Détermination de la déshydrogénase

Version 1.2 (2020)

Code	B-DHA		**Secteurs d'utilisation possibles**
Secteur d'utilisation	**Conseil de fumure**	Grandes cultures et herbage	
		Légumes (en pleine terre et sous serre)	
		Viticulture, Arboriculture, Culture de baies, Plantes aromatiques et médicinales	
	Caractérisation du site		x
	Appréciation des polluants		
	Engrais de recyclage	Compost	
		Digestat solide	
		Digestat liquide	
		Boue d'épuration	
	Engrais de ferme	Fumier	
		Lisier	
	Engrais minéraux		
	Charbon végétal		
	Recherche		
Bases légales / Mise en application de prescriptions légales			
Critères de reconnaissance pour les laboratoires			
Méthodes correspondantes	**Prélèvement de l'échantillon**		
	Préparation de l'échantillon		
	extraction		
	mesure		

Domaine de concentration / de mesure	
Résultat	quantité de µg de TTF libérée par matière sèche de terre par jour, précision 0,1 µg
Méthodes équivalentes	
Sécurité / environnement	

Agroscope une bonne alimentation, un environnement sain

Schweizerische Eidgenossenschaft
Confédération suisse
Confederazione Svizzera
Confederaziun svizra

Département fédéral de l'économie, de la formation et de la recherche DEFR
Agroscope

Détermination de la déshydrogénase

1. Principe

La terre est mélangée à une solution de chlorure de triphényltétrazolium (TTC) et incubée pendant 24 heures à 30 °C. Le TTC incolore est réduit par les déshydrogénases en triphényltétrazolium formazan (TTF) de couleur rouge. Le TTF libéré est extrait avec de l'acétone et mesuré par photométrie à 546 nm.

2. Exécution

Appareils et ustensiles

(A) Tubes à essai d=20 mm, hauteur = 200 mm, avec fermeture à vis
(B) Entonnoir en verre Ø environ 75 mm
(C) Récipients en verre pour l'extrait, par exemple tubes à essai
(D) Filtre plissé 602 1/2 Schleicher et Schuell Ø 150 mm
(E) Fioles graduées 0,1/0,5/ 1l
(F) Photomètre
(G) Cuvette d=1cm, verre optique spécial, Hellma
(H) Incubateur réglable à 30 ± 0,5 °C
(I) pH-mètre
(J) Vortex

Réactifs

(1) Tampon TRIS: tris(hydroxyméthyl)aminométhane pour analyse (solution tampon)
(2) TTC=2,3,5- Chlorure de triphényltétrazolium, qualité ≥ 99,9 % (AT)
(3) TTF=1,3,5- Triphényltétrazolium formazan
(4) Acétone p. A.
(5) Acide chlorhydrique (HCl) 12 M (32 %) p.A.
(6) Eau déminéralisée (H_2O, conductibilité < 5 µS/cm)

Mode opératoire

- Tampon Tris (solution I): diluer 12,11 g de TRIS (1) dans une fiole jaugée de 1 litre avec 600 ml d'eau démin. (6) et ajuster à un pH 7,8 avec de l'acide chlorhydrique (5) pour les sols acides (pH ($CaCl_2$) <6), à un pH 7,6 pour les sols neutres (pH ($CaCl_2$) 6-7), à un pH 7,4 pour les sols alcalins (pH ($CaCl_2$) > 7). Compléter jusqu'à 1000 ml avec de l'eau déminéralisée. (Peut être conservé au réfrigérateur).

- Tampon Tris avec TTC (solution II): ajouter 0,1 à 2 % de TTC (2) à la solution I (durée de conservation au réfrigérateur 1 semaine). La concentration optimale de TTC (activité déshydrogénase la plus élevée) doit être déterminée lors d'essais préliminaires pour chaque sol.

- Détermination de la concentration optimale de TTC: les échantillons doivent être mélangés avec les concentrations de substrat suivantes: 0,4, 0,8, 1,2, 1,6 et 2 % de TTC. Lorsque la concentration optimale présumée est atteinte, on peut encore procéder par étape de 0,1 % pour confirmer. La concentration optimale se situe au maximum de TTF formée.

- Calibrage:
  Acétone avec tampon tris (solution III): 833 ml d'acétone (4) et 167 ml de tampon tris (solution I, pH 7,6) sont mélangés.

