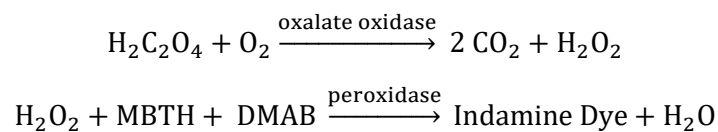


Analyse enzymatique par kits d'oxalate pour le sol.

Contexte

La concentration en oxalate des échantillons de plantes et de sol est déterminée à l'aide d'un kit enzymatique d'oxalate commercial (EOK ; Trinity Biotec Plc ou LIBIOS), en utilisant des techniques adaptées de Certini et al (2000) et Cailleau et al (2014) pour extraire d'abord l'oxalate. La teneur en H₂C₂O₄ peut être calculée à partir des proportions relatives du colorant indaminé (590 nm) par la réaction suivante :



Enzymatic oxalate kit chemical reaction.

Equipement de sécurité/ protection



Matériel

- Échantillons : sol tamisé à 2 mm / matière végétale broyée
- Kit d'oxalate enzymatique
- Acide chlorhydrique 37
- Hydroxyde de sodium
- Sel dihydraté de l'acide oxalique
- Agitateur rotatif
- Centrifugeuse
- Tubes de faucon 15 ml
- Spectrophotomètre UV-VIS + cuvette semi-micro

Préparation de solutions pour l'extraction des sols et des plantes.

- Préparation d'une solution de HCl 1M

Remplissez à moitié une fiole volumétrique de 500 ml à moitié remplie d'eau MilliQ. Ajouter ensuite 41,5 ml d'acide chlorhydrique à 37 % à l'eau. Compléter à 500 ml avec de l'eau MilliQ. Mettre un couvercle sur la fiole et bien agiter.

- Préparation d'une solution de HCl 2M

Remplissez à moitié une fiole jaugée de 100 ml avec de l'eau milliQ. Dissoudre 8,0 g de NaOH dans la fiole jaugée de 100 ml. Attendre de refroidir puis compléter à 100 ml avec de l'eau MiliQ. Mettre un couvercle sur la fiole et bien agiter.

Préparation des standards

Préparer un étalon d'acide oxalique à 500 mg/L à partir d'acide oxalique dihydraté ($C_2H_2O_4 \cdot 2 H_2O$) dans de la verrerie lavée à l'acide. N'oubliez pas de retirer la fraction molaire de l'eau lors du calcul de vos étalons. Diluez l'étalon pour obtenir une courbe d'étalonnage à 0, 10, 50, 100, 200 mg/L d'acide oxalique

Extraction du sol et de plantes

Effectuez un test initial avec de nombreux échantillons qui couvrent une gamme de vos concentrations attendues (à établir avant l'analyse avec un microscope optique et un microscope à fluide carnoy ou un microscope électronique à balayage) pour vous assurer que la concentration des échantillons est dans la gamme des normes. S'ils sont en dehors de la plage, ajustez la dilution du point 5 pour garantir des mesures correctes.

1. Pesez 0,1 g de plante ou 2,0 g de terre dans un tube de Falcon de 15 ml. Notez la valeur exacte dans votre carnet de laboratoire.
2. Ajoutez 5 ml de HCl 1 M
3. Placez les tubes fermés sur l'agitateur orbital à 150 tours/minute pendant 16 heures.
4. Centrifuger les tubes à 1080 g (3080 tours/minute) pendant 5 minutes.
5. Dans un nouveau tube de 15 ml, enlever 1 ml de surnageant (éviter les résidus organiques) et ajouter 4 ml d'eau déminéralisée.
6. Ajuster le pH à 5-7 avec $\pm 0,4$ mL de NaOH 2 M. Vérifiez le pH. Notez la valeur exacte dans votre carnet de laboratoire. Veillez à ajuster le pH de manière appropriée pour une large gamme d'échantillons. La présence de $CaCO_3$ dans vos échantillons peut signifier que certains échantillons nécessitent moins d'ajustement que d'autres. Une fois que vous avez une quantité correcte de NaOH 2 M pour la correction du pH d'une gamme de vos échantillons, vous pouvez appliquer cette correction à l'ensemble. Vous aurez besoin de ces chiffres de dilution pour recalculer la teneur exacte en oxalate de calcium ($CaOx$; CaC_2O_4) de vos échantillons.

