
**Qualité du sol — Prélèvement des
invertébrés du sol —**

Partie 3:
**Prélèvement et extraction des
enchytréides**

iTeh STANDARD PREVIEW
*Soil quality — Sampling of soil invertebrates —
Part 3: Sampling and soil extraction of enchytraeids*
(standards.iteh.ai)

ISO 23611-3:2007

[https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/fb70ed69-0bd0-4c4b-9864-
db4159ed9a0f/iso-23611-3-2007](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/fb70ed69-0bd0-4c4b-9864-db4159ed9a0f/iso-23611-3-2007)



PDF – Exonération de responsabilité

Le présent fichier PDF peut contenir des polices de caractères intégrées. Conformément aux conditions de licence d'Adobe, ce fichier peut être imprimé ou visualisé, mais ne doit pas être modifié à moins que l'ordinateur employé à cet effet ne bénéficie d'une licence autorisant l'utilisation de ces polices et que celles-ci y soient installées. Lors du téléchargement de ce fichier, les parties concernées acceptent de fait la responsabilité de ne pas enfreindre les conditions de licence d'Adobe. Le Secrétariat central de l'ISO décline toute responsabilité en la matière.

Adobe est une marque déposée d'Adobe Systems Incorporated.

Les détails relatifs aux produits logiciels utilisés pour la création du présent fichier PDF sont disponibles dans la rubrique General Info du fichier; les paramètres de création PDF ont été optimisés pour l'impression. Toutes les mesures ont été prises pour garantir l'exploitation de ce fichier par les comités membres de l'ISO. Dans le cas peu probable où surviendrait un problème d'utilisation, veuillez en informer le Secrétariat central à l'adresse donnée ci-dessous.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 23611-3:2007](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/fb70ed69-0bd0-4c4b-9864-db4159ed9a0f/iso-23611-3-2007)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/fb70ed69-0bd0-4c4b-9864-db4159ed9a0f/iso-23611-3-2007>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2007

Droits de reproduction réservés. Sauf prescription différente, 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 et les microfilms, sans l'accord écrit de l'ISO à l'adresse ci-après ou du comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office
Case postale 56 • CH-1211 Geneva 20
Tel. + 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 Termes et définitions	1
3 Principe	2
4 Réactifs	2
5 Appareillage	2
6 Mode opératoire	3
6.1 Échantillonnage du sol	3
6.2 Extraction des enchytréides	3
6.3 Identification au microscope	4
6.4 Conservation des <i>Enchytraeidae</i>	5
6.5 Validité du procédé d'extraction	5
6.6 Détermination de la biomasse	5
7 Évaluation des données	5
8 Rapport d'essai	6
Annexe A (informative) Identification des espèces chez les enchytréides	7
Annexe B (informative) Extraction rapide des enchytréides	8
Bibliographie	10

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 (CEI) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les Normes internationales sont rédigées conformément aux règles données dans les Directives ISO/CEI, Partie 2.

La tâche principale des comités techniques est d'élaborer les Normes internationales. Les projets de Normes internationales adoptés par les comités techniques sont soumis aux comités membres pour vote. Leur publication comme Normes internationales requiert l'approbation de 75 % au moins des comités membres votants.

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.

L'ISO 23611-3 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 190, *Qualité du sol*, sous-comité SC 4, *Méthodes biologiques*.

L'ISO 23611 comprend les parties suivantes, présentées sous le titre général *Qualité du sol — Prélèvement des invertébrés du sol*:

- *Partie 1: Tri manuel et extraction au formol des vers de terre*
- *Partie 2: Prélèvement et extraction des micro-arthropodes (Collembola et Acarina)*
- *Partie 3: Prélèvement et extraction des enchytréides*
- *Partie 4: Collection, extraction et identification des nématodes du sol*

Introduction

La présente partie de l'ISO 23611 a été rédigée pour répondre à un besoin grandissant en matière de normalisation des méthodes d'analyse sur le terrain de la zoologie. De telles méthodes, traitant principalement du prélèvement, de l'extraction et de la manipulation des invertébrés du sol, sont nécessaires pour les différentes applications suivantes:

- la classification biologique des sols, y compris l'évaluation de la qualité des sols (par exemple Références [21], [25], [27]);
- la bio-indication terrestre et la surveillance à long terme (par exemple Références [13], [26]);
- l'évaluation des effets des substances chimiques vis-à-vis des animaux du sol (Références [15], [22]).