Solution mère: ajouter 10 mg de TTF à 100 ml de solution III.
Solutions de calibrage: la solution mère est diluée avec la solution III, de manière à disposer de solutions de 1 à 60 µg TTF/ml pour le calibrage, par exemple de 10 ml chacune:

	-ml de solution mère D	-ml de solution C
-	-	-
-1	-0.1	-9.9
-2	-0.2	-9.8
-5	-0.5	-9.5
-10	-1	-9
-20	-2	-8
-30	-3	-7
-40	-4	-6
-50	-5	-5
-60	-6	-4

- Les étapes pendant lesquelles on utilise de la TTC ou des TTF doivent être effectuées en lumière atténuée, car ces substances sont sensibles à la lumière!

- Peser 5 g de terre (poids frais) dans des tubes à essai (A) et ajouter 5 ml de solution tampon contenant de la TTC (solution II). Sceller les tubes à essai (fermeture à vis); la terre et la solution tampon sont bien mélangées (2 fois 10 secondes au niveau le plus élevé de l'agitateur vortex). Trois préparations parallèles sont effectuées à partir de chaque échantillon de sol. Des échantillons à blancs avec 5 g de terre et de solution tampon sans TTC (solution I) sont préparés de la même manière.

- Les échantillons ainsi préparés sont placés pendant 24 heures dans un incubateur (H) à 30 °C

- Le TTF formé est ensuite extrait en ajoutant 25 ml d'acétone (4) dans les tubes à essai contenant la terre incubée (distributeur). Les échantillons sont secoués horizontalement à 200 tours/minute pendant 2 heures dans un agitateur. La solution de terre est ensuite filtrée à travers un filtre plissé (D) dans un autre tube à essai.

- Le photomètre mesure l'absorbance des extraits à 546 nm. Les échantillons dont l'absorbance est > 1 doivent être dilués à 1:1.

3. Calcul

Calcul de la quantité de TTF formée par rapport à la terre fine (MS) :
La valeur de l'échantillon à blanc (EB) est soustraite de la valeur de l'échantillon complet (EC). En utilisant la ligne de calibrage, la concentration de TTF est déterminée à partir de l'absorbance:

y= VP-BP (absorbance de l'échantillon complet moins échantillon à blanc)
µg TTF/ml à partir des courbes de calibrage: x= (y-b)/a
µg TTF/gMS/24 h= x * ml de solution d'échantillon /g MS d'échantillon pesé
ml de solution d'échantillon se compose de 25 ml d'acétone, de 5 ml de solution tampon TTC et de ml d'eau dans 5 g de terre

4. Résultat

Résultat: quantité de µg de TTF libérée par matière sèche de terre par jour, précision 0,1 µg

5. Remarques

- Secteur d'utilisation: pour les sols acides (pH $CaCl_2$ < 5,0), le pH de la solution de terre (terre dans la solution II) doit être vérifié. En cas de modification importante du pH, les valeurs d'activité obtenues sont étonnamment faibles et doivent être interprétées avec une grande prudence. La méthode n'est pas adaptée aux sols dont le pH est inférieur à 4.
- Entre différents lots de TTC (même provenant du même fournisseur), il peut y avoir des différences considérables dans les résultats de la détermination, même si les deux lots répondent aux critères de qualité des fabricants de produits chimiques. Dans l'analyse inter-laboratoires effectuée, les différences allaient jusqu'à 15%. On n'a pas pu déterminer la cause de cette situation. Comme le problème ne peut être résolu, les nouveaux lots devraient toujours être comparés aux précédents. Pour une comparaison absolue des résultats entre les laboratoires, il faudrait également échanger et comparer les TTC.
- Après correction des différences induites par les différentes TTC, la variation des résultats entre les laboratoires était en moyenne de 11%. Au sein des laboratoires, la variation des résultats entre les répétitions d'analyses était inférieure à 10 % pour 4 des 6 terres, pour les deux autres terres ayant une activité déshydrogénase > 800 µg TTF / g de terre * 24 h, elle était comprise entre 8 et 33 %. Un laboratoire qui a appliqué la méthode pour la première fois n'est pas pris en compte.
- La méthode est basée sur la méthode de Thalmann (1968).
- Sur 2 échantillons provenant d'une forêt de feuillus et d'une prairie permanente, aucune réduction de la TTC n'a pu être constatée après stérilisation de la terre.

6. Histoire

Version	Type du changement	nouveau	avant
Version 1.0 (1999)	Établissement méthode		
Version 1.1 (2000)	Révision méthode		
Version 1.2 (2020)	Éditorial éditorial	Publication électronique avec layout modifié Traduction française	

Impressum

Éditeur	Agroscope Reckenholzstrasse 191 8046 Zürich www.agroscope.ch/referenzmethoden
Renseignements	Diane Bürge
Copyright	© Agroscope 2020