
**Qualité du sol — Détermination de la
nitrification potentielle et inhibition de la
nitrification — Essai rapide par oxydation
de l'ammonium**

*Soil quality — Determination of potential nitrification and inhibition of
nitrification — Rapid test by ammonium oxidation*

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 15685:2012](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/ff242fb7-eb9d-4990-9ef1-a0bd570372dc/iso-15685-2012)

[https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/ff242fb7-eb9d-4990-9ef1-
a0bd570372dc/iso-15685-2012](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/ff242fb7-eb9d-4990-9ef1-a0bd570372dc/iso-15685-2012)



iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

[ISO 15685:2012](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/ff242fb7-eb9d-4990-9ef1-a0bd570372dc/iso-15685-2012)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/ff242fb7-eb9d-4990-9ef1-a0bd570372dc/iso-15685-2012>



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
Web www.iso.org

Publié en Suisse

Sommaire

Page

Avant-propos.....	iv
1 Domaine d'application	1
2 Références normatives	1
3 Termes et définitions	1
4 Principe	2
5 Réactifs	2
6 Appareillage	3
7 Échantillonnage, conservation et caractérisation des échantillons	3
8 Mode opératoire	4
8.1 Essais des sols	4
8.2 Essais relatifs à l'effet des substances chimiques	5
8.3 Essais avec des sols pollués	5
8.4 Essais avec des extraits aqueux de biosolides	5
9 Calculs	5
10 Rapport d'essai	6
Annexe A (informative) Résultats d'un essai interlaboratoires	7
Annexe B (informative) Mesures à micro-échelle des vitesses potentielles de nitrification	9
Bibliographie	12

[ISO 15685:2012](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/ff242fb7-eb9d-4990-9ef1-a0bd570372dc/iso-15685-2012)
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/ff242fb7-eb9d-4990-9ef1-a0bd570372dc/iso-15685-2012>

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 15685 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 190, *Qualité du sol*, sous-comité SC 4, *Méthodes biologiques*.

Cette deuxième édition annule et remplace la première édition (ISO 15685:2004), qui a fait l'objet d'une révision technique.

iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

[ISO 15685:2012](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/ff242fb7-eb9d-4990-9ef1-a0bd570372dc/iso-15685-2012)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/ff242fb7-eb9d-4990-9ef1-a0bd570372dc/iso-15685-2012>

Qualité du sol — Détermination de la nitrification potentielle et inhibition de la nitrification — Essai rapide par oxydation de l'ammonium

1 Domaine d'application

La présente Norme internationale spécifie une méthode rapide de détermination de la vitesse potentielle d'oxydation de l'ammonium et d'inhibition de la nitrification des sols. Cette méthode convient à tous les sols contenant une population de micro-organismes nitrifiants. Elle peut être utilisée comme essai de criblage rapide pour surveiller la qualité des sols et la qualité des déchets et elle convient pour l'évaluation des effets des pratiques agricoles, des substances chimiques [sauf les composés volatils, c'est-à-dire $H > 1$ (constante de Henry)], des extraits de biosolides et de la pollution des sols.

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 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 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)*

ISO 11260, *Qualité du sol — Détermination de la capacité d'échange cationique effective et du taux de saturation en bases échangeables à l'aide d'une solution de chlorure de baryum*

ISO 11261, *Qualité du sol — Dosage de l'azote total — Méthode de Kjeldahl modifiée*

ISO 11277, *Qualité du sol — Détermination de la répartition granulométrique de la matière minérale des sols — Méthode par tamisage et sédimentation*

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

ISO 14238, *Qualité du sol — Méthodes biologiques — Détermination de la minéralisation de l'azote et de la nitrification dans les sols, et de l'influence des produits chimiques sur ces processus*

ISO 14256-2, *Qualité du sol — Dosage des nitrates, des nitrites et de l'ammonium dans des sols bruts par extraction avec une solution de chlorure de potassium — Partie 2: Méthode automatisée avec analyse en flux segmenté*

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.

3.1
dose inhibitrice
DI
quantité de substance chimique ajoutée au sol qui inhibe de façon effective l'activité biologique d'un pourcentage fixé, à l'issue d'un temps donné, par rapport à un échantillon d'essai témoin non traité

NOTE Elle est exprimée en pourcentage. Par exemple, DI25 et DI50 indiquent respectivement 25 % et 50 % d'inhibition de l'activité biologique.

