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

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

iTeh Standards
(<https://standards.iteh.ai>)
Document Preview

ISO 20130:2018

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/917b2d5d-4862-446a-a3d3-b6918ed5a4ec/iso-20130-2018>



iTeh Standards
(<https://standards.iteh.ai>)
Document Preview

ISO 20130:2018

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/917b2d5d-4862-446a-a3d3-b6918ed5a4ec/iso-20130-2018>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2018

Tous droits réservés. Sauf prescription différente ou nécessité dans le contexte de sa mise en œuvre, 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, ou la diffusion sur l'internet ou sur un intranet, sans autorisation écrite préalable. Une autorisation peut être demandée à l'ISO à l'adresse ci-après ou au comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office
Case postale 401 • Ch. de Blandonnet 8
CH-1214 Vernier, Genève
Tél.: +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 et définitions, symboles et termes abrégés	1
3.1 Termes et définitions.....	1
3.2 Symboles et termes abrégés.....	1
4 Principe	2
5 Réactifs	2
5.1 Tampons et réactifs.....	2
5.2 Substrats et solutions étalons.....	5
5.2.1 Préparation des solutions étalons.....	5
5.2.2 Préparation des solutions de substrats.....	6
6 Appareillage et matériaux	7
7 Mode opératoire	8
7.1 Préparation des courbes d'étalonnage.....	8
7.1.1 Généralités.....	8
7.1.2 Solution de PNP.....	8
7.1.3 Solution de β -naphtylamine.....	8
7.1.4 Solution de chlorure d'ammonium.....	9
7.2 Échantillonnage.....	9
7.2.1 Préparation de l'échantillon.....	9
7.2.2 Ajout des substrats.....	10
7.2.3 Mesures d'absorbance.....	12
7.2.4 Mesures des activités de l'uréase.....	12
8 Calcul des résultats	12
9 Expression des résultats	13
10 Critères de validité	13
11 Validation interlaboratoires	13
12 Rapport d'essai	14
Annexe A (informative) Validation de la méthode et essais intralaboratoire pour l'évaluation des activités enzymatiques du sol par une méthode colorimétrique	15
Annexe B (informative) Essai interlaboratoires international pour l'évaluation des activités enzymatiques du sol par une méthode colorimétrique	20
Bibliographie	29

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 (IEC) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les procédures utilisées pour élaborer le présent document et celles destinées à sa mise à jour sont décrites dans les Directives ISO/IEC, Partie 1. Il convient, en particulier, de prendre note des différents critères d'approbation requis pour les différents types de documents ISO. Le présent document a été rédigé conformément aux règles de rédaction données dans les Directives ISO/IEC, Partie 2 (voir www.iso.org/directives).

L'attention est attirée 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. Les détails concernant les références aux droits de propriété intellectuelle ou autres droits analogues identifiés lors de l'élaboration du document sont indiqués dans l'Introduction et/ou dans la liste des déclarations de brevets reçues par l'ISO (voir www.iso.org/brevets).

Les appellations commerciales éventuellement mentionnées dans le présent document sont données pour information, par souci de commodité, à l'intention des utilisateurs et ne sauraient constituer un engagement.

Pour une explication de la nature volontaire des normes, la signification des termes et expressions spécifiques de l'ISO liés à l'évaluation de la conformité, ou pour toute information au sujet de l'adhésion de l'ISO aux principes de l'Organisation mondiale du commerce (OMC) concernant les obstacles techniques au commerce (OTC), voir le lien suivant: www.iso.org/avant-propos.

Le présent document a été élaboré par le comité technique ISO/TC 190, *Qualité du sol*, sous-comité SC 4, *Caractérisation biologique*.

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 du carbone, de l'azote, du phosphore et du soufre dans le sol, peut révéler les effets nocifs causés par les produits chimiques et autres impacts anthropiques. 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 Standards
(<https://standards.iteh.ai>)
Document Preview

[ISO 20130:2018](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/917b2d5d-4862-446a-a3d3-b6918ed5a4ec/iso-20130-2018)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/917b2d5d-4862-446a-a3d3-b6918ed5a4ec/iso-20130-2018>

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

1 Domaine d'application

Le présent document spécifie une méthode de mesure simultanée (ou non) de plusieurs activités des hydrolases (arylamidase, arylsulfatase, β -galactosidase, α -glucosidase, β -glucosidase, N-acétylglucosaminidase, phosphatases acides, alcalines et globales, uréase) dans des échantillons de sol en utilisant des substrats colorimétriques. Les activités enzymatiques du sol varient en fonction des saisons et dépendent des caractéristiques chimiques, physiques et biologiques du sol. Cette méthode peut être appliquée soit pour la détection des effets nocifs de substances toxiques ou d'autres agents anthropiques dans un sol contaminé par comparaison avec un sol de référence, soit pour la réalisation d'essais sur des produits chimiques.

