
**Qualité du sol — Essais simples de
laboratoire de caractérisation de
la dénitrification dans les sols, un
processus source d'émission de N₂O —**

Partie 1:

**Activités des enzymes dénitrifiantes
du sol**

(standards.iteh.ai)

*Soil quality — Easy laboratory assessments of soil denitrification, a
process source of N₂O emissions —*

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/3091fa-9290-4d10-8363-368f1cc7472a/iso-ts-20131-1-2018>
Part 1: Soil denitrifying enzymes activities



iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO/TS 20131-1:2018

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/30f91fea-9290-4d10-8363-368ffc7472a/iso-ts-20131-1-2018>



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	1
4 Symboles et abréviations (sauf produits chimiques et réactifs)	2
5 Principe	2
6 Matériaux	2
6.1 Matériaux d'essai.....	2
6.2 Appareillage.....	2
6.3 Sol soumis à essai.....	3
6.4 Réactifs.....	3
7 Modes opératoires	3
7.1 Échantillonnage et préparation du sol.....	3
7.2 Incubation de boues.....	4
7.3 Analyse des échantillons de gaz.....	4
8 Critères de validité	4
9 Suggestions supplémentaires	4
9.1 Incubation de boues.....	4
9.2 Contrôle du mode opératoire.....	4
9.3 Analyse des échantillons de gaz.....	4
10 Présentation et interprétation des données	5
10.1 Activité des enzymes dénitrifiantes (DEA).....	5
10.2 Suggestion complémentaire: Production relative de N ₂ O pendant la dénitrification (<i>r</i>).....	5
11 Rapport d'essai	6
Annexe A (informative) Essai circulaire international	7
Bibliographie	12

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/iso/fr/avant-propos.html.

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

Une liste de toutes les parties de la série ISO/TS 20131 se trouve sur le site Web de l'ISO.

Introduction

La série de l'ISO/TS 20131 décrit quelques essais simples de laboratoire pour l'évaluation de la dénitrification dans les sols, la dénitrification étant un processus source d'émissions de N_2O .

— Contexte scientifique

La dénitrification est le principal processus de retour de l'azote dans l'atmosphère. Ce processus correspond à la réduction du nitrate en nitrite, puis successivement à la réduction du nitrite en oxyde nitrique, oxyde nitreux et diazote qui sont des formes gazeuses. Les sols (naturels et anthropiques) constituent une source importante pour la dénitrification et les émissions d'oxyde nitreux. Généralement, la dénitrification des sols implique une catalyse microbienne. La dénitrification est un processus microbien dans lequel les oxydes d'azote jouent le rôle d'accepteurs d'électrons durant la respiration anaérobie. Chaque étape du processus de dénitrification est catalysée par une enzyme spécifique. La dénitrification est connue comme étant un processus reliant les cycles de l'azote et du carbone. Pendant le processus de dénitrification, les composés organiques des sols peuvent jouer le rôle de donneurs d'électrons. Voir [Figure 1](#).

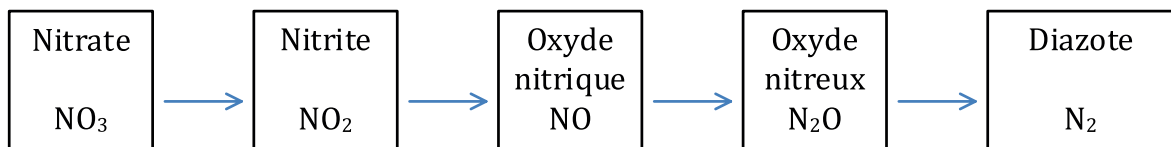


Figure 1 — Description du processus de dénitrification

L'étude du processus de dénitrification dans les sols à l'échelle du terrain pose différents problèmes: comprendre le cycle de l'azote pour limiter la perte d'azote en agriculture, comprendre le devenir des contaminants de l'eau tels que les nitrates et les nitrites, comprendre la production et le devenir des polluants atmosphériques tels que le NO et le N_2O . La connaissance de la dénitrification dans les sols est également nécessaire pour l'approche globale des cycles biogéochimiques et des changements globaux. La dénitrification constitue par ailleurs un modèle intéressant pour l'écologie microbienne.

La forme gazeuse oxyde nitreux (N_2O), principalement produite durant le processus de dénitrification, est un gaz à effet de serre présentant un potentiel élevé de forçage radiatif par unité de masse ou molécule, estimé 296 fois supérieur à celui du dioxyde de carbone (CO_2) sur une période de 100 ans^[1]. L'oxyde nitreux intervient également dans la déplétion de l'ozone^[2]. Les concentrations de N_2O ont augmenté d'une valeur préindustrielle de 270 ppb à une valeur de 328 ppb en 2016. À l'échelle mondiale, on estime que l'oxyde nitreux représente 6 % du forçage radiatif. Il apparaît que les sols agricoles et naturels constituent la principale source de ce gaz à effet de serre^[3].