Étant donné qu'elles peuvent être à la base de décisions importantes (par exemple, entreprendre ou non la dépollution d'un site particulier), les données pour ces applications devront être obtenues à l'aide de méthodes normalisées. En fait, l'absence de telles méthodes normalisées est l'une des principales raisons pour lesquelles les concepts de classification biologique ont été relativement rarement utilisés, jusqu'à présent, dans des habitats terrestres (comme le sol) par rapport aux sites aquatiques.

À l'origine, les méthodes décrites ici ont été développées pour des études taxonomiques ou écologiques, visant à élucider le rôle des enchytréides dans différents écosystèmes terrestres. Ces animaux font indubitablement partie des invertébrés du sol les plus importants dans les régions tempérées (principalement dans les sols acides^[5]). Leur influence sur les fonctions du sol, comme la décomposition de la litière et le cycle des éléments nutritifs, est bien connue^{[14], [19]}. En raison de leur nombre qui est souvent très élevé (et de la biomasse de leur population) ils jouent également un rôle majeur dans un grand nombre de réseaux trophiques terrestres^[4]. Certaines espèces ont été involontairement disséminées par l'homme dans les sols du monde entier.

Étant donné qu'il n'est ni possible, ni utile de normaliser des méthodes pour tous les organismes du sol, seuls les plus importants ont été sélectionnés [Les paramètres microbiologiques ont déjà été traités dans des guides ISO existants (par exemple, l'ISO 10381-6^[29], l'ISO 14240-1^[37] et l'ISO 14240-2^[38])].

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 23611-3:2007

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/fb70ed69-0bd0-4c4b-9864-db4159ed9a0f/iso-23611-3-2007>

Qualité du sol — Prélèvement des invertébrés du sol —

Partie 3:

Prélèvement et extraction des enchytréides

1 Domaine d'application

La présente partie de l'ISO 23611 spécifie une méthode pour le prélèvement, la manipulation et l'extraction des enchytréides du sol prélevés sur le terrain comme pré-requis à l'utilisation de ces animaux en tant que bio-indicateurs (par exemple, pour évaluer la qualité d'un sol en tant qu'habitat pour ces organismes).

Il est possible de trouver des informations de base sur l'écologie des enchytréides et leur utilisation en tant que bio-indicateurs dans l'environnement terrestre dans la bibliographie.

La présente partie de l'ISO 23611 s'applique à tous les biotopes terrestres dans lesquels il est possible de trouver des enchytréides. La stratégie d'échantillonnage générique pour les études de terrain est spécifiée dans l'ISO 10381-1. Ces détails peuvent varier en fonction des conditions climatiques/régionales du site sur lequel l'échantillon doit être prélevé et un aperçu de la détermination des effets des polluants sur les enchytréides in situ est fourni à la Référence [6].

Les méthodes pour quelques autres groupes d'organismes du sol comme les vers de terre ou les microarthropodes sont spécifiées dans l'ISO 23611-1 et l'ISO 23611-2.

La présente partie de l'ISO 23611 n'est pas applicable à des sols semi-terrestres (habitat aquatique ou à proximité) et peut être d'utilisation difficile dans des conditions climatiques ou géographiques extrêmes (en haute montagne, par exemple).

Il est vivement recommandable de caractériser le site en cas d'échantillonnage des invertébrés du sol (par exemple du point de vue du climat et de l'usage du sol). Cependant, cette caractérisation n'est pas traitée dans la présente partie de l'ISO 23611. L'ISO 10390, l'ISO 10694, l'ISO 11272, l'ISO 11274, l'ISO 11277, l'ISO 11461 et l'ISO 11465 sont plus appropriés pour le mesurage du pH, de la distribution granulométrique, du rapport C/N, de la teneur en carbone organique et de la capacité de rétention d'eau.

2 Termes et définitions

Pour les besoins du présent document, les termes et définitions suivants s'appliquent.

3.1

enchytréides

petits vers vivant dans le sol (de quelques millimètres à plusieurs centimètres de longueur) appartenant à la famille des *Enchytraeidae*, ordre des *Oligochaeta* (classe *Clitellata*, phylum *Annelida*)

EXEMPLE Les espèces des genres *Enchytraeus*, *Fridericia* ou *Cognettia*.

3 Principe

Sur un site donné, les enchytréides sont prélevés dans le sol au moyen d'un carottier stratifié (de diamètre généralement compris entre 3 cm et 6 cm). Après le prélèvement, les échantillons de sol contenant les enchytréides sont transportés au laboratoire. Ensuite, les enchytréides sont extraits du sol par une méthode d'extraction humide. Ce protocole est connu de longue date^[11], [17], [20]. Après l'extraction les enchytréides sont identifiés vivants et, si nécessaire, conservés de manière à pouvoir être stockés indéfiniment dans une collection (par exemple, à des fins taxonomiques).

