)]**] colonne** NH_2.

5.2.18 Pyridine, séchée, 0,01 % d'eau au maximum.

---

1) Celite 545 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.

2) Chromabond 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.

© ISO 2010 – Tous droits réservés