2 Références normatives

Les documents suivants sont cités dans le texte de sorte qu'ils constituent, pour tout ou partie de leur contenu, des exigences 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 18400-206, *Qualité du sol — Échantillonnage — Partie 206: Collecte, manipulation et conservation de sols destinés à l'évaluation de paramètres biologiques fonctionnels et structuraux en laboratoire*

3 Termes et définitions, symboles et termes abrégés

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/917b2d5d-4862-446a-a3d3-b6918ed5a4ec/iso-20130-2018>

3.1 Termes et définitions

Aucun terme n'est défini dans le présent document.

L'ISO et l'IEC tiennent à jour des bases de données terminologiques destinées à être utilisées en normalisation, consultables aux adresses suivantes:

- IEC Electropedia: disponible à l'adresse <http://www.electropedia.org/>
- ISO Online browsing platform: disponible à l'adresse <https://www.iso.org/obp>

3.2 Symboles et termes abrégés

ARN	Arylamidase
ARS	Arylsulfatase
E.C.	code d'enzyme établi par le Comité de nomenclature de l'Union internationale de biochimie et de biologie moléculaire (NC-IUBMB)
NAG	N-acétylglucosaminidase
PAC	phosphatase acide
PAK	phosphatase alcaline

PHOS	phosphatase
URE	uréase
β -GAL	β -galactosidase
α -GLU	α -glucosidase
β -GLU	β -glucosidase

4 Principe

Le présent document décrit une méthode de mesure simultanée de plusieurs activités enzymatiques dans des échantillons de sol (voir [Tableau 1](#)). Cette méthode repose sur l'utilisation de solutions d'échantillons de sol et de substrats colorimétriques qui sont incubés pendant des durées spécifiques à $25\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ ou à $37\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ dans des plaques multipuits. Après incubation, les réactions sont arrêtées, puis les plaques sont centrifugées et les surnageants transférés dans d'autres plaques. Les intensités de coloration sont mesurées par absorbance à l'aide d'un spectrophotomètre UV/visible pour microplaques à 96 puits.

Tableau 1 — Mesures des activités enzymatiques par une méthode colorimétrique

Enzyme	Abréviation	N°	Cycle dans le sol	Macromolécule dégradée
Arylamidase	ARN	E.C. 3.4.11.2	Azote	
Arylsulfatase	ARS	E.C. 3.1.6.1	Soufre	Minéralisation du soufre organique
β -Galactosidase	β GAL	E.C. 3.2.1.22	Carbone	Hémicellulose
α -Glucosidase	α GLU	E.C. 3.2.1.20	Carbone	Amidon et glycogène
β -Glucosidase	β GLU	E.C. 3.2.1.21	Carbone	Cellulose
N-acétyl-glucosaminidase	NAG	E.C. 3.2.1.52	Carbone	Chitine et autres polymères de glucosamine liés en β -1,4
Phosphatase	PHOS	E.C. 3.1.4.1	Phosphore	Esters de phosphate
Phosphatase acide	PAC	E.C. 3.1.4.1	Phosphore	Esters de phosphate
Phosphatase alcaline	PAK	E.C. 3.1.4.1	Phosphore	Esters de phosphate
Uréase	URE	E.C. 3.5.1.5	Azote	Urée

Un essai interlaboratoires a été réalisé pour la validation de la courbe d'étalonnage; un récapitulatif de l'essai interlaboratoires international est donné dans le [Tableau 8](#) et les données de l'essai de validation interlaboratoires sont données en totalité à l'[Annexe B](#).

5 Réactifs

5.1 Tampons et réactifs

5.1.1 Généralités

L'eau déminéralisée est choisie comme milieu pour évaluer les activités des enzymes natives du sol au pH du sol et également pour permettre l'analyse de plusieurs enzymes en utilisant la même suspension de sol. Le rapport sol (en g)/eau (en ml) (4:25) est optimisé pour maximiser la réaction et la sensibilité, et pour faciliter le pipetage. L'utilisation de la même solution de sol pour analyser plusieurs enzymes permet d'obtenir des données plus comparables. L'arylamidase est mesurée avec un tampon

Tris 50 mmol/l pH 7,5 et les phosphatases acides et alcalines sont respectivement mesurées avec un tampon Tris-HCl 50 mmol/l à pH 5,5 et un tampon Tris-base 50 mmol/l à pH 11.

NOTE Le volume peut être adapté selon les besoins.

