

---

---

**Qualité du sol — Méthode pour extraire  
directement l'ADN d'échantillons de sol**

*Soil quality — Method to directly extract DNA from soil samples*

**iTeh STANDARD PREVIEW**  
**(standards.iteh.ai)**

ISO 11063:2012

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/0744adf5-cf9e-4966-b62c-46db5dc70232/iso-11063-2012>



## iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

ISO 11063:2012

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/0744adf5-cf9e-4966-b62c-46db5dc70232/iso-11063-2012>



### DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2012

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](mailto:copyright@iso.org)  
Web [www.iso.org](http://www.iso.org)

Publié en Suisse

## Sommaire

Page

Avant-propos.....	iv
Introduction.....	v
1 <b>Domaine d'application</b> .....	1
2 <b>Références normatives</b> .....	1
3 <b>Termes et définitions</b> .....	1
4 <b>Principe</b> .....	1
5 <b>Matériel d'essai</b> .....	2
5.1 <b>Sol</b> .....	2
5.2 <b>Substances chimiques</b> .....	2
5.3 <b>Tampons et réactifs</b> .....	3
6 <b>Appareillage</b> .....	4
7 <b>Modes opératoires</b> .....	4
7.1 <b>Préparation des échantillons de sol</b> .....	4
7.2 <b>Lyse mécano-chimique</b> .....	4
7.3 <b>Précipitation des protéines</b> .....	4
7.4 <b>Précipitation et rinçage des acides nucléiques</b> .....	4
7.5 <b>Conservation des acides nucléiques</b> .....	4
8 <b>Estimation de la qualité et de la quantité d'ADN du sol</b> .....	5
8.1 <b>Qualité et pureté de l'ADN du sol</b> .....	5
8.2 <b>Quantité d'ADN du sol</b> .....	5
9 <b>Validation du mode opératoire d'extraction</b> .....	5
10 <b>Étude interlaboratoires internationale</b> .....	5
11 <b>Rapport d'essai</b> .....	5
<b>Annexe A (informative) Étude interlaboratoires internationale pour évaluer le mode opératoire d'extraction de l'ADN du sol</b> .....	7
<b>Bibliographie</b> .....	22

## 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.

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 11063 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 190, *Qualité du sol*, sous-comité SC 4, *Méthodes biologiques*.

## iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

ISO 11063:2012

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/0744adf5-cf9e-4966-b62c-46db5dc70232/iso-11063-2012>

## Introduction

L'ADN (acide désoxyribonucléique) est un composant essentiel des organismes vivants codant pour les enzymes responsables de leurs activités biologiques. L'étude des séquences d'ADN extraits de différentes matrices biologiques, à l'aide de nombreuses approches moléculaires, permet de fournir des marqueurs moléculaires qui peuvent être utilisés pour différencier et identifier clairement différents organismes (bactéries, archées et eucaryotes).

Jusqu'à présent, la plupart des études visant à développer des indicateurs microbiens de la qualité du sol et applicables aux milieux complexes, tels que le sol, étaient biaisées par la nature incultivable de nombreux micro-organismes et par le manque de sensibilité des méthodes microbiologiques classiques [16]. Le développement récent de nombreuses méthodes de biologie moléculaire reposant principalement sur l'amplification des acides nucléiques extraits du sol a permis de proposer une alternative pertinente à la microbiologie pasteurienne, pour fournir des informations précieuses sur la composition, la richesse et la structure des communautés microbiennes [15], [18], [26], [27], [36]. Les approches reposant sur l'ADN sont désormais bien établies dans le domaine de l'écologie microbienne des sols et servent de marqueurs génotypiques (= marqueurs moléculaires) permettant d'évaluer la diversité microbienne.

Les résultats d'analyses moléculaires des communautés et/ou populations microbiennes du sol reposent sur deux paramètres principaux:

- a) l'extraction d'ADN représentatif de la composition de la communauté bactérienne indigène;
- b) les biais introduits par la PCR, notamment le choix des amorces oligonucléotidiques, la concentration en ADN amplifié, les erreurs de la PCR ou encore la méthode d'analyse choisie [23], [26], [38], [40]. Récemment, de nombreuses études ont été menées sur de nouvelles méthodes permettant d'améliorer l'extraction, la purification, l'amplification et la quantification de l'ADN des sols [20].