3.2
biosolides
produits organiques utilisés dans l'agriculture, incluant les boues d'épuration, les composts, les lisiers et des déchets industriels

4 Principe

L'oxydation de l'ammonium, qui représente la première étape de la nitrification autotrophe dans un sol, est utilisée pour évaluer l'activité potentielle des populations microbiennes nitrifiantes. Des bactéries autotrophes nitrosantes sont exposées à du sulfate d'ammonium dans une boue de sol tamponnée à pH 7,2. L'oxydation des nitrites par les bactéries nitrifiantes dans la boue est inhibée par l'addition de chlorate de sodium. L'accumulation de nitrites qui s'ensuit est mesurée sur une période d'incubation de 6 h et sert à estimer l'activité potentielle des bactéries nitrosantes. Comme le temps de génération des bactéries nitrosantes est long (> 10 h), la méthode fournit une mesure de l'activité potentielle de la population nitrifiante au moment du prélèvement. Elle ne mesure pas la croissance de la population nitrifiante.

Des essais peuvent être conduits avec des substances chimiques d'essai et des extraits de biosolides que l'on ajoute en concentrations variées à la boue. Les essais peuvent être utilisés pour comparer différents sols (par exemple des sols pollués et des sols de référence). Les effets des sols pollués, des échantillons de déchets et d'autres matières solides sur la nitrification peuvent être évalués en appliquant la méthode à des mélanges de ces échantillons avec un sol de référence.

Il convient que les substances connues pour être actives à pH < 7,2 soient ajoutées avant le début de l'essai, au moment approprié, pour permettre à ces substances d'agir sur les bactéries nitrifiantes.

5 Réactifs

- 5.1 Eau distillée.
- 5.2 Dihydrogénophosphate de potassium, $c(\text{KH}_2\text{PO}_4 = 0,2 \text{ mol/l})$.
- 5.3 Hydrogénophosphate de dipotassium, $c(\text{K}_2\text{HPO}_4 = 0,2 \text{ mol/l})$.
- 5.4 Chlorate de sodium, $c(\text{NaClO}_3 = 0,5 \text{ mol/l})$.
- 5.5 Sulfate de diammonium, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.
- 5.6 Hydrogencarbonate de sodium, $c(\text{NaHCO}_3 = 5 \text{ mmol/l})$.
- 5.7 Chlorure de potassium, $c(\text{KCl} = 4 \text{ mol/l})$.

5.8 Solution mère A.

Préparer la solution mère A de la façon suivante.

Dihydrogénophosphate de potassium, KH_2PO_4 (5.2)	28 ml
Hydrogénophosphate de dipotassium, K_2HPO_4 (5.3)	72 ml
Eau distillée (5.1)	100 ml

5.9 Milieu d'essai.

Préparer le milieu d'essai de la façon suivante.

Solution mère A (5.8)	10 ml
Chlorate de sodium, NaClO_3 (5.4)	10 ml à 30 ml
Sulfate de diammonium, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (5.5)	0,198 g

Diluer à 1 000 ml avec de l'eau distillée (5.1).

Le milieu d'essai contient 1 mmol/l de tampon phosphate de potassium, 5 mmol/l à 15 mmol/l de chlorate de sodium et 1,5 mmol/l de sulfate de diammonium, et son pH est d'environ 7,2.

Il convient que la concentration en chlorate de sodium choisie dans la plage indiquée soit suffisante pour réellement inhiber la formation biologique des nitrates, sans pour autant avoir d'effets négatifs sur l'oxydation de l'ammonium. Si nécessaire, vérifier l'influence de la concentration en chlorate de sodium.

Les substances chimiques d'essai à ajouter au milieu d'essai doivent d'abord être dissoutes dans le tampon phosphate décrit, puis ajoutées avant de procéder à la dilution à 1 l. Pour les substances chimiques d'essai faiblement hydrosolubles, préparer les solutions par dispersion mécanique ou en utilisant des vecteurs tels que des solvants organiques, des émulsifiants ou des agents dispersants de faible toxicité pour les bactéries nitrosantes. Si un vecteur quelconque est utilisé pour ajouter une substance chimique d'essai à la boue ou à un sol, un contrôle supplémentaire doit être effectué pour évaluer ses effets éventuels sur l'oxydation de l'ammonium.

Si des extraits de biosolides sont soumis à essai, les ajouter à part au milieu d'essai avant de procéder à la dilution à 1 l.

