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

Partie 2:

**Méthode par analyse des acides gras
phospholipidiques (PLFA) en utilisant la
méthode simple d'extraction des PLFA**

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

Soil quality — Determination of soil microbial diversity —

*Part 2: Method by phospholipid fatty acid analysis (PLFA) using the
simple PLFA extraction method*

ISO/TS 29843-2:2011

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/1809eba5-6d97-49de-8ad7-96835ca9285e/iso-ts-29843-2-2011>



iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO/TS 29843-2:2011](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/1809eba5-6d97-49de-8ad7-96835ca9285e/iso-ts-29843-2-2011)
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/1809eba5-6d97-49de-8ad7-96835ca9285e/iso-ts-29843-2-2011>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2011

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	Symboles et termes abrégés (à l'exception des produits chimiques et des réactifs)	1
4	Principe	1
5	Matériaux d'essai	2
5.1	Sol	2
5.2	Réactifs	2
5.3	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	Dérivation — Transméthylation — Purification	5
6.4	Analyse PLFA	6
Bibliographie		7

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO/TS 29843-2:2011](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/1809eba5-6d97-49de-8ad7-96835ca9285e/iso-ts-29843-2-2011)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/1809eba5-6d97-49de-8ad7-96835ca9285e/iso-ts-29843-2-2011>

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.

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 29843-2 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*

Introduction

Les phospholipides sont des composants essentiels des membranes de toutes les cellules vivantes. Extraits d'échantillons de sol sous forme d'acides gras (PLFA: acides gras phospholipidiques) ou de chaînes latérales isopréniques à liaison éther (PLEL: lipides éther phospholipidiques), ils apportent des connaissances quantitatives et qualitatives relatives à la biomasse microbienne viable/active du sol. Les enzymes cellulaires hydrolysent et libèrent le groupe phosphate dans les minutes ou les heures qui suivent la mort cellulaire (Référence [1]). Le dosage des PLFA et des PLEL totaux fournit une mesure quantitative de la biomasse viable du sol, c'est-à-dire des micro-organismes des trois domaines de la biosphère (bactéries, champignons et archaebactéries). Les PLFA et les PLEL peuvent également permettre une différenciation taxonomique à l'intérieur de communautés microbiennes complexes (Références [2] et [3]). Cette approche est désormais bien établie dans le domaine de l'écologie des sols et sert d'outil phénotypique. Elle est donc complémentaire aux approches génotypiques (génétique moléculaire) pour déterminer la diversité microbienne. En plus des descriptions taxonomiques, la technique PLFA permet de déterminer les modifications physiologiques au sein des consortiums microbiens. Par exemple, les PLFA monoéniques 16:1 ω 7c et 18:1 ω 7c sont progressivement convertis en acides gras cyclopropyliques cy17:0 et cy19:0 dans les bactéries Gram-négatives en réponse aux contraintes environnementales (Référence [4]).

Il existe différentes méthodes de dosage des acides gras présents dans le sol. Ces méthodes présentent, lors de leur application, des niveaux de complexité variables et permettent d'obtenir différents niveaux de résolution concernant la description des communautés microbiennes du sol. L'ISO/TS 29843-1 traite de la méthode généralement appelée «méthode étendue d'extraction des PLFA» tandis que la présente partie de l'ISO/TS 29843 traite de celle généralement appelée «méthode simple d'extraction des PLFA» (Références [5] et [6]).

La présente partie de l'ISO/TS 29843 traitant de la méthode simple d'extraction des PLFA est accessible à la plupart des laboratoires d'analyse et de recherche concernés par les sciences de la terre. Cette méthode peut être utilisée pour un large éventail de sols. Elle fournit une mesure de la grande diversité de la communauté microbienne du sol à un niveau phénotypique. Elle peut être appliquée à l'estimation de la biomasse et peut être utilisée pour différencier les communautés microbiennes dans différents échantillons de sol (à l'aide d'une méthode statistique adaptée). Cette méthode est particulièrement adaptée à la détection des modifications rapides de la structure de la communauté microbienne du sol. Elle peut également être utilisée pour une description sommaire des groupes microbiens présents dans les échantillons de sol (par exemple les bactéries Gram-positives, les actinomycètes, les champignons). Le Tableau 1 (adapté de la Référence [5]) présente une comparaison de la sensibilité des techniques «PLFA étendue» et «PLFA simple».