5.1.2 Tris HCl 50 mmol/l pH 5,5 ± 0,1.

- Hydrochlorure de tris(hydroxyméthyl)aminométhane (numéro CAS: 1185-53-1 – PM: 157,6): 7,88 g;
- eau déminéralisée: 1 000 ml;
- acide chlorhydrique (HCl) (numéro CAS: 7647-01-0) 1 mol/l.

Dissoudre 7,88 g d'hydrochlorure de tris(hydroxyméthyl)aminométhane dans 800 ml d'eau déminéralisée et ajuster à pH 5,5 avec de l'acide chlorhydrique (1 mol/l). Compléter à 1 000 ml. La durée de conservation ne doit pas dépasser un mois à 4 °C ± 2 °C dans un flacon en verre ou en polypropylène).

5.1.3 Tris base 50 mmol/l pH 11 ± 0,1.

- Tris(hydroxyméthyl)aminométhane (numéro CAS: 77-86-1 – PM: 121,14): 6,06 g;
- eau déminéralisée: 1 000 ml;
- hydroxyde de sodium (numéro CAS: 1310-73-2) (1 mol/l).

Dissoudre 6,06 g de tris(hydroxyméthyl)aminométhane dans 800 ml d'eau déminéralisée et ajuster à pH 11 avec de l'hydroxyde de sodium (1 mol/l). Compléter à 1 000 ml. La durée de conservation ne doit pas dépasser un mois à 4 °C ± 2 °C.

5.1.4 Tris base 50 mmol/l pH 7,5 ± 0,1.

- Tris(hydroxyméthyl)aminométhane (numéro CAS: 77-86-1 – PM: 121,14): 6,06 g;
- eau déminéralisée: 1 000 ml;
- acide chlorhydrique (HCl) (numéro CAS: 7647-01-0) 1 mol/l.

Dissoudre 6,06 g de tris(hydroxyméthyl)aminométhane dans 800 ml d'eau déminéralisée et ajuster à pH 7,5 avec de l'acide chlorhydrique (1 mol/l). Compléter à 1 000 ml. La durée de conservation ne doit pas dépasser un mois à 4 °C ± 2 °C.

5.1.5 Tris base 100 mmol/l pH 12 ± 0,1.

- Tris(hydroxyméthyl)aminométhane (numéro CAS: 77-86-1 – PM: 121,14): 12,11 g;
- eau déminéralisée: 1 000 ml;
- hydroxyde de sodium (numéro CAS: 1310-73-2) (5 mol/l).

Dissoudre 12,11 g de tris(hydroxyméthyl)aminométhane dans 800 ml d'eau déminéralisée et ajuster à pH 12 avec de l'hydroxyde de sodium (5 mol/l). Compléter à 1 000 ml. La durée de conservation ne doit pas dépasser un mois à 4 °C ± 2 °C.

5.1.6 Chlorure de calcium dihydraté 0,5 mol/l.

- Chlorure de calcium dihydraté (numéro CAS: 10035-04-8 – PM: 147,01): 14,7 g;
- eau déminéralisée: 200 ml.

Dissoudre 14,7 g de chlorure de calcium dihydraté dans 200 ml d'eau déminéralisée. La durée de conservation ne doit pas dépasser un mois à 4 °C ± 2 °C.

5.1.7 Réactif salicylate.

- Salicylate de sodium 270 mmol/l (numéro CAS: 54-21-7 – PM: 160,1): 865 mg;
- citrate trisodique 145 mmol/l (numéro CAS: 6132-04-3 – PM: 294,1): 853 mg;
- tartrate disodique 60 mmol/l (numéro CAS: 6106-24-7 – PM: 230,08): 276 mg;
- nitroferricyanure de sodium 2 mmol/l (numéro CAS: 13755-38-9 – PM: 297,95): 12 mg;
- eau déminéralisée: 20 ml.

Le réactif salicylate est préparé, juste avant l'analyse, avec les 4 composés énumérés ci-dessus: dissoudre 865 mg de salicylate de sodium, 853 mg de citrate trisodique, 276 mg de tartrate disodique et 12 mg de nitroferricyanure de sodium dans 20 ml d'eau déminéralisée.

5.1.8 Réactif cyanurate.

- Citrate trisodique 580 mmol/l (numéro CAS: 6132-04-3 – PM: 294,1): 3,4 g;
- tartrate disodique 90 mmol/l (numéro CAS: 6106-24-7 – PM: 230,08): 414 mg;
- hydroxyde de lithium 280 mmol/l (numéro CAS: 1310-65-2 – PM: 23,95): 134 mg;
- dichloroisocyanurate 10 mmol/l (numéro CAS: 51580-86-0 – PM: 255,98): 51 mg;
- eau déminéralisée: 20 ml.

