
**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*
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e7965e03-1d5c/-4609-9e4f-4b03b6a225ae/iso-prf-ts-29843-2>

PROOF/ÉPREUVE



iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

[ISO/PRF TS 29843-2](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e7965e03-d5c7-4609-9e4f-4b03b6a225ae/iso-prf-ts-29843-2)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e7965e03-d5c7-4609-9e4f-4b03b6a225ae/iso-prf-ts-29843-2>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2021

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

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 termes abrégés (à l'exception des produits chimiques et des réactifs)	1
5 Principe	2
6 Matériaux d'essai	3
6.1 Sol.....	3
6.2 Réactifs.....	3
6.3 Appareillage.....	4
7 Modes opératoires	5
7.1 Extraction des lipides (extraction de Bligh-Dyer).....	5
7.2 Séparation des lipides par colonne SI.....	6
7.3 Dérivation — Transméthylation — Purification.....	6
7.4 Analyse PLFA.....	6
Bibliographie.....	8

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO/PRF TS 29843-2](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e7965e03-d5c7-4609-9e4f-4b03b6a225ae/iso-prf-ts-29843-2)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e7965e03-d5c7-4609-9e4f-4b03b6a225ae/iso-prf-ts-29843-2>

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 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. 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/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*, en collaboration avec le comité technique CEN/TC 444, *Caractérisation environnementale des matrices solides* du Comité européen de normalisation (CEN), conformément à l'Accord de coopération technique entre l'ISO et le CEN (Accord de Vienne).

Cette seconde édition annule et remplace la première édition (ISO/TS 29843-2:2011) qui a fait l'objet d'une révision technique.

Les principales modifications par rapport à l'édition précédente sont les suivantes:

- ajout d'une spécification pour l'analyse qualitative et quantitative des PLFA;
- utilisation des étalons BAME (qualitatif) ou FAME (quantitatif);
- utilisation d'un appareil de GC-MS;
- apport de précisions techniques en 7.2 et 7.3;
- indication de la possibilité d'utiliser des colonnes du commerce en complément ou en remplacement des colonnes préparées au laboratoire;
- mise à jour des références bibliographiques.

Une liste de toutes les parties de la série ISO/TS 29843 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

Les phospholipides sont des composants essentiels des membranes de toutes les cellules vivantes. Extraits d'échantillons de sol sous forme d'acides gras (acides gras phospholipidiques, PLFA) ou de chaînes latérales isopréniques à liaison éther (lipides éther phospholipidiques, PLEL), 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^[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 principaux domaines de la biosphère (bactéries, archées et microeucaryotes). Les PLFA et les PLEL peuvent également permettre une différenciation taxonomique sommaire à l'intérieur de communautés microbiennes complexes^{[2],[3]}. Chaque espèce microbienne contient plusieurs acides gras, avec une composition totale en PLFA soumise aux conditions environnementales^[4]. L'approche est mise en œuvre pour évaluer la biomasse et les changements dans la composition des communautés microbiennes^[5], en ce qui concerne la dominance des principaux groupes d'organismes^[6]. Par ailleurs, combinées avec l'utilisation des substrats marqués avec un isotope (¹³C ou ¹⁴C), les méthodes utilisant les lipides peuvent aussi être utilisées pour identifier la partie métaboliquement active de la communauté microbienne. Cette approche est bien établie dans le domaine de l'écologie des sols et sert d'outil phénotypique. Elle est donc complémentaire aux approches de génotypage 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 cyclopropyloxy cy17:0 et cy19:0 dans les bactéries Gram-négatives en réponse aux contraintes environnementales^[7].

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 le présent document traite de celle généralement appelée «méthode simple d'extraction des PLFA»^{[8],[9]}.

