
**Qualité du sol — Détermination de
l'activité des déshydrogénases dans
les sols —**

**Partie 1:
Méthode au chlorure de
triphényltétrazolium (CTT)**

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

*Soil quality — Determination of dehydrogenases activity in soils —
Part 1: Method using triphenyltetrazolium chloride (TTC)*

ISO 23753-1:2019

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d683a251-56d9-47f1-98e5-4b93958ce743/iso-23753-1-2019>



iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 23753-1:2019

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d683a251-56d9-47f1-98e5-4b93958ce743/iso-23753-1-2019>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2019

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 Principe | 1 |
| 5 Restrictions | 1 |
| 6 Réactifs et produits | 2 |
| 7 Appareillage | 3 |
| 8 Mode opératoire | 3 |
| 8.1 Établissement de la courbe d'étalonnage..... | 3 |
| 8.2 Échantillonnage..... | 3 |
| 9 Calculs | 4 |
| 10 Critères de validité | 5 |
| 10.1 Courbe d'étalonnage..... | 5 |
| 10.2 Échantillons..... | 5 |
| 11 Rapport d'essai | 5 |
| Annexe A (informative) Résultats obtenus avec les paramètres modifiés | 6 |
| Bibliographie | 9 |

ISO 23753-1:2019

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d683a251-56d9-47f1-98e5-4b93958ce743/iso-23753-1-2019>

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 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*.

Cette deuxième édition annule et remplace la première édition (ISO 23753-1:2005), qui a fait l'objet d'une révision technique. Les principales modifications par rapport à l'édition précédente sont les suivantes:

- un nouvel [Article 5](#) «Restrictions» a été ajouté;
- à [l'Article 6](#), les réactifs et leur préparation ont été mis à jour avec les nouveaux résultats [par exemple, utilisation d'un solvant moins toxique (éthanol), concentration du substrat de 60 mmol/l de CTT, concentration du tampon Tris de 100 mmol/l à un pH de 7,6, durée d'incubation de 6 h];
- les [Tableaux 1](#) et [2](#) ont été ajoutés;
- [l'Article 10](#) «Critères de validité» a été ajouté;
- une nouvelle [Annexe A](#) «Résultats obtenus avec les paramètres modifiés» a été ajoutée;
- [l'Article 2](#) «Références normatives» et la bibliographie ont été mis à jour.

Une liste de toutes les parties de la série ISO 23753 se trouve sur le site Web de l'ISO.

Il convient que l'utilisateur adresse tout retour d'information ou toute question concernant le présent document à l'organisme national de normalisation de son pays. Une liste exhaustive desdits organismes se trouve à l'adresse www.iso.org/fr/members.html.

Introduction

La microflore du sol est responsable de la décomposition et de la transformation des matières organiques, des cycles du carbone, de l'azote, du soufre et du phosphore, de la stabilité des agrégats du sol et sert de source de nourriture pour les organismes microbivores. Les déshydrogénases, en tant qu'enzymes intracellulaires et composants de la chaîne respiratoire des cellules microbiennes, jouent un rôle fondamental dans la production d'énergie par les organismes. Elles permettent l'oxydation des composés organiques par le transfert d'électrons à un accepteur (par exemple, NAD⁺). Les déshydrogénases sont des composants essentiels du système enzymatique des micro-organismes. L'activité des déshydrogénases peut donc être utilisée comme indicateur des réactions biologiques d'oxydoréduction ainsi que pour mesurer la communauté microbienne viable et physiologiquement active dans le sol.

L'activité microbienne oxydative dans le sol est liée à l'activité respiratoire, qui pourrait être évaluée approximativement en déterminant l'activité des déshydrogénases. La respiration basale et induite dans le sol pourrait être affectée par la gestion, les pratiques de gestion et la contamination des sols.

iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

[ISO 23753-1:2019](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d683a251-56d9-47f1-98e5-4b93958ce743/iso-23753-1-2019)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d683a251-56d9-47f1-98e5-4b93958ce743/iso-23753-1-2019>

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 23753-1:2019

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d683a251-56d9-47f1-98e5-4b93958ce743/iso-23753-1-2019>

Qualité du sol — Détermination de l'activité des déshydrogénases dans les sols —

Partie 1: Méthode au chlorure de triphényltétrazolium (CTT)

1 Domaine d'application

Le présent document spécifie une méthode de détermination de l'activité des enzymes déshydrogénases dans le sol à l'aide de chlorure de 2,3,5-triphényltétrazolium (CTT).