L'objectif de la présente Norme internationale est de décrire le mode opératoire utilisé pour extraire directement l'ADN des échantillons de sol. La reproductibilité de ce mode opératoire d'extraction de l'ADN du sol a été évaluée dans le cadre d'une étude interlaboratoires internationale (Annexe A). La reproductibilité de ce mode opératoire d'extraction de l'ADN du sol a été évaluée avec succès aussi bien par des approches moléculaires quantitatives (q-PCR) que qualitatives (A-RISA).

**iTeh STANDARD PREVIEW**  
**(standards.iteh.ai)**

ISO 11063:2012

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/0744adf5-cf9e-4966-b62c-46db5dc70232/iso-11063-2012>

# Qualité du sol — Méthode pour extraire directement l'ADN d'échantillons de sol

## 1 Domaine d'application

La présente Norme internationale spécifie une méthode pour extraire directement l'ADN d'échantillons de sol en vue d'analyser la structure globale et l'abondance des communautés microbiennes du sol en utilisant des techniques de PCR. Cette méthode est principalement destinée aux sols agricoles et forestiers. Cette méthode peut ne pas être appropriée aux sols riches en matières organiques (par exemple sols de tourbières) ou aux sols très pollués par des polluants organiques ou des métaux lourds.

L'extraction directe de l'ADN d'échantillons de sol fournit des informations précieuses sur l'abondance et la structure des communautés microbiennes qui sont des paramètres clés pour estimer la biodiversité des communautés microbiennes telluriques. Les approches moléculaires utilisant l'amplification PCR (amplification en chaîne par polymérisation) de l'ADN extrait du sol offrent des perspectives prometteuses et peuvent contribuer, dans un futur proche, au développement d'outils de routine permettant de surveiller la qualité de la composante microbienne des sols.

L'utilisateur de la méthode doit savoir que, même si le sol soumis au mode opératoire d'extraction de l'ADN est soigneusement tamisé (mailles de 2 mm, mode opératoire décrit en 5.1), des résidus végétaux peuvent demeurer dans les échantillons de sol et de ce fait, l'extrait d'ADN prélevé du sol peut être contaminé par des traces d'ADN végétal.

(standards.iteh.ai)

## 2 Références normatives

ISO 11063:2012

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 (y compris les éventuels amendements) s'applique.

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 et définitions

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

### 3.1

#### ADN du sol

ADN extrait de micro-organismes vivant dans le sol et ADN de micro-organismes morts persistant

## 4 Principe

L'ADN est directement extrait d'échantillons de sol de 0,25 g en appliquant le mode opératoire d'extraction suivant. Cette méthode a permis d'analyser avec fiabilité la structure globale des communautés bactériennes et archées et peut être adaptée (extraction à partir d'un échantillon de sol de 1 g) pour évaluer la structure globale des communautés fongiques [32]. Les échantillons de sol mélangés avec un tampon d'extraction sont soumis à une lyse mécano-chimique. L'étape de lyse, à l'aide par exemple d'un broyeur à billes est une étape cruciale pour extraire l'ADN, même de micro-organismes difficiles à lyser. Après une brève centrifugation, les débris de sol sont éliminés et les protéines sont précipitées avec de l'acétate de potassium. Après centrifugation, le surnageant est récupéré et les acides nucléiques sont précipités avec de l'isopropanol froid. Après centrifugation, le culot d'acides nucléiques est rincé avec de l'éthanol à 70 % et est repris dans de l'eau stérile de qualité biologie moléculaire. La qualité de l'ADN est ensuite contrôlée par électrophorèse en gel

d'agarose et la quantité d'ADN est estimée à l'aide d'un spectrofluorimètre. Une représentation schématique du mode opératoire est donnée à la Figure 1.