Les sols jouent à la fois un rôle de sources et de puits de N_2O . Toutefois, à l'échelle mondiale, les émissions de N_2O dominent l'activité d'absorption. La production et la consommation de N_2O dans les sols impliquent essentiellement des processus biotiques. De nombreux groupes de microorganismes contribuent à la production et à la consommation de N_2O , mais la dénitrification biologique est considérée comme étant le processus dominant. La dernière étape de dénitrification est le seul processus terrestre connu permettant la consommation du N_2O en quantité significative. Elle fait intervenir l'activité enzymatique N_2O réductase, qui est inhibée par une pression partielle élevée d'acétylène^[4].

— Contexte méthodologique

Les mesurages directs de la dénitrification dans les sols sont coûteux et exigeants en temps et en main d'œuvre, en raison de la dilution immédiate du N₂ produit dans l'atmosphère et de l'importante variabilité spatiale et temporelle de la dénitrification dans les sols. Ainsi, des expériences de laboratoire simples, même si elles ne sont pas suffisantes pour comprendre la dénitrification *in situ*, peuvent être utiles pour mieux comprendre la dénitrification dans les sols et évaluer les émissions d'oxyde nitreux par les sols. Pour trouver une certaine utilisation générique des résultats de ces essais de laboratoire, il semble essentiel de les réaliser dans des conditions strictement normalisées.

La série de l'ISO/TS 20131 inclut deux essais ayant été précédemment publiés dans des revues à comité de lecture et qui sont accessibles à la plupart des laboratoires de recherche et d'analyse du secteur des sciences des sols. Comme ils sont tous deux mis en œuvre sur des sols tamisés, ils sont assez aisés à réaliser et peuvent être employés pour une grande variété de sols.

Le présent document décrit une méthode générique pour évaluer les activités des enzymes dénitrifiantes dans les sols [5]. Elle caractérise de manière globale la transformation de la forme nitrate en formes oxyde nitreux et diazote. Cette méthode a tout d'abord été proposée par la Référence [5] sous l'acronyme DEA pour Denitrifying Enzyme Activities (activités des enzymes dénitrifiantes). Elle cible essentiellement la flèche noire de la Figure 2.

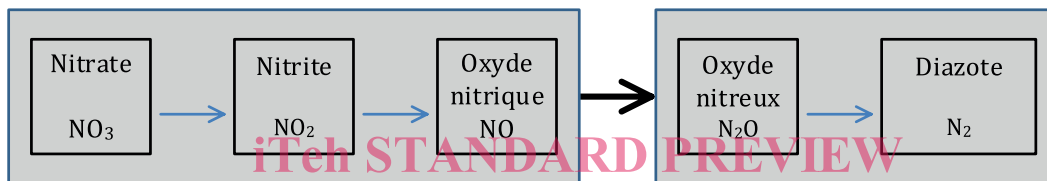


Figure 2 — Cible de l'étape du processus de dénitrification principalement examinée dans l'essai DEA

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/30f91fea-9290-4d10-8363-0618f174771e/iso-ts-20131-1-2018>

L'essai DEA évalue le processus de dénitrification d'échantillons de sols frais incubés dans des conditions optimales de substrats (sources de nitrate et de carbone) et d'environnement (anaérobiose, température contrôlée) pour le processus de dénitrification. La synthèse d'enzymes *de novo* est bloquée par l'emploi de chloramphénicol. On considère que la DEA représente la taille du réservoir d'enzymes dénitrifiantes présent dans l'échantillon de sol au moment du prélèvement de l'échantillon. Il s'agit d'une technique normalisée utilisée dans de nombreuses études scientifiques.

La deuxième partie de l'ISO/TS 20131 décrit aussi un essai révélant les capacités des sols à réduire le N₂O, la dernière étape du processus de dénitrification (c'est-à-dire la réduction du N₂O produit lors de la dénitrification du nitrate en diazote). Il cible essentiellement la flèche noire de la Figure 3. Cet essai permet de déterminer l'accumulation transitoire de N₂O durant le processus de dénitrification. Il dérive d'une étude proposée par la Référence [5]. Des adaptations méthodologiques et de nouvelles interprétations des résultats avaient été expliquées dans la Référence [6].