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

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d683a251-56d9-47f1-98e5-4b93958ce743/iso-23753-1-2019>

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 <http://www.electropedia.org/>

4 Principe

La solution de CTT est ajoutée à un échantillon de sol et le mélange est incubé à $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ pendant 6 h. Le triphényl-formazan (TPF) formé est extrait à l'éthanol et quantifié par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 485 nm.

NOTE 1 Cette méthode est fondée sur une version modifiée de la méthode décrite dans la Référence [2].

NOTE 2 D'autres liquides d'extraction que l'éthanol peuvent être utilisés (par exemple, l'acétone).

5 Restrictions

- La conservation pouvant modifier l'activité enzymatique, il convient de ne pas comparer l'activité des déshydrogénases sur des échantillons conservés pendant des durées différentes.
- Des composés abiotiques, tels que les composés du fer(II) ou les sulfures, peuvent réduire le CTT et, par conséquent, interférer avec la détermination de l'activité des déshydrogénases.

- La présence de charbon ou de matière carbonée similaire au charbon peut induire un biais significatif, qui rend inadéquate la méthode de détermination de l'activité des déshydrogénases. Pour pallier ce biais, il convient, dans ces situations, avant de mettre en œuvre la méthode de détermination de l'activité des déshydrogénases, d'ajouter une solution étalon de TPF à l'échantillon. Après avoir agité les échantillons pendant 1 h à l'abri de la lumière et les avoir centrifugés, le surnageant est utilisé pour effectuer le dosage par spectrophotométrie à 485 nm. Il convient que la différence entre l'absorbance mesurée et attendue et la concentration de TPF ne soit pas supérieure à 20 %.
- Pour les couches de litière organique, la tourbe et les boues lacustres riches en substances organiques, il est recommandé d'utiliser un échantillon d'une masse de 0,5 g et un tube à essai de 2 cm de diamètre.^[3] Toutefois, les solvants organiques utilisés peuvent extraire des quantités excessives de matière organique de ces échantillons qui en sont riches, donnant des valeurs à blanc (ρ_{bs}) qui peuvent ne pas différer des valeurs mesurées (ρ_{cs}). C'est pourquoi cette méthode ne peut pas être recommandée sans restriction pour ce type de substrats.

6 Réactifs et produits

6.1 Sol.

Les échantillons de sol doivent être collectés et préparés comme spécifié dans l'ISO 18400-206. Si les échantillons qui ont été tamisés à l'état frais ne peuvent pas être analysés immédiatement, ils peuvent être conservés pendant une durée maximale de sept jours à une température de $4\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ avant la détermination de l'activité des déshydrogénases. Déterminer la teneur en matière sèche de l'échantillon conformément à l'ISO 11465.

ITeh STANDARD PREVIEW

6.2 Acide chlorhydrique (HCl), $c = 1\text{ mol/l}$.

6.3 Solution tampon Tris, $c = 100\text{ mmol/l}$, pH 7,6.

- Tris(hydroxyméthyl)aminométhane (n° CAS: 77-86-1 - 121,14 g/mol): 12,12 g;
- eau distillée, qsp pour 1 000 ml;
- acide chlorhydrique (n° CAS: 7647-01-0) (1 mol/l).

Dissoudre 12,12 g de tris(hydroxyméthyl)aminométhane dans 800 ml d'eau distillée et ajuster le pH à 7,6 avec la solution d'acide chlorhydrique (1 mol/l). Compléter à 1 000 ml. La durée de conservation ne peut pas dépasser un mois à une température de $4\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$.

6.4 Solution de substrat (CTT), $c = 300\text{ mmol/l}$ (10 %).

- Chlorure de 2,3,5-triphényltétrazolium -CTT (n° CAS: 298-96-4 - 334,80 g/mol): 1 g;
- tampon Tris 100 mmol/l, pH 7,6.