Tableau 1 — Comparaison de la sensibilité des techniques PLFA «simple» et «étendue» pour la caractérisation des changements dans la composition des communautés microbiennes

Propriété	PLFA (simple)	PLFA (étendue)
Aptitude à différencier deux communautés (à l'aide de méthodes statistiques à plusieurs variables)	Oui	Oui
Applicabilité pour l'estimation de la biomasse	Oui	Oui
Aptitude à répertorier tous les composants simples de la structure d'une communauté entière («empreinte»)	Non	Oui
Aptitude à répertorier les acides gras autres que les acides gras à liaison ester	Non	Oui
Estimation du nombre d'acides gras dans les échantillons de sol	<50	200 à 400
Capacité à doser la liaison des acides gras aux lipides dans la molécule	Oui, liaison ester (EL)	Oui, liaison ester (EL), sans liaison ester (NEL)
Capacité à détecter les acides gras définis à de faibles concentrations dans l'extrait de sol	Non	Oui
Capacité à détecter les acides gras inhabituels dans l'extrait de sol	Non	Oui
Nombre de signatures disponibles d'acides gras pour des organismes définis	Peu	Nombre élevé
Relation des acides gras répandus dans le profil	Importante	Naturelle
Aptitude à identifier les organismes provoquant des changements dans la communauté microbienne	Non	Oui, dans l'ensemble

(standards.iteh.ai)

La présente méthode est dérivée de la première méthode proposée par la Référence [7] et modifiée ultérieurement par la Référence [1]. Cette méthode révisée a été largement utilisée (Référence [8]) et a également été examinée et comparée à la méthode étendue d'extraction des PLFA dans des articles publiés par des pairs (Références [5] et [6]).

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

Partie 2:

Méthode par analyse des acides gras phospholipidiques (PLFA) en utilisant la méthode simple d'extraction des PLFA

1 Domaine d'application

La présente partie de l'ISO/TS 29843 spécifie une méthode simple permettant d'extraire uniquement les acides gras phospholipidiques (PLFA) du sol.

L'ISO/TS 29843-1 spécifie une méthode étendue permettant d'extraire et de doser aussi bien les acides gras phospholipidiques (PLFA) que les lipides éther phospholipidiques (PLEL) du sol.

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/TS 29843-1, *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)*

3 Symboles et termes abrégés (à l'exception des produits chimiques et des réactifs)

FA: acides gras

EL-FA: acides gras à liaison ester

NEL-FA: acides gras sans liaison ester

FAME: ester méthylique d'acide gras

w_w : fraction massique d'eau contenue dans le sol, en grammes d'eau par grammes de sol sec (g/g)

CG: chromatographie en phase gazeuse

FID: détecteur à ionisation de flamme

CLHP: chromatographie liquide à haute performance

4 Principe

Les lipides sont extraits en appliquant le mode opératoire d'extraction de la Référence [7]. Les extraits lipidiques sont fractionnés en lipides neutres, glycolipides et phospholipides 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. Les différents FAME sont mesurés par chromatographie en phase gazeuse. Une vue d'ensemble schématique des modes opératoires est illustrée à la Figure 1.

