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

**Partie 4:
Prélèvement, extraction et identification
des nématodes du sol**

iTeh STANDARD PREVIEW
*Soil quality — Sampling of soil invertebrates —
Part 4: Sampling, extraction and identification of soil-inhabiting
nematodes*
(standards.iteh.ai)

ISO 23611-4:2007

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/1c46fd96-744e-4844-89fb-c0c0fbf2fd15/iso-23611-4-2007>



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 23611-4:2007](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/1c46fd96-744e-4844-89fb-c0c0fbf2fd15/iso-23611-4-2007)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/1c46fd96-744e-4844-89fb-c0c0fbf2fd15/iso-23611-4-2007>



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	3
5 Appareillage	4
5.1 Échantillonnage	4
5.2 Extraction	4
5.3 Comptage	4
5.4 Fixation et préparation de lames d'ensemble	5
5.5 Identification	5
6 Mode opératoire	5
6.1 Généralités	5
6.2 Échantillonnage	5
6.3 Extraction	7
6.4 Comptage	8
6.5 Fixation et préparation de lames d'ensemble	8
6.6 Identification	9
7 Analyse des données	9
8 Rapport d'étude	10
Annexe A (informative) Figures du matériau et des méthodes pour la recherche nématologique	11
Annexe B (informative) Informations relatives à la disponibilité de l'éluutriateur Oostenbrink	14
Annexe C (informative) Informations relatives à la méthode d'extraction avec l'entonnoir/plateau de Baermann	16
Bibliographie	18

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 23611-4 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: Prélèvement, extraction et identification des nématodes du sol*

Introduction

La présente partie de l'ISO 23611 a été établie en raison du besoin croissant de normalisation des méthodes de prélèvement et d'analyse des organismes du sol. Ces méthodes couvrent principalement l'échantillonnage, l'extraction et la manipulation d'invertébrés dans le sol et sont nécessaires pour les applications suivantes:

- la classification biologique des sols comprenant l'évaluation de qualité des sols [15], [17], [28];
- la bio-indication et la surveillance terrestre à long terme [9], [10], [13], [24];
- l'évaluation des effets des substances chimiques sur les animaux du sol (ISO 11268-3).

Les données utilisables pour la réalisation de ces objectifs sont obtenues par des méthodes normalisées étant donné qu'elles peuvent être à la base de décisions à grande portée (par exemple la décision de décontamination d'un site). En fait, l'absence de telles méthodes normalisées est l'une des principales raisons pour lesquelles la classification biologique et l'évaluation biologique dans les habitats terrestres (c'est-à-dire les sols) ont rarement été utilisées à ce jour comparés aux sites aquatiques.

Les nématodes constituent une partie importante de la faune du sol. Certains auteurs estiment que ce groupe est probablement le plus important parmi les organismes pluricellulaires (métazoaires) sur terre. Les nématodes sont présents de l'Antarctique aux tropiques et des sédiments en eau profonde aux régions montagneuses. Ils sont actifs en tout lieu présentant suffisamment d'eau et de matières organiques. Leur diversité spécifique et fonctionnelle est impressionnante. Les nématodes sont généralement connus en tant que parasites des animaux et des plantes, mais la majeure partie de la nématofaune participe aux processus de décomposition du fait du régime trophique de certains d'entre eux: bactérivores ou fongivores.

Les nématodes sont présents en grand nombre [(5 000 à 100 000)/kg de sol frais] et avec une diversité spécifique élevée (20 à 100) dans pratiquement chaque échantillon de sol. De plus, ils présentent un spectre écologique large de régimes trophiques et de places dans la chaîne alimentaire; il existe des nématodes bactérivores, fongivores, phytophages, prédateurs et omnivores [27], [28]. Ces facteurs rendent ce groupe particulièrement adapté en tant qu'indicateur de la qualité écologique du sol, mais la normalisation des méthodes est urgemment nécessaire pour la comparaison et l'analyse conjointe des résultats.