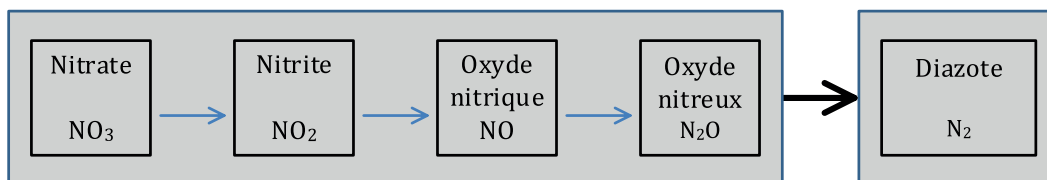


Figure 3 — Cible de l'étape du processus de dénitrification essentiellement examinée durant l'étude de la capacité des sols à réduire le N₂O

Les principes des deux parties de la série de l'ISO/TS 20131 sont résumés dans le Tableau 1.

Tableau 1 — Résumé des deux parties de la série de l'ISO/TS 20131

	Partie un: Activités des enzymes dénitrifiantes des sol ^[5]	Partie deux: Capacité des sols à réduire le N ₂ O ^[6]
Principes de la méthodologie	Anaérobiose pour optimiser le processus de dénitrification	
	Utilisation d'acétylène pour inhiber la N ₂ O réductase	
	Addition de substrat — Nitrate — Carbone	Addition de substrat — Nitrate — N ₂ O (facultatif)
	Addition de chloramphénicol	
Capacité à évaluer la dénitrification sur le terrain	L'essai révèle la concentration des enzymes dénitrifiantes fonctionnelles présentes dans l'échantillon au moment de son prélèvement ^[5] ^[7] . Dans certains cas, des corrélations ont été observées entre la DEA et la dénitrification annuelle dans les sols ^[8] .	
Capacité à évaluer l'émission de N ₂ O	Pas de données	Les résultats peuvent être utilisés — en eux-mêmes pour distinguer les sols ayant des taux potentiellement élevés d'émission de N ₂ O à l'échelle du terrain ^[6] — combinés dans le modèle NOE ^[9] pour calculer l'émission de N ₂ O du sol
Nombre (<i>n</i>) de publications dans lesquelles l'essai est utilisé	<i>n</i> > 100	10 > <i>n</i> > 100

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO/TS 20131-1:2018

[https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/3091fa-9290-4d10-8363-](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/3091fa-9290-4d10-8363-368fcc7472a/iso-ts-20131-1-2018)

[368fcc7472a/iso-ts-20131-1-2018](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/3091fa-9290-4d10-8363-368fcc7472a/iso-ts-20131-1-2018)

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO/TS 20131-1:2018

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/30f91fea-9290-4d10-8363-368ffc7472a/iso-ts-20131-1-2018>

Qualité du sol — Essais simples de laboratoire de caractérisation de la dénitrification dans les sols, un processus source d'émission de N₂O —

Partie 1: Activités des enzymes dénitrifiantes du sol

1 Domaine d'application

Le présent document présente un essai de laboratoire permettant de caractériser l'activité des enzymes dénitrifiantes dans les sols^[5]. Il caractérise de manière globale la transformation de la forme nitrate en formes oxyde nitreux et diazote. Cette méthode a tout d'abord été proposée par la Référence [5] sous l'acronyme DEA pour Denitrifying Enzyme Activities (activités des enzymes dénitrifiantes). Il s'agit d'une technique normalisée utilisée dans de nombreuses études scientifiques.

L'essai DEA estime le processus de dénitrification d'échantillons de sols frais incubés dans des conditions optimales de substrats (sources de nitrate et de carbone) et d'environnement (anaérobiose, température contrôlée) pour le processus de dénitrification. La synthèse d'enzymes *de novo* est bloquée par l'emploi de chloramphénicol. On considère que la DEA représente la taille du réservoir d'enzymes dénitrifiantes présent dans l'échantillon de sol au moment du prélèvement de l'échantillon.

Cet essai est réalisé en laboratoire sur des échantillons tamisés composites prélevés à l'échelle d'une parcelle. Il peut être réalisé sur tous les types de sols échantillonnés tout au long de l'année.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/30f91fea-9290-4d10-8363-368ffc7472a/iso-ts-20131-1-2018>

2 Références normatives

Les documents suivants cités dans le texte 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 11465, *Qualité du sol — Détermination de la teneur pondérale en matière sèche et en eau — Méthode gravimétrique*

ISO 18400-206¹⁾, *Qualité du sol — Échantillonnage — Partie 206: Collecte, manipulation et conservation de sols destinés à l'évaluation de paramètres biologiques fonctionnels et structurels en laboratoire*

3 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:

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

1) En cours d'élaboration. Stade au moment de publication ISO/FDIS 18400-2106:2017.