La détermination de la biomasse des enchytréides est également décrite dans la présente partie de l'ISO 23611. Les valeurs d'abondance et de biomasse sont recalculées et rapportées à la surface du carottier ou, plus rarement, à des paramètres liés au volume.

NOTE 1 Le prélèvement d'enchytréides est souvent inclus dans des programmes de surveillance plus vastes visant à couvrir la totalité ou une partie de la faune du sol (par exemple, la mésofaune). La conception de tels programmes n'est pas comprise dans la présente partie de l'ISO 23611 (mais voir, par exemple, la Référence [3]).

NOTE 2 Quelques indications sur la taxinomie des enchytréides sont fournies dans l'Annexe A.

4 Réactifs

4.1 **Eau du robinet** (dépourvue de propriétés toxiques, par exemple, en raison d'une contamination par le cuivre).

4.2 **Éthanol**, à 70 % (fraction volumique).

4.3 **Rose de Bengale**, 4,5,6,7-tétrachloro-2',4',5',7'-tétraiodofluorescéine formulée comme un colorant.

4.4 **Fixateur de Bouin**, solution tamponnée de formaldéhyde, d'acide acétique et d'acide picrique.

4.5 **Paracarmin**, colorant préparé sous forme de mélange d'acide carminique, de chlorure d'aluminium et de chlorure de calcium dissous dans l'éthanol.

4.6 **Baume du Canada**, fluide naturel visqueux et jaunâtre contenant de 13 % à 14 % (fraction volumique) de Canadine acide (C₂₀H₃₈O₂), de 48 % à 50 % (fraction volumique) de α - et β -Canadinol acide (C₁₉H₃₀O₂) et 5 % (fraction volumique) de Canadœsen (C₂₁H₄₀O).

5 Appareillage

5.1 **Carottier stratifié pour prélèvement de sol** (ayant un diamètre compris entre 3 cm et 6 cm, par exemple; longueur de carotte extraite: de 10 cm à 30 cm); de longueur totale variable (selon qu'il est muni d'une poignée ou non).

5.2 **Sachets en plastique** (par exemple, sachets pour congélation de 1 l); du commerce.

5.3 **Enregistreur de température ou thermomètre minimum/maximum.**

5.4 **Bols en plastique**, diamètre: 20 cm environ, hauteur: 10 cm environ; du commerce.

5.5 **Tamis en plastique**, diamètre: 15 cm environ, ouverture de mailles: 0,5 mm approximativement; du commerce.

5.6 **Ampoules de 60 W**, en tant qu'élément chauffant; du commerce.

5.7 **Verrerie**, boîtes de Petri, par exemple (de format carré) de 8 cm × 8 cm ou petits récipients en verre (de 50 ml, par exemple).

- 5.8 Couteau, affûté et de grande taille.
- 5.9 Réfrigérateur.
- 5.10 Microscope à dissection, à faible grossissement (de 10 à 40 fois).
- 5.11 Microscope, à grossissement élevé (de 60 à 400 fois).
- 5.12 Pinces à ressort en acier (plates).
- 5.13 Pipette Eppendorf, pince en acier doux ou aiguille à crochet.

6 Mode opératoire

6.1 Échantillonnage du sol

Les échantillons de sol à utiliser pour étudier la communauté des enchytréides sont prélevés de manière destructive au moyen d'un carottier pour sol (5.1). On presse le carottier avec soin contre le sol pour l'y faire pénétrer. La profondeur de pénétration est fonction du type de sol mais, en règle générale, elle est comprise entre 10 cm (par exemple, en forêt) et 30 cm (dans les zones cultivées, par exemple), ce qui correspond aux couches dans lesquelles vit la majorité des enchytréides. Dans de rares cas, par exemple si le sol comporte de grosses racines, il est possible d'utiliser un marteau en plastique ou en bois pour prélever les échantillons. Après le retrait du carottier hors du sol, celui-ci est ouvert et l'on recueille à la main la carotte de sol avec précaution. Ensuite, à l'aide d'un couteau (5.8), on divise la carotte en deux cylindres (par exemple, de 3 cm à 4 cm de hauteur). Ces deux cylindres de sol peuvent être conservés au réfrigérateur (5.9) dans de petits sachets en plastique (5.2), à une température comprise entre 4 °C et 6 °C approximativement, pendant une période ne dépassant pas une à deux semaines, de préférence (dans tous les cas, il convient que la durée de stockage n'excède pas un mois^[7]). Pour finir, le carottier est lavé à l'eau.