## 5 Matériel d'essai

### 5.1 Sol

Il convient de prélever des échantillons de sol et de les tamiser (mailles de 2 mm). Si les échantillons ne sont pas immédiatement traités, il est recommandé de les conserver pendant deux ans maximum à  $-20\text{ °C}$  ou pendant 10 ans maximum à  $-80\text{ °C}$  ou dans de l'azote liquide ( $-180\text{ °C}$ ) comme spécifié dans l'ISO 10381-6. Si les échantillons de sol sont congelés, ils ne peuvent être décongelés qu'une seule fois. Certaines de ces conditions de stockage sont actuellement en cours d'évaluation.

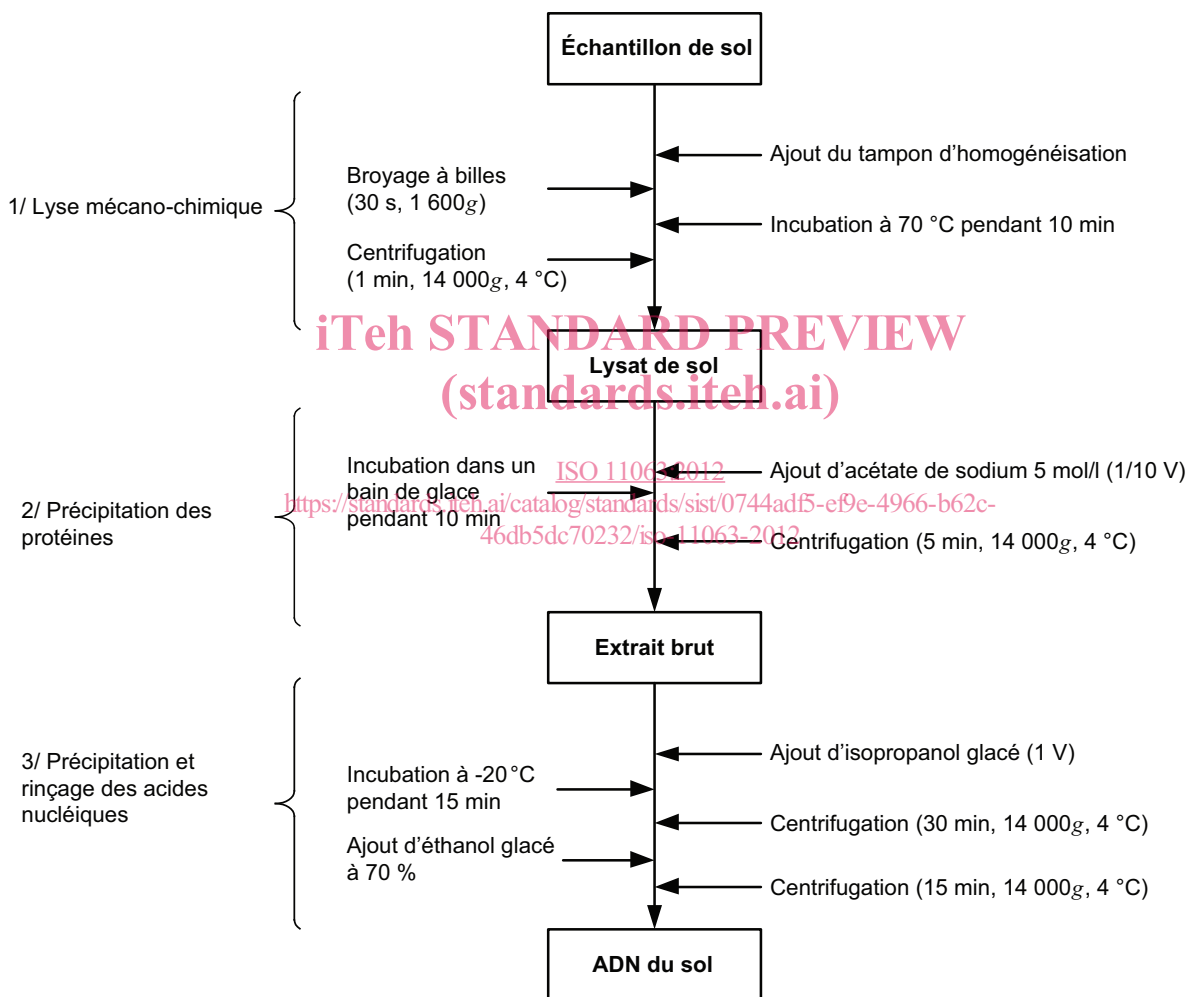


Figure 1 — Représentation schématique du mode opératoire d'extraction de l'ADN du sol

### 5.2 Substances chimiques

5.2.1 Tris[hydroxyméthyl]aminométhane,  $C_4H_{11}NO_3$  (n° CAS 77-86-1).

5.2.2 Sel disodique de l'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA),  $C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$  (n° CAS 6381-92-6).