Dissoudre 1 g de chlorure de 2,3,5-triphényltétrazolium dans 10 ml de la solution tampon Tris (6.3). La solution peut être conservée à l'abri de la lumière pendant une semaine maximale, à une température de $4\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$.

6.5 Éthanol de qualité analytique (96 %).

6.6 Solutions de triphényl-formazan (TPF).

6.6.1 Solution mère de TPF (n° CAS: 531-52-2 - 300,36 g/mol), $c = 33\text{ mmol/l}$.

Dissoudre 100 mg de triphényl-formazan (TPF) dans de l'éthanol (6.5) pour préparer un volume de 10 ml.

6.6.2 Solution de travail de TPF, $c = 330$ nmol/ml.

Diluer 0,5 ml de solution mère de TPF (6.6.1) dans de l'éthanol (6.5) pour obtenir un volume final de 50 ml.

7 Appareillage

7.1 Spectrophotomètre pour mesures dans le visible.

7.2 pH-mètre.

7.3 Tubes à fond en U appropriés (35 à 50) ml, fioles jaugées, pipettes et microcuvettes.

Par exemple, de 2 cm de diamètre et d'une capacité minimale de 35 ml à 50 ml (prise d'essai de 5 g). Il n'y a pas de corrélation linéaire entre la masse du sol et la réduction du CTT si les mêmes tubes à essai sont utilisés. En revanche, si le diamètre du tube à essai est ajusté à la masse du sol, on obtient une corrélation linéaire entre la réduction du CTT et la masse de la prise d'essai. Le diamètre optimal du tube à essai est de 2 cm pour 5 g de sol.

7.4 Incubateur, réglable à $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$.

7.6 Agitateur pour tubes à essai réglé à $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$.

7.7 Centrifugeuse, avec contrôle de la température à $20\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ et une accélération de 2 000g.

(standards.iteh.ai)

8 Mode opératoire

8.1 Établissement de la courbe d'étalonnage

La courbe d'étalonnage exige plusieurs concentrations de triphényl-formazan (TPF), au moins en deux exemplaires et de préférence en trois exemplaires; tous les volumes sont indiqués par tube.

La solution de travail de TPF à la concentration de 330 nmol/ml est utilisée pour établir la courbe d'étalonnage. Répartir les volumes nécessaires dans des tubes pour préparer les concentrations suivantes: 0 nmol/ml; 11 nmol/ml; 22 nmol/ml; 55 nmol/ml; 110 nmol/ml, en trois exemplaires conformément au [Tableau 1](#).

Tableau 1 — Préparation de la courbe d'étalonnage du triphényl-formazan dans des tubes

| [TPF] nmol/ml | 0 | 11 | 22 | 55 | 110 |
|---------------|---|-----|-----|-----|-----|
| TPF (ml) | 0 | 0,1 | 0,2 | 0,5 | 1 |
| Éthanol (ml) | 3 | 2,9 | 2,8 | 2,5 | 2 |

Le CTT et le TPF étant sensibles à la lumière, il convient de placer les solutions à l'abri de la lumière tout au long de l'analyse.

8.2 Échantillonnage

Selon la Référence [1] les conditions optimales sont obtenues avec un ratio sol/solution de 1:1.

Peser 5,00 g de sol humide tamisé dans chacun de quatre tubes (7.3). Ajouter 4 ml de tris(hydroxyméthyl) aminométhane à 100 mmol/l, de pH 7,6, et 1 ml de solution de substrat (6.4) dans trois tubes à essai. La concentration finale du substrat est de 60 mmol/l (2 %). N'ajouter que 4 ml de tris(hydroxyméthyl) aminométhane à 100 mmol/l, de pH 7,6 (6.3), dans le tube témoin. Agiter tous les tubes manuellement pendant quelques secondes, les fermer hermétiquement avec un bouchon en plastique et les mettre à incuber à $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ pendant 6 h. Pour extraire le triphényl-formazan formé, ajouter 25 ml