Dosage de l'acide oxalit (suivez les instructions du kit)

Lors de la première utilisation des kits, vous devrez hydrater les différents réactifs. Une fois hydratés, les kits ont une durée de vie limitée dans le réfrigérateur. Retirez les réactifs avant de commencer l'analyse afin qu'ils se réchauffent à température ambiante. Veillez à utiliser une pipette calibrée pour toutes les étapes d'hydratation et les différentes mesures afin d'éviter des mesures erronées. Je vous suggère de calibrer vos pipettes pour les différentes mesures pendant le développement de la méthode et de les garder séparées / ne pas changer les mesures, afin de vous assurer que vous pouvez travailler rapidement et avec précision avec les kits..

7. Dans un tube de purification, mélanger 1 ml d'eau MiliQ (blanc)/échantillon/étalon avec 1 ml du diluant d'échantillon fourni dans le kit.
8. Agiter les tubes sur l'agitateur orbital pendant 5 minutes à 150 tours/minute.
9. Centrifuger à 1080 g (3080 tr/min) pendant 5 minutes.

10. Ajouter 500 µl de réactif 1 dans une cuvette semi-micro (trajet optique de 1 cm).
11. Ajouter 500 µl de réactif 2 dans la cuvette semi-micro.
12. Ajouter 100 µl de réactif 3 dans la cuvette semi-micro.
13. Ajouter ensuite 50 µl d'eau/échantillon/standard MiliQ (prélevé dans le tube de purification). Faites attention lorsque vous pipettez l'échantillon/le blanc/le standard à partir des tubes de purification pour vous assurer de ne pas faire réagir le charbon actif. Retirez l'air de la pipette avant de la placer dans la solution. Ensuite, prélevez soigneusement l'échantillon/le blanc/l'étalon entre le charbon en suspension et le charbon centrifugé. Mélangez le flacon avec l'embout de la pipette pour bien mélanger les réactifs et l'échantillon. Jetez l'embout entre les échantillons.
14. Remettez les tubes en place pendant environ 10 minutes pour permettre à la couleur de se développer. Nous vous suggérons de passer un étalon intermédiaire (50 mg/L) dans le spectrophotomètre et de prendre des mesures en continu, afin d'évaluer quand il est préférable de prendre des mesures et pendant combien de temps votre kit spécifique est stable.
15. Mesurez l'absorbance sur le spectrophotomètre à 590 nm.
16. N'oubliez pas de mesurer les répliques, les blancs et un étalon intermédiaire (50 mg/L) tout au long de votre parcours pour vérifier respectivement l'erreur, la contamination et la dérive de la machine.

Table de résumé

<i>Réactifs</i>	<i>Blanc</i>	<i>Standard</i>	<i>échantillon</i>
<i>Réactif 1</i>	<i>500 µL</i>	<i>500 µL</i>	<i>500 µL</i>
<i>Réactif 2</i>	<i>500 µL</i>	<i>500 µL</i>	<i>500 µL</i>
<i>Eau MiliQ</i>	<i>50 µL</i>	<i>--</i>	<i>--</i>
<i>Standard</i>	<i>--</i>	<i>50 µL</i>	<i>--</i>
<i>Echantillon</i>	<i>--</i>	<i>--</i>	<i>50 µL</i>
<i>Réactif 3</i>	<i>100 µL</i>	<i>100 µL</i>	<i>100 µL</i>

Résultats

Le résultat final doit être exprimé en mg/Kg de terre séchée au four ou en g/Kg de terre séchée au four à l'aide de l'équation ci-dessous. Prenez en considération toutes les dilutions et mettez en relation la concentration d'oxalate de calcium avec la masse de l'échantillon pesé initialement. N'oubliez pas de tenir compte de la modification de la dilution lors de la correction du pH et des différences d'humidité résiduelle entre vos échantillons.

$$\text{Quantité de calcium d'oxalate observée (mg kg}^{-1}\text{)} = \frac{(\text{Lecture du spectrophotomètre (mg L}^{-1}\text{)} \times \text{volume (mL)} \times \text{facteur de dilution})}{\text{poids de l'échantillon} \times \text{rapport de correction de l'humidité}}$$

Équation 1. Calcul de la teneur en oxalate de calcium de vos échantillons. Vous devrez corriger la concentration éventuelle en fonction de la masse molaire du CaC_2O_4 que vous avez précédemment observée dans vos échantillons (whewellite ou weddellite)

Référence

Rowley, M.C., Estrada-Medina, H., Tzec-Gamboa, M. *et al.* Moving carbon between spheres, the potential oxalate-carbonate pathway of *Brosimum alicastrum* Sw.; Moraceae. *Plant Soil* 412, 465–479 (2017).