5.2.3 Chlorure de sodium, NaCl (n° CAS 7647-14-5).



**5.2.4 Dodécylsulfate de sodium (SDS)**,  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3\text{Na}$  (n° CAS 151-21-3).

**5.2.5 Polyvinylpyrrolidone (PVP)**,  $[\text{C}_6\text{H}_9\text{NO}]_n$  (n° CAS 9003-39-8).

**5.2.6 Acétate de sodium**,  $\text{CH}_3\text{COONa}$  (n° CAS 6131-90-4).

**5.2.7 Acide acétique ou acide acétique glacial**,  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (n° CAS 64-19-7).

**5.2.8 Isopropanol**,  $\text{CH}_3\text{CHOHCH}_3$  (n° CAS 67-63-0).

**5.2.9 Éthanol**,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$  (n° CAS 64-17-5).

**5.2.10 Eau, qualité biologie moléculaire**,  $\text{H}_2\text{O}$ .

### 5.3 Tampons et réactifs

Les tampons et les réactifs (à l'exception des agents intercalants) utilisés pour l'extraction de l'ADN du sol sont stérilisés (120 °C pendant 20 min) et stockés à température ambiante. L'éthanol et l'isopropanol sont stockés à -20 °C.

**5.3.1 Tris-HCl 1 mol/l**, 121,14 g de tris dans 1 000 ml de  $\text{H}_2\text{O}$ , en ajustant avec du HCl 4 mol/l à pH 8,0.

**5.3.2 EDTA 0,5 mol/l**, 186,10 g d'EDTA dans 1 000 ml de  $\text{H}_2\text{O}$ , en ajustant avec du NaOH (10 mol/l) à pH 8,0.

**5.3.3 NaCl 1 mol/l**, 58,44 g de NaCl dans 1 000 ml de  $\text{H}_2\text{O}$ .

**5.3.4 PVP 40 à 20 %**, 200 g de PVP dans 1 000 ml de  $\text{H}_2\text{O}$ .

**5.3.5 SDS à 20 %**, 200 g de SDS dans 1 000 ml de  $\text{H}_2\text{O}$ .

**5.3.6 Tampon d'homogénéisation** (fraîchement préparé juste avant utilisation), 100 ml de tris-HCl 1 mol/l (pH 8,0), 200 ml d'EDTA 0,5 mol/l (pH 8,0), 100 ml de NaCl 1 mol/l, 50 ml de PVP 40 à 20 %, 100 ml de SDS à 20 % dans 450 ml de  $\text{H}_2\text{O}$ .

**5.3.7 Acétate de sodium 5 mol/l (pH 5,5)**, 410,15 g de  $\text{CH}_3\text{COONa}$  dans 800 ml de  $\text{H}_2\text{O}$ . Ajouter 120 ml d'acide acétique et ajuster le pH à 5,5 avec de l'acide acétique glacial. Compléter à 1 000 ml en ajoutant de l'eau.

**5.3.8 Éthanol à 70 %**, 700 ml d'éthanol pur dans 300 ml de  $\text{H}_2\text{O}$ .

**5.3.9 Tampon TE**, pH 8,0, tris-HCl 10 mmol/l, EDTA 1 mmol/l.

**5.3.10 Billes de verre** (106  $\mu\text{m}$ ).

**5.3.11 Billes de verre** (2 mm).

**5.3.12 Bromure d'éthidium**, 5 mg de bromure d'éthidium dans 1 000 ml de  $\text{H}_2\text{O}$ .

**5.3.13 Agent intercalant fluorescent des acides nucléiques**, excitation à 480 nm et émission à 520 nm.

**5.3.14 ADN pur** (100 ng/ $\mu\text{l}$ ).

**5.3.15 Tampon TBE × 10**, pH 8,0, 108 g de base tris, 55 g d'acide borique, 40 ml d'EDTA 0,5 mol/l (pH 8,0) dans 1 000 ml de H<sub>2</sub>O.