4 Symboles et abréviations (sauf produits chimiques et réactifs)

DEA	activité des enzymes dénitrifiantes (denitrifying enzyme activity) (μg de $\text{N}_2\text{O}\cdot\text{N}\cdot\text{g}^{-1}$ de sol $\cdot\text{h}^{-1}$)
ECD	détecteur à capture d'électrons (electron capture detector)
CG	chromatographe en phase gazeuse
SWC	teneur en eau du sol (soil water content) (g d'eau $\cdot\text{g}^{-1}$ de sol sec)
TCD	détecteur à conductivité thermique (thermal conductivity detector)

5 Principe

La méthode est fondée sur deux principes:

- optimisation de toutes les conditions nécessaires à l'activité des enzymes dénitrifiantes, apport de nitrate et d'un donneur d'électrons, absence d'oxygène et pas de limitation de la diffusion, de telle sorte que la vitesse de production de N_2O soit proportionnelle à la teneur en enzymes dénitrifiantes;
- mesurage de la libération de N_2O par les boues de sol dans ces conditions optimisées, dès que possible après l'échantillonnage du sol, pour révéler l'activité des enzymes dénitrifiantes préexistantes dans la microflore du sol lors du prélèvement.

Par conséquent, les échantillons de sol sont placés dans des conditions anaérobies avec addition de nitrates, d'une source de carbone et de chloramphénicol sur une période de 2 h en présence d'acétylène. La libération de N_2O dans ces conditions est mesurée et révèle la concentration des enzymes dénitrifiantes fonctionnelles dans l'échantillon au moment de son prélèvement^{[6][9]}.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/30f91fea-9290-4d10-8363-368f1cc7472a/iso-ts-20131-1-2018>

6 Matériaux

6.1 Matériaux d'essai

6.1.1 Flacons sous vide (<5 ml) avec septums en butyle et capsules serties.

6.1.2 Aiguilles, seringues.

6.1.3 Bouchons en caoutchouc et capuchons à vis avec un trou pour les fioles d'incubation.

6.2 Appareillage

Matériel de laboratoire courant:

6.2.1 Fioles d'incubation ayant une capacité d'environ 125 ml.

6.2.2 Hotte de laboratoire.

6.2.3 Agitateur rotatif ou orbital (180 r/min).

6.2.4 Balance de laboratoire (exactitude 0,1 g).

6.2.5 Pompe à vide.

6.2.6 Chromatographes en phase gazeuse.

6.2.6.1 Détecteur ECD, colonne Porapak Q remplie ou capillaire.

6.2.6.2 Détecteur TCD, colonne Porapak Q remplie ou capillaire (facultative).

6.3 Sol soumis à essai

L'essai doit être réalisé sur des échantillons frais, directement après échantillonnage si possible.

6.4 Réactifs

6.4.1 Produits chimiques.

6.4.1.1 Nitrate de potassium, KNO_3 .

6.4.1.2 Glucose, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$.

6.4.1.3 Chloramphénicol, $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_5$.

6.4.1.4 Azote, N_2 .

NOTE De l'hélium ou de l'argon peuvent également être employés comme gaz inertes.

6.4.1.5 Acétylène sans acétone, C_2H_2 .

6.4.1.6 Krypton, Kr, facultatif.

ISO/TS 20131-1:2018
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/3091fea-9290-4d10-8363-368f1cc7472a/iso-ts-20131-1-2018>

6.4.2 Solutions.

6.4.2.1 Solution S1, constituée de KNO_3 (1 mmol·l⁻¹), $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ (1 mmol·l⁻¹), $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_5$ (3 mmol·l⁻¹). Il convient d'utiliser une solution S1 fraîchement préparée.

7 Modes opératoires

7.1 Échantillonnage et préparation du sol

Prélever au moins 10 échantillons de sol sur les 0 cm à 20 cm d'une surface totale d'environ 1 000 m² d'une parcelle de sol (NOTE 1), de manière à obtenir environ 1 kg de sol frais. Éviter l'échantillonnage au cours des deux semaines suivant un événement de fertilisation. Obtenir un sol composite en tamisant (2 mm) ensemble les 10 échantillons (NOTE 2).

NOTE 1 Adaptable aux besoins de l'étude ou à la situation.

NOTE 2 Un tamisage plus large (jusqu'à 5 mm) est accepté, car un tamisage de 2 mm n'est pas possible pour certains sols frais.

Démarrer l'incubation dès que possible après le prélèvement des échantillons de sol. Dans les cas exceptionnels où il est impossible de réaliser le mesurage rapidement après le prélèvement, conserver les échantillons de sol conformément à l'ISO 18400-206, c'est-à-dire à (4 ± 2) °C dans un endroit bien aéré, pendant trois mois au maximum.

Déterminer la teneur en eau du sol tamisé (SWC) (g d'eau·g⁻¹ de sol sec) conformément à l'ISO 11465, lors du démarrage de l'incubation.