6.2 Extraction des enchytréides

En principe, l'extraction des vers hors du sol est engendrée par les mouvements actifs de ceux-ci dans l'échantillon saturé en eau.

Il convient de commencer l'extraction dès que possible après l'échantillonnage (voir 6.1). Les bols (5.4) sont remplis d'eau du robinet (4.1) avec précaution jusqu'à ce que les tamis vides (5.5) soient complètement recouverts d'eau. Les échantillons (c'est-à-dire les cylindres de sol) sont déposés dans les tamis et sont, si nécessaire (par exemple, dans le cas de sols argileux) cassés à la main avec soin (voir Figure 1). Il convient que le fond des tamis n'atteigne pas le fond des bols. Pour garantir une efficacité d'extraction des *Enchytraeidae* hors des échantillons de plus de 90 %, il convient que l'extraction du sol se prolonge pendant une durée de 4 d à 7 d et que l'extraction de la litière dure pendant 0,5 d à 2 d, à (12 ± 2) °C (température de l'eau). La durée dépend principalement de la teneur de l'échantillon en matière organique. Ces durées peuvent être modifiées en fonction d'exigences liées à l'organisation et du nombre d'individus contenus dans un échantillon. Toutefois, les vers meurent vite en cas de manque d'oxygène (pour éviter cela, il est possible de changer l'eau au bout de 24 h ou de 48 h). Une accélération de l'extraction au moyen d'une source de chaleur [une ampoule de 60 W (5.6), par exemple] placée au-dessus de l'échantillon peut se révéler utile mais il convient d'en faire usage avec précaution (prévoir une augmentation lente sur au moins 3 h), sinon — selon l'espèce — de nombreux animaux, surtout les jeunes et les stades de fragmentation, restent dans le sol (voir Annexe B).

NOTE 1 Pour réduire la quantité de débris au fond des bols d'extraction, il est possible de recouvrir les mailles du tamis avec un tissu fin (0,5 mm) avant d'y déposer l'échantillon de sol^[23].

À la fin de l'extraction, les tamis sont enlevés, le sol est jeté et mis au rebut en suivant la réglementation locale relative aux déchets. Avec soin, on verse l'eau lentement hors du bol en veillant à ne pas perturber la fraction la plus fine du sol au fond du bol (voir Figure 2). Une petite quantité d'eau (jusqu'à une hauteur de 5 mm à 10 mm) doit rester dans les bols. Ensuite, la fraction la plus fine du sol est mise en suspension dans l'eau et l'ensemble est déposé dans une boîte de Petri (5.7), puis stocké pendant une courte durée

jusqu'à ce que les particules de sol se décantent et que l'eau devienne limpide. Étant donné que les vers blanchâtres sont plus lourds que l'eau mais qu'ils sont rarement capables de se dissimuler dans la mince couche de sol, il est facile de les prélever hors de la boîte de Petri sous un microscope à dissection (5.10). Pour effectuer ce transfert, il est possible d'utiliser une pince en acier doux, une pipette Eppendorf ou une aiguille à crochet (5.13), mais il faut, dans tous les cas, éviter d'endommager les vers. Pour compter le nombre total de vers, le plus simple consiste à diviser la surface de la boîte de Petri en rangées parallèles et de les vérifier les unes après les autres. Comme les vers sont blancs, il est facile de les distinguer sur le fond habituellement brunâtre des particules de sol. Les animaux sont transférés dans de petits récipients en plastique ou en verre (de 20 ml, par exemple).

Le nombre d'échantillons pouvant être extraits simultanément est théoriquement illimité, cependant, il se peut que la taille des bols d'eau induise des limites d'espace. Étant donné qu'ils doivent être refroidis (en tous cas au moins l'eau), il n'est, en général, possible de traiter simultanément que 40 à 50 échantillons au plus. Ces limites peuvent être surmontées en réalisant l'opération dans un local frais, comme une cave par exemple.

NOTE 2 Dans de rares cas, on peut confondre les enchytréides avec des larves diptères (qui possèdent souvent des capsules céphaliques brunâtres ou noires) ou avec des nématodes (en général plus petits et plus rapides que les oligochètes). De plus, les hyphes des champignons ou les filaments radiculaires peuvent être pris pour des enchytréides car ils peuvent être de longueurs et de couleurs identiques. Toutefois à l'inverse des vers oligochètes, ils sont toujours dépourvus de segmentation.