Le présent document 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^[6]). Le [Tableau 1](#) (adapté de la Référence [8]) 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
FA: acides gras EL-FA: acides gras à liaison ester NEL-FA: acides gras sans liaison ester		

Tableau 1 (suite)

Propriété	PLFA (simple)	PLFA (étendue)
Estimation du nombre d'acides gras dans les échantillons de sol	2 < 250	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
FA: acides gras EL-FA: acides gras à liaison ester NEL-FA: acides gras sans liaison ester		

La présente méthode est dérivée de la première méthode proposée par la Référence [10]. Cette méthode révisée a été largement utilisée^[11] et a également été examinée et comparée à la méthode étendue d'extraction des PLFA dans des articles évalués par des pairs [8],[9].

iTech STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO/PRF TS 29843-2](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e7965e03-d5c7-4609-9e4f-4b03b6a225ae/iso-prf-ts-29843-2)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e7965e03-d5c7-4609-9e4f-4b03b6a225ae/iso-prf-ts-29843-2>

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

Le présent document spécifie une méthode simple permettant d'extraire uniquement les acides gras phospholipidiques (PLFA) du sol.

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 structurels en laboratoire*

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e7965e03-d5c7-4609-9e4f-4b03b6a225ae/iso-prf-ts-29843-2>

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/>

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

BAME	ester(s) méthylique(s) d'acide bactérien
FA	acides gras
EL-FA	acides gras à liaison ester
NEL-FA	acides gras sans liaison ester
FAME	ester(s) méthylique(s) d'acide gras
PL-FAME	ester(s) méthylique(s) d'acide gras phospholipidiques

- 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
- CLHP chromatographie liquide à haute performance

5 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 (CG). Une vue d'ensemble schématique des modes opératoires est illustrée à la [Figure 1](#).