Le réactif cyanurate est préparé, juste avant l'analyse, avec les 4 composés énumérés ci-dessus: dissoudre 3,4 g de citrate trisodique, 414 mg de tartrate disodique, 134 mg d'hydroxyde de lithium et 51 mg de dichloroisocyanurate dans 20 ml d'eau déminéralisée.

5.1.9 Éthanol à 96 %.

- Éthanol à 96 % (numéro CAS: 41340-36-7). [ISO 20130:2018
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/917b2d5d-4862-446a-a3d3-b6918ed5a4ec/iso-20130-2018](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/917b2d5d-4862-446a-a3d3-b6918ed5a4ec/iso-20130-2018)

5.1.10 Éthanol acidifié (HCl à 0,26 mol/l).

- Réactif ACS acide chlorhydrique, à 37 % (numéro CAS: 7647-01-0) 4,32 ml;
- éthanol à 96 % (numéro CAS: 41340-36-7).

Diluer 4,32 ml de HCl concentré dans 200 ml d'éthanol à 96 %. La durée de conservation ne doit pas dépasser un mois à 4 °C ± 2 °C.

5.1.11 p-diméthylaminocinnamaldéhyde (DMCA) (3,5 mmol/l).

- DMCA (numéro CAS: 6203-18-5 – PM: 175,23): 0,12 g;
- éthanol à 96 % (numéro CAS: 41340-36-7).

Dissoudre 0,12 g de DMCA dans 200 ml d'éthanol à 96 %. La durée de conservation ne doit pas dépasser une semaine à -20 °C ± 2 °C.

Tableau 2 — Utilisation des tampons pour la mesure des activités enzymatiques

	ARS; α -GLU; β -GLU; β -GAL; NAG; PHOS	ARN	URE	PAC	PAK
Solution de sol	Eau déminéralisée	Tris base 50 mmol/l, pH 7,5	Eau déminéralisée	Tris HCl 50 mmol/l, pH 5,5	Tris base 50 mmol/l, pH 11
Arrêt/ révélation	Tris 100 mmol/l pH12	Éthanol à 96 % Éthanol acidifié	Réactif salicylate	Tris 100 mmol/l pH 12	
	CaCl ₂ 0,5 mol/l	DMCA	Réactif cyanurate	CaCl ₂ 0,5 mol/l	

5.2 Substrats et solutions étalons

5.2.1 Préparation des solutions étalons

5.2.1.1 Para-nitrophénol (numéro CAS: 100-02-7 - PNP) à 3,6 mmol/l.

- Para-nitrophénol (PNP) (PM: 139,11): 10 mg;
- eau déminéralisée: 20 ml.

Il convient de conserver le PNP en poudre à $-20\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ à l'abri de la lumière. Peser soigneusement le PNP, puis le dissoudre dans de l'eau déminéralisée. La concentration de travail est de 0,36 mmol/l (c'est-à-dire dilution de la solution concentrée à 1/10). La durée de conservation des solutions aux concentrations de travail ne doit pas dépasser deux ans à $-20\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$. Les solutions peuvent être aliquotées pour une utilisation ou pour un nombre maximal de trois cycles de congélation/décongélation.

NOTE Le para-nitrophénol présente un risque d'effets graves pour les organes à la suite d'expositions répétées ou d'une exposition prolongée et il est nocif en cas d'ingestion (H373), de contact cutané ou d'inhalation (H302, H312 et H332). Prévoir une ventilation et des protections adéquates.

5.2.1.2 Chlorure d'ammonium (NH₄Cl) à 62 mmol/l.

- Chlorure d'ammonium (numéro CAS: 12125-02-9 – PM: 53,49): 66,4 mg;
- eau déminéralisée: 20 ml.

Il est possible de conserver le chlorure d'ammonium en poudre à température ambiante et à l'abri de la lumière. Peser soigneusement le chlorure d'ammonium puis le dissoudre dans de l'eau déminéralisée. Il convient de conserver la solution concentrée pendant deux ans à $-20\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$. La durée de conservation de la solution concentrée ne doit pas dépasser deux ans à $-20\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$. La concentration de travail est de 0,62 mmol/l (dilution à 1/100). La durée de conservation de la solution à la concentration de travail ne doit pas dépasser deux ans à $-20\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$.

5.2.1.3 β -naphtylamine, 1 mmol/l.

- β -naphtylamine (numéro CAS: 91-59-8 – PM: 143,19): 35,8 mg;
- éthanol à 96 %: 20 ml;
- eau déminéralisée.