**5.3.16 Tampon TBE × 1**, 100 ml de tampon TBE × 10 dans 900 ml de H<sub>2</sub>O.

## 6 Appareillage

Utiliser un matériel de laboratoire courant, notamment pipettes, centrifugeuse, hotte chimique, système d'électrophorèse horizontale, ainsi que les éléments suivants.

**6.1 Broyeur à billes**, avec une fréquence de broyage oscillant par exemple entre 100 min<sup>-1</sup> et 2 600 min<sup>-1</sup> avec une amplitude d'agitation de 16 mm.

**6.2 Spectrofluorimètre**, permettant de quantifier l'ADN double brin avec un agent intercalant fluorescent (excitation à 480 nm et émission à 520 nm).

## 7 Modes opératoires

### 7.1 Préparation des échantillons de sol

Peser 0,25 g de sol tamisé (équivalent masse sèche) dans des microtubes de 2 ml juste avant l'extraction ou congeler immédiatement l'échantillon de sol dans de l'azote liquide et le conserver au congélateur à -80 °C jusqu'à ce qu'il soit utilisé.

### 7.2 Lyse mécano-chimique

Ajouter 0,5 g de billes de verre de 106 µm (porter un masque de protection) et deux billes de verre (2 mm de diamètre) à l'échantillon de sol. Ajouter 1 ml de tampon d'homogénéisation (composition indiquée en 5.3.6). Agiter les échantillons de sol à 1 600g pendant 30 s (16 mm d'amplitude) à l'aide d'un broyeur à billes (support de tube préalablement placé à -20 °C). Incuber à 70 °C pendant 10 min. Centrifuger pendant 1 min à 14 000g (4 °C). Récupérer soigneusement le surnageant et le transférer dans un nouveau microtube de 2 ml.

### 7.3 Précipitation des protéines

Ajouter au surnageant obtenu en 7.2 de l'acétate de sodium 5 mol/l (pH 5,5) (composition indiquée en 5.3.7) dans une proportion de 1/10 du volume de surnageant. Mélanger au vortex et incuber dans un bain de glace pendant 10 min. Centrifuger pendant 5 min à 14 000g (4 °C). Récupérer soigneusement le surnageant et le transférer dans un nouveau microtube de 1,5 ml.

### 7.4 Précipitation et rinçage des acides nucléiques

Réaliser l'ensemble de ces étapes sous une hotte chimique en raison de la dangerosité des vapeurs d'isopropanol. Les déchets liquides et solides doivent être éliminés comme des déchets chimiques.

Ajouter au surnageant obtenu en 7.3 de l'isopropanol glacé (-20 °C) dans une proportion de 1/1 du volume de surnageant. Incuber les échantillons à -20 °C pendant 15 min. Centrifuger pendant 30 min à 14 000g (4 °C). Éliminer soigneusement le surnageant. Rincer le culot d'acides nucléiques avec de l'éthanol glacé à 70 % (ne pas remettre le culot en suspension). Centrifuger pendant 15 min à 14 000g (4 °C). Éliminer toutes traces d'éthanol et laisser le culot d'acides nucléiques sécher pendant 15 min à 37 °C. Mettre le culot en suspension dans 100 µl d'eau stérile de qualité biologie moléculaire ou de tampon TE (pH 8,0) (composition indiquée en 5.3.9).

### 7.5 Conservation des acides nucléiques

Aliquoter l'ADN du sol (4 × 25 µl) et conserver les échantillons d'ADN à -20 °C jusqu'à ce qu'ils soient utilisés. Il convient d'éviter la répétition de cycles de décongélation/congélation des extraits d'ADN.