NOTE Lorsqu'une source de carbone est nécessaire, par exemple lors des essais menés avec des biosolides à teneurs élevées en nitrates, ajouter 10 ml de NaHCO_3 (5.6) au milieu d'essai avant de procéder à la dilution à 1 l.

6 Appareillage

6.1 Équipement normal de laboratoire.

6.2 Incubateur thermostaté à agitateur orbital.

7 Échantillonnage, conservation et caractérisation des échantillons

Des lignes directrices sur l'échantillonnage, le traitement des échantillons et la conservation sont données dans l'ISO 10381-6. Pour réaliser les essais avec des substances chimiques ou des biosolides, ou des échantillons en mélange de sols pollués, il convient de choisir un sol expérimental présentant une activité d'oxydation de l'ammonium comprise entre 200 ng N/g de masse sèche de sol/h et 800 ng N/g de masse sèche de sol/h, déterminée par un essai préliminaire. Pour réaliser des essais avec des substances chimiques, il convient que le sol ait une faible capacité d'adsorption (par exemple des sols sableux faibles en $C_{\text{org}} < 1 \%$); d'autre part il convient que le sol ait un pH compris entre 5,5 et 7,5.

Les échantillons de sol peuvent généralement être conservés au réfrigérateur à environ 4 °C sur des périodes allant jusqu'à trois mois avant utilisation (ISO 10381-6). Certains sols ne peuvent pas être conservés plus de deux semaines au réfrigérateur. La conservation des échantillons de sol dans un congélateur (-20 °C) n'est généralement pas recommandée.

Pour un certain nombre de sols provenant de climats tempérés, il a été montré que la conservation jusqu'à 12 mois à -20 °C n'inhibe pas l'activité d'oxydation de l'ammonium (Référence [4]). S'il existe des informations de cet ordre concernant un sol particulier, la conservation dans ces conditions est admise.

Le mesurage des variables suivantes est recommandé pour la caractérisation du sol:

- la granulométrie (ISO 11277);
- la teneur en eau (ISO 11465);
- la capacité de rétention d'eau (ISO 14238);
- le pH (ISO 10390);
- la capacité d'échange cationique effective (ISO 11260);
- la teneur en matière organique (ISO 10694);
- la teneur totale en azote (ISO 11261).

8 Mode opératoire

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

8.1 Essais des sols

8.1.1 Généralités

ISO 15685:2012

Il convient que le protocole d'essai inclue au moins trois réplicats de sol humide pesant environ 25 g. La teneur en eau du sol, utile pour calculer la masse sèche, est déterminée par gravimétrie conformément à l'ISO 11465.

8.1.2 Incubation initiale

Mélanger des échantillons de sol ou de déchets avec le milieu d'essai (5.9) pour former des boues. Il convient d'ajuster le volume du milieu d'essai pour obtenir un volume de liquide total précis, par exemple 100 ml. Calculer le volume de milieu à ajouter en soustrayant du volume de liquide souhaité, par exemple 100 ml, le volume d'eau contenu dans l'échantillon de sol ou de déchets initial. Incuber les boues dans des fioles de 250 ml en position verticale sur l'incubateur thermostaté à agitateur orbital (6.2) dont le thermostat est réglé à (25 ± 2) °C. Il convient que le mouvement de rotation soit suffisant pour maintenir les solides en suspension (175 r/min).

Il est nécessaire que le volume de liquide soit supérieur à 100 ml dans la boue lorsque la capacité de rétention d'eau du sol est > 200 % (sols organiques).

8.1.3 Échantillonnage des boues de sol

Prélever des échantillons (2 ml) de la boue de sol après 2 h et 6 h d'incubation, sous réserve de s'être assuré de la linéarité de la courbe d'oxydation de l'ammonium sur cette période. Il convient de bien secouer la boue de sol à chaque prélèvement des échantillons pour s'assurer de la constance du rapport solution/sol pendant l'essai. Verser les échantillons prélevés dans des tubes à essai et ajouter 2 ml de KCl (5.7) pour stopper l'oxydation de l'ammonium. Soumettre ensuite les échantillons à une centrifugation de 2 min à 3 000g, par exemple, ou à une filtration. S'il convient que la vitesse de filtration du papier filtre soit élevée, son degré de pureté chimique n'a pas besoin d'être maximal. Doser les nitrites en utilisant une méthode d'analyse chimique appropriée (voir l'ISO 14256-2). À ce stade, les solutions peuvent être conservées au réfrigérateur (entre 4 °C et 8 °C) mais il convient de les analyser dans les 24 h.