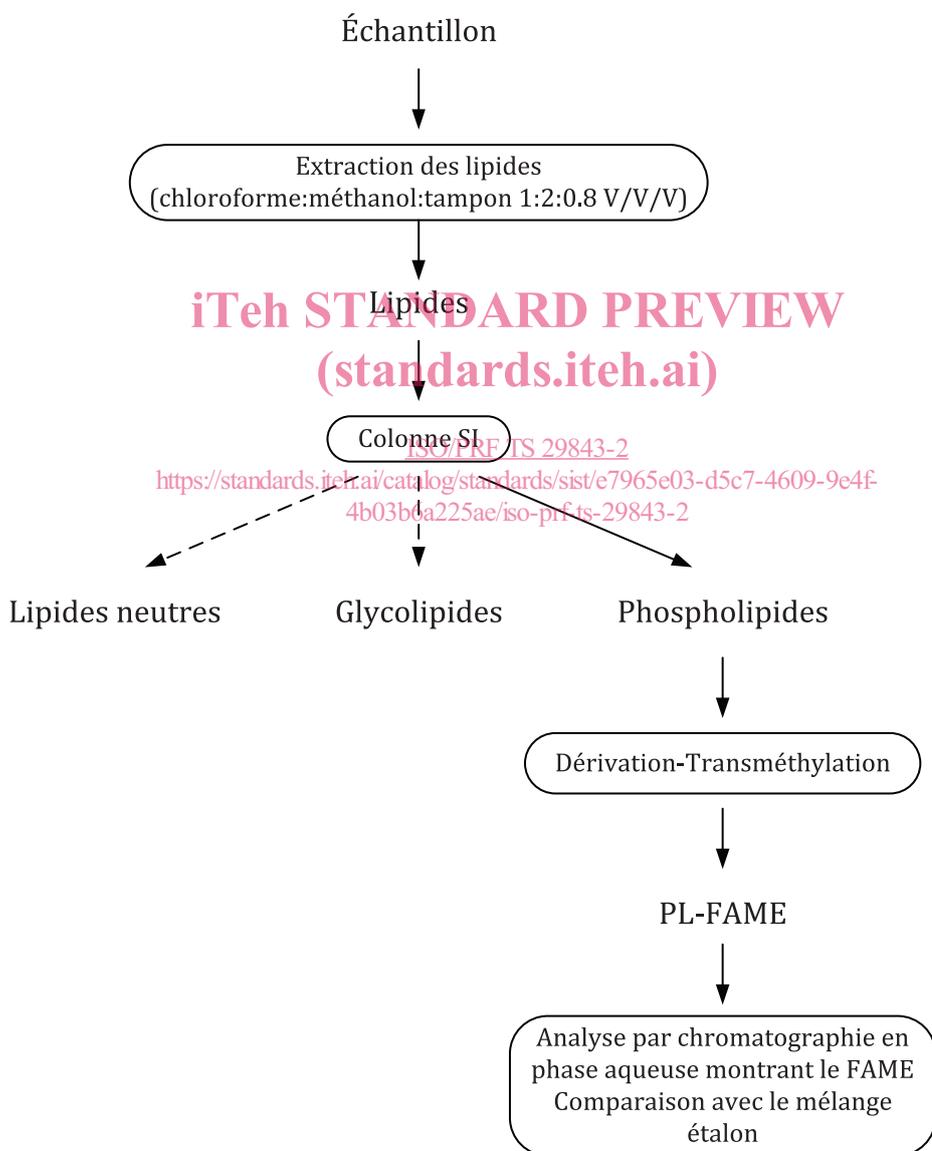


Figure 1 — — Vue d'ensemble schématique de l'analyse PLFA selon la «méthode simple d'extraction»

6 Matériaux d'essai

6.1 Sol

Prélever des échantillons de sol et les préparer conformément à l'ISO 18400-206. 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 l'extraction des lipides (voir 7.1).

6.2 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.

6.2.1 Solvants organiques.

6.2.1.1 Acétone, C_3H_6O (qualité CLHP).

6.2.1.2 Chloroforme, $CHCl_3$ (qualité CLHP).

6.2.1.3 Hexane, C_6H_{14} .

6.2.1.4 Méthanol, CH_3OH (qualité CLHP).

6.2.1.5 Toluène, C_7H_8 .

6.2.2 Produits chimiques.

6.2.2.1 2,6-Di-*tert*-butyl-4-méthylphénol (BHT), $C_{15}H_{24}O$.

6.2.2.2 Acide citrique, $C_6H_8O_7$, H_2O .

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

6.2.2.4 Hydrate d'acide silicique, SiO_2 , nH_2O , si des colonnes préparées au laboratoire sont utilisées.

6.2.2.5 Sulfate de sodium anhydre, Na_2O_4S .

6.2.2.6 Hydroxyde de potassium, KOH.

6.2.2.7 Acide acétique, $C_2H_4O_2$.

6.2.2.8 Hydroxyde de sodium, NaOH.

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

6.2.2.10 Azote gazeux, N_2 .

6.2.3 Tampons et étalons.

6.2.3.1 Solution chloroforme/méthanol (CM), 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 %).

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

- acide citrique monohydrate, 0,15 mol/l, 15,76 g de C₆H₈O₇, H₂O dans 500 ml d'eau;
- citrate trisodique, 0,15 mol/l, 22,06 g de C₆H₅Na₃O₇, 2H₂O 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.

6.2.3.3 Solvant Bligh et Dyer (BD), 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.

6.2.3.4 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.

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

6.2.3.6 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.

6.2.3.7 Hydroxyde de sodium, 0,3 mol/l, 12 g/l. Dissoudre 12 g d'hydroxyde de sodium dans 750 ml d'eau distillée et compléter à 1 l avec de l'eau distillée.

6.2.3.8 Étalon interne (C19:0 FAME), 10 mg d'ester méthylique d'acide nanodécanoïque dans 1 ml de solution mère d'hexane (dilution 1:100 avec de l'hexane).

6.2.3.9 Étalon externe (BAME), ester méthylique d'acide bactérien Mix Supelco™ #47080-U ou FAME (ex "37 component FAME Mix" Supelco™ # CRM47885¹⁾, dilué à 1/100 pour la concentration la plus élevée mesurée) pour réaliser la quantification.

6.3 Appareillage

Matériel courant de laboratoire et ce qui suit.

6.3.1 Tubes en polytétrafluoroéthylène ou **tubes en verre**, ayant un bouchon en polytétrafluoroéthylène ou un septum en polytétrafluoroéthylène, d'environ 20 ml.

6.3.2 Pipettes Pasteur.

6.3.3 Fioles, de 40 ml de capacité, avec couvercle muni d'un septum en polytétrafluoroéthylène.

6.3.4 Tubes en verre, de 20 ml de capacité.

1) L'ester méthylique d'acide bactérien Mix Supelco™ #47080-U et le "37 component FAME Mix" Supelco™ # CRM47885 sont des exemples de produits appropriés disponibles sur le marché. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs du présent document et ne signifie nullement que l'ISO approuve l'emploi des produits ainsi désignés.