## 8 Estimation de la qualité et de la quantité d'ADN du sol

### 8.1 Qualité et pureté de l'ADN du sol

La qualité et la taille de l'ADN du sol sont contrôlées par électrophorèse en gel d'agarose à 1 % dans du tampon TBE. Les gels sont colorés avec un agent intercalant approprié (par exemple bromure d'éthidium, 5 mg/l). La pureté de l'ADN du sol est évaluée par spectrophotométrie à 260 nm pour l'analyse de l'ADN et à 400 nm pour les substances acides humiques [11].

L'étape de lyse mécano-chimique étant essentielle, il convient qu'elle soit appropriée pour lyser une partie représentative des micro-organismes mais qu'elle évite la fragmentation de l'ADN [39].

Les extraits d'ADN qui demeurent légèrement brunâtres doivent faire l'objet d'une purification.

### 8.2 Quantité d'ADN du sol

La teneur en ADN du sol est déterminée en utilisant un agent intercalant (5.3.13) qui devient fluorescent lorsqu'il est intercalé dans la double hélice d'ADN. Une courbe d'étalonnage mettant en correspondance la quantité d'ADN étalon (5 ng, 10 ng, 20 ng, 50 ng, 100 ng, 150 ng et 200 ng d'ADN pur) et la quantité de fluorescence quantifiée est établie et utilisée pour estimer la quantité d'ADN extrait du sol. Les mesurages sont effectués à l'aide d'un spectrofluorimètre (6.2). L'analyse est réalisée avec un logiciel approprié.

La teneur en ADN du sol peut aussi être déterminée en séparant les extraits d'ADN du sol par électrophorèse en gel d'agarose à 1 %, coloré au bromure d'éthidium et photographié à l'aide d'un système de prise de vue. Des dilutions d'ADN pur sont incluses dans chaque gel pour établir une courbe d'étalonnage de la concentration en ADN (1 000 ng, 500 ng, 250 ng, 125 ng, 62,5 ng à 31,25 ng). L'intensité du bromure d'éthidium est intégrée afin d'établir une courbe d'étalonnage pour estimer la concentration en ADN du sol comme décrit précédemment par la Référence [32].

Enfin, la teneur en ADN du sol peut aussi être déterminée par spectrophotométrie à 260 nm lorsque l'ADN du sol est faiblement contaminé par des substances acides humiques (400 nm) et des protéines (rapport moyen A260/A280 de 1,6).

## 9 Validation du mode opératoire d'extraction

Le laboratoire peut valider le mode opératoire d'extraction de l'ADN du sol en extrayant l'ADN d'un sol de référence et en comparant le rendement obtenu avec le résultat attendu.

## 10 Étude interlaboratoires internationale

Cette méthode d'extraction de l'ADN du sol a été évaluée dans le cadre d'une étude interlaboratoires internationale impliquant neuf laboratoires différents travaillant sur six sols européens d'origine différente. Le rapport de cette étude interlaboratoires est fourni dans l'Annexe A.

## 11 Rapport d'essai

Le rapport d'essai doit comprendre les informations suivantes:

- une référence à la présente Norme internationale, c'est-à-dire l'ISO 11063:2012;
- le prélèvement du sol, comprenant la date et le lieu (coordonnées GPS) du prélèvement;
- le traitement et la conservation de l'échantillon de sol (par exemple méthode de tamisage, conditions et durée de conservation);
- les caractéristiques physiques et chimiques du sol;
- la quantité de sol utilisé pour l'extraction de l'ADN;

- f) la ou les dates d'extraction;
- g) la durée de conservation des acides nucléiques (le cas échéant);
- h) les tableaux des résultats comprenant la concentration en extraits d'ADN du sol et la quantité d'ADN extrait par gramme de sol (équivalent masse sèche);
- i) tous détails non spécifiés dans la présente Norme internationale ou qui sont facultatifs ainsi que tous incidents susceptibles d'avoir affecté les résultats.

**iTeh STANDARD PREVIEW**  
**(standards.iteh.ai)**

[ISO 11063:2012](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/0744adf5-cf9e-4966-b62c-46db5dc70232/iso-11063-2012)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/0744adf5-cf9e-4966-b62c-46db5dc70232/iso-11063-2012>