Si nécessaire, vérifier la linéarité de la courbe d'oxydation de l'ammonium dans le temps en prélevant des échantillons de boue de sol à divers moments pendant les 6 h que dure l'incubation. Cette vérification peut

s'avérer nécessaire si les laboratoires ne connaissent pas bien les types de sols utilisés au cours de l'essai. Certains cas de non-linéarité peuvent être corrigés en établissant des conditions aérobie ou en apportant une source de carbone.

8.2 Essais relatifs à l'effet des substances chimiques

Déterminer l'oxydation de l'ammonium conformément au mode opératoire indiqué pour les sols en ajoutant les substances chimiques d'essai au milieu d'essai (5.9) à différentes concentrations. Inclure dans le protocole d'essai des échantillons témoins sans substance chimique d'essai ajoutée, à titre de référence. Il convient que le nombre de réplicats de l'échantillon témoin soit le double du nombre de réplicats choisi pour chaque concentration de la substance chimique d'essai.

Effectuer un essai préliminaire pour sélectionner les concentrations de la substance chimique d'essai. Dans l'essai principal, réaliser une progression géométrique d'au moins cinq concentrations différentes. Il convient que la concentration la plus faible soumise à essai n'ait aucun effet sur l'oxydation de l'ammonium et que la plus élevée l'inhibe de 50 % à 100 %.

Lorsqu'un vecteur de dissolution d'une substance chimique est utilisé, il convient que sa concentration dans le milieu d'essai ne dépasse pas 100 mg/l. Il convient de déterminer son effet sur l'oxydation de l'ammonium en disposant d'échantillons témoins supplémentaires contenant la plus haute concentration du vecteur utilisée dans l'essai.

NOTE Pour les substances d'essai volatiles, on utilise des dispositifs particuliers qui n'entrent pas dans le domaine d'application de la présente Norme internationale.

8.3 Essais avec des sols pollués

La méthode la plus directe consiste à comparer le sol pollué à un sol de référence non pollué dont les propriétés sont comparables ou à réaliser des études de gradients sur des échantillons de sol prélevés à des niveaux de pollutions divers. Prélever une quantité suffisante pour préparer au moins quatre réplicats.

En l'absence d'un sol non pollué pouvant servir de référence, ou en cas de faible activité nitrifiante potentielle, le mode opératoire d'essai suivant est recommandé. Pré-incuber le sol pollué et un sol non pollué dont l'activité nitrifiante, connue, se situe entre 200 ng N/g de masse sèche de sol/h et 800 ng N/g de masse sèche de sol/h, avec une teneur en eau comprise entre 40 % et 60 % de la capacité de rétention d'eau ou une pression d'aspiration comprise entre -0,01 MPa et -0,03 MPa pendant deux jours, à 20 °C et dans l'obscurité. Mélanger des quantités des deux sols humides correspondant à 75 g de masse sèche selon un rapport 1:1, en équivalent sec. Conserver le mélange, le sol pollué et le sol témoin pendant 24 h à 20 °C dans l'obscurité. Mesurer l'oxydation potentielle de l'ammonium comme décrit en 8.1 en utilisant quatre réplicats du mélange et de chaque sol.

8.4 Essais avec des extraits aqueux de biosolides

L'effet d'extraits de biosolides, par exemple des boues d'épuration, sur la nitrification du sol peut être analysé. Préparer les extraits aqueux par extraction à l'eau déminéralisée pendant 24 h, selon un rapport de 1:10 [g de biosolide (masse sèche):ml d'eau], avec un pH de 7,5 (voir l'EN 14735). Séparer les particules de la phase aqueuse par centrifugation, par exemple 1 h à 1 300g. Analyser l'effet d'une série de concentrations de l'extrait sur le sol, y compris des échantillons témoins sans extrait. Suivre le mode opératoire d'essai donné en 8.1, en ajoutant l'extrait de biosolide juste avant d'ajouter le milieu d'essai. Inclure des échantillons d'extraits sans sol dans le protocole d'essai pour soustraire l'oxydation de l'ammonium par les bactéries nitrifiantes dans les extraits.

9 Calculs

Calculer la vitesse d'oxydation de l'ammonium (ng NO₂-N/g de masse sèche de sol/h) d'après la différence entre les concentrations de NO₂-N à différents moments de mesurage.

Calculer l'inhibition de l'activité d'oxydation de l'ammonium par la substance chimique d'essai ou l'extrait de biosolide comme un changement de l'activité dans le sol de référence, exprimé en pourcentage.