Figure 1 — Bol d'extraction avec échantillon de sol



Figure 2 — Couche de sédiments (comprenant des enchytréides)

6.3 Identification au microscope

Il convient d'effectuer l'identification au microscope le plus tôt possible car les animaux meurent dans l'eau au bout de quelques jours, même s'ils sont conservés au réfrigérateur (5.9). On peut utiliser avec précaution une pince en acier doux, une pipette Eppendorf ou une aiguille à crochet (5.13) pour transférer les animaux dans une goutte d'eau sur une lame. Si les vers se déplacent trop vite sur la lame, on peut les anesthésier avec du CO₂ (par exemple, en utilisant une goutte d'eau minérale gazeuse, mais il convient d'en faire usage avec précaution, sinon le ver meurt).

NOTE Comme il est difficile d'identifier les enchytréides, dans de nombreux cas, on détermine seulement le nombre d'animaux. Autrement la clé d'identification trouvée dans la Référence [16] est utilisée ainsi que les publications ultérieures (compilation dans les Références [8], [12], [24], et, en particulier, dans la Référence [23]). Un compromis consiste à utiliser une clé spécifique du site puisqu'en général, un site donné ne comporte qu'entre 3 à 25 espèces (dans ce cas, les vers fixés dans l'éthanol peuvent souvent être identifiés jusqu'au niveau de l'espèce). Un aperçu des informations (paramètres, dessins etc.) nécessaires pour identifier une espèce particulière est donné dans la Référence [9].

6.4 Conservation des *Enchytraeidae*

Les *Enchytraeidae* peuvent être conservés dans de l'éthanol (4.2) à 70 % (fraction volumique) en vue d'études futures (description d'espèces, par exemple). Cependant, la conservation s'accompagne d'une perte de détails morphologiques visibles. Les animaux difficiles à identifier ou ceux sélectionnés comme spécimen de référence peuvent également être identifiés après avoir été fixés dans du liquide de Bouin (4.4) ou colorés par du Paracarmin (4.5) et conservés dans du baume du Canada (4.6) (ce qui peut être relativement compliqué). Pour l'identification de l'espèce d'un spécimen fixé, il est vivement recommandé d'utiliser un microscope interférentiel (5.11).

6.5 Validité du procédé d'extraction

L'efficacité d'extraction peut être vérifiée en fixant avec de l'éthanol (à 96 %) des échantillons de sol prélevés parallèlement à d'autres échantillons sur le terrain. On étale le sol en une mince couche au fond du récipient plat en plastique (tel que Bellaplast¹⁾: 16 cm × 11 cm), puis l'on ajoute de l'éthanol, à la suite de quoi on verse quelques gouttes de rose de Bengale (4.3) dans l'éthanol. Au bout d'une journée, les vers devenus rouges brillants sont faciles à dénombrer. Cependant, ce mode opératoire n'est nécessaire que lorsque l'on utilise pour la première fois des échantillons provenant d'un site inconnu. En outre, cette vérification doit être effectuée à l'aide de six à huit répétitions car la variabilité des quantités d'enchytréides peut être relativement élevée.

6.6 Détermination de la biomasse

Pour estimer le rôle écologique (par exemple, dans le réseau trophique du sol) des enchytréides en un site donné, il est nécessaire de déterminer leur biomasse. Puisqu'une pesée directe est difficile en raison de la faible masse des individus de la plupart des espèces, de l'erreur potentielle due à la modification du contenu du tube digestif et surtout à la dessiccation rapide, la biomasse peut aussi être déterminée indirectement par les méthodes suivantes:

- établissement de courbes d'étalonnage spécifiques en fonction du rapport de longueur/poids^{[1], [2]}; puis mesurage de la longueur des animaux d'un échantillon;
- calcul automatique du poids par mesurage assisté par ordinateur du rapport longueur/poids d'individus montés entre lame et lamelle, suivi du calcul utilisant la densité généralement constante des enchytréides^[18].

7 Évaluation des données

Il est possible d'utiliser les critères d'effet suivants pour la bioclassification d'un sol, y compris pour la bio-indication ou la bio-surveillance (par exemple, impacts anthropogènes que tels que l'usage de produits chimiques ou le changement d'usage des sols):

- abondance (nombre d'individus par unité de surface ou de volume);
- biomasse (masse, frais ou sec, de la population par unité de surface ou de volume);
- nombre d'espèces ou de groupes définis d'un point de vue taxonomique ou écologique;
- rapport de dominance (en pourcentage de la population);
- structure de la population par âge (par exemple, rapport adultes/jeunes, soit toutes espèces confondues, soit par espèce);

1) Le Bellaplast est un exemple de produit approprié disponible dans le commerce. Cette information est donnée à l'attention des utilisateurs de la présente Norme Internationale et ne saurait constituer un engagement de l'ISO vis-à-vis de ce produit.