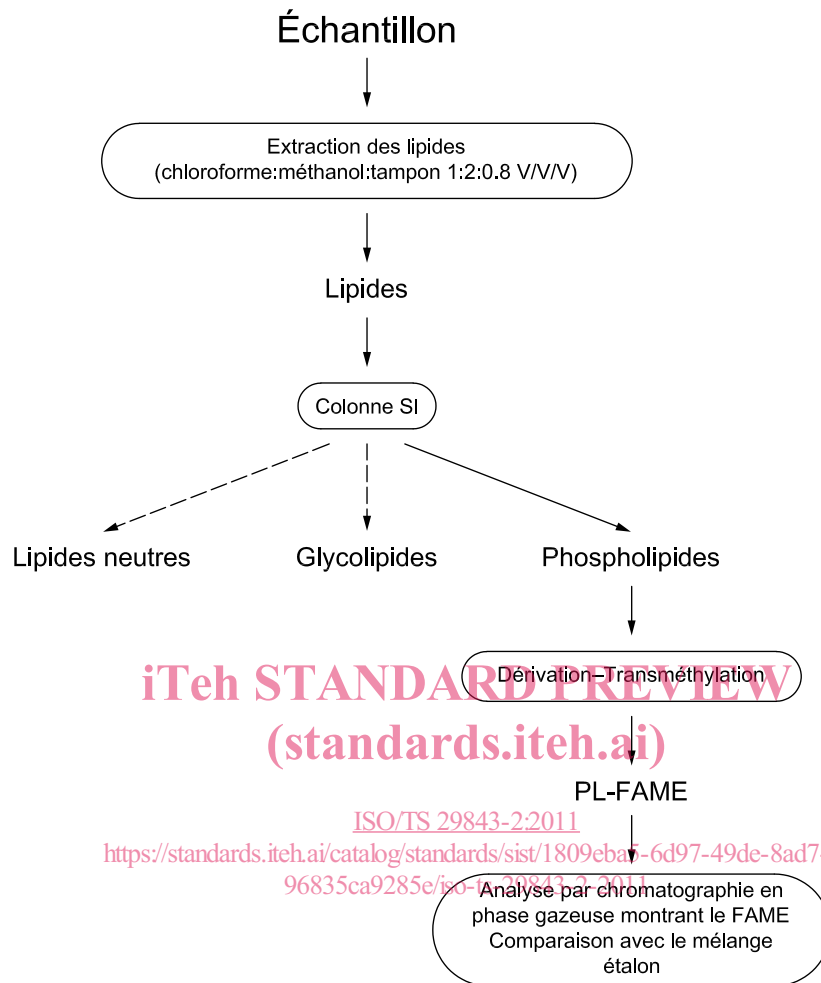


Figure 1 — Vue d'ensemble schématique de l'analyse PLFA selon la «méthode simple d'extraction»

5 Matériaux d'essai

5.1 Sol

Prélever des échantillons de sol et les préparer conformément à l'ISO 10381-6. Déterminer la fraction massique d'eau contenue dans le sol, w_w . 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 ou de qualité CLHP lorsque cela est spécifié.

5.2.1 Solvants organiques.

5.2.1.1 Acétone, C_3H_6O (qualité CLHP).

5.2.1.2 Chloroforme, $CHCl_3$ (qualité CLHP).

5.2.1.3 Hexane, C_6H_{14} .

5.2.1.4 Méthanol, CH_3OH (qualité CLHP).

5.2.1.5 Toluène, C_7H_8 .

5.2.2 Produits chimiques.

5.2.2.1 2,6-Di-*tert*-butyl-4-méthylphénol (BHT), $C_{15}H_{24}O$.

5.2.2.2 Acide citrique, $C_6H_8O_7$, H_2O .

5.2.2.3 Citrate trisodique, $C_6H_5Na_3O_7$, $2H_2O$.

5.2.2.4 Hydrate d'acide silicique, SiO_2 , nH_2O .

5.2.2.5 Sulfate de sodium anhydre, Na_2O_4S .

5.2.2.6 Hydroxyde de potassium, KOH .

5.2.2.7 Acide acétique, $C_2H_4O_2$.

5.2.2.8 Hydroxyde de sodium, $NaOH$.

5.2.2.9 Ester méthylique d'acide nanodécanoïque, $C_{20}H_{40}O_2$.

5.2.2.10 Azote gazeux, N_2 .

iTech STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/1809eba5-6d97-49de-8ad7-96835ca9285e/iso-ts-29843-2-2011>

5.2.3 Tampons et étalons.

5.2.3.1 Solution CM (chloroforme/méthanol), à un mélange de chloroforme et méthanol dans un rapport de 1:2, ajouter le 2,6-di-*tert*-butyl-4-méthylphénol (BHT) (0,005 %).

5.2.3.2 Solution CB (tampon au citrate), constituée de ce qui suit:

- acide citrique monohydrate, 0,15 mol/l, 15,76 g de $C_6H_8O_7$, H_2O dans 500 ml d'eau;
- citrate trisodique, 0,15 mol/l, 22,06 g de $C_6H_5Na_3O_7$, $2H_2O$ dans 500 ml d'eau;
- pour le pH 4, ajouter 59 ml de solution d'acide citrique à 41 ml de solution de citrate trisodique.

5.2.3.3 Solvant BD (Bligh et Dyer), à un mélange chloroforme:méthanol:tampon au citrate dans un rapport de 1:2:0,8, ajouter le 2,6-di-*tert*-butyl-4-méthylphénol (BHT) (0,005 %).

EXEMPLE (100 ml de chloroforme:200 ml de méthanol:80 ml de CB) + BHT.

5.2.3.4 Solution méthanolique de KOH, 0,2 mol/l, 0,56 g de KOH dans 50 ml de méthanol sec (sulfate de sodium anhydre), préparée extemporanément.

5.2.3.5 SE (solvant pour extraction), mélange d'hexane et de chloroforme dans un rapport de 4:1 (fraction volumique).

5.2.3.6 Acide acétique, 1 mol/l, 58 ml/l. Ajouter 58 ml d'acide acétique à 750 ml d'eau distillée et compléter à 1 l avec de l'eau distillée.