Au cours des 100 dernières années, la nématologie s'est fortement développée dans les domaines de l'agriculture, l'échantillonnage en vue de produire des recommandations et les réglementations phytosanitaires parce que certains nématodes phytoparasites causent des dégâts importants sur les cultures. En ce qui concerne les méthodes, il existe plusieurs «écoles» dans différentes parties du monde avec leurs propres histoires, avantages pratiques et inconvénients. Une vue d'ensemble est présentée par Oostenbrink [14] et Southey [22], [23]. Les méthodes (ou variantes) décrites plus récemment ont souvent été développées avec un intérêt particulier pour certaines espèces de nématodes phytoparasites.

Depuis que Bongers [4] a introduit l'indice de maturité, l'utilisation des nématodes dans la bio-indication pour la qualité des sols s'est rapidement développée. Les nématodes sont désormais utilisés pour l'étude et la surveillance écologique des sols dans plusieurs pays dans le monde entier. Les activités de surveillance présentent certaines exigences méthodologiques. Par exemple, un grand nombre d'échantillons de sol sont traités en routine pour un coût raisonnable. Certaines des méthodes initialement développées pour pouvoir formuler des recommandations en agriculture sont particulièrement adaptées pour la recherche écologique. Elles constituent la base de variantes spécifiques décrites dans ce document.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 23611-4:2007

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/1c46fd96-744e-4844-89fb-c0c0fbf2fd5/iso-23611-4-2007>

Qualité du sol — Prélèvement des invertébrés du sol —

Partie 4:

Prélèvement, extraction et identification des nématodes du sol

1 Domaine d'application

La présente partie de l'ISO 23611 spécifie une méthode pour échantillonner et manipuler les nématodes du sol en tant que condition préalable pour les utiliser comme bio-indicateurs (par exemple pour évaluer la qualité d'un sol en tant qu'habitat pour des organismes).

La présente partie de l'ISO 23611 s'applique à tous les biotopes terrestres dans lesquels des nématodes sont présents. La procédure d'échantillonnage pour les études de terrain est spécifiée de façon générale dans l'ISO 10381-1.

La présente partie de l'ISO 23611 n'est pas applicable pour les nématodes aquatiques parce que ceux-ci ne traversent pas le filtre. Des méthodes pour certains autres groupes d'organismes tels que les vers de terre, les enchytraeidae ou les collemboles sont couverts dans d'autres parties de l'ISO 23611.

Les nématodes qui sont caractérisés avec le mode opératoire proposé sont toutes les formes libres de nématodes trouvées dans le sol. Ils comprennent les nématodes non phytophages ainsi que les nématodes phytophages ectoparasitaires et les stades libres des nématodes phytophages endoparasitaires. La quantification des nématodes strictement phytophages dans les racines requièrent des méthodes spécifiques.

NOTE Des informations de base sur l'écologie des nématodes et leur utilisation en tant que bio-indicateurs peuvent être trouvées dans la bibliographie.

La présente partie de l'ISO 23611 ne couvre pas la caractérisation pédologique du site qui est particulièrement recommandée lors du prélèvement d'invertébrés du sol. 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 mesurer le pH, la granulométrie, le rapport C/N, la teneur en carbone organique et la capacité de rétention en eau.

2 Termes et définitions

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

2.1

nématode

petit ver libre non segmenté (jusqu'à quelques millimètres de longueur) appartenant à la classe des nématodes

NOTE Les nématodes dont aucun stade n'habite dans le sol ne sont pas inclus dans ce cadre.

2.2

situation

zone ou point d'étude que l'on veut caractériser sur la base de la composition de la nématofaune (entre autres)

2.3
échantillon composite
échantillon de sol constitué de nombreuses petites carottes de sol pour avoir un échantillon représentatif de la nématofaune

2.4
outil de prélèvement de sol
gouge
tarière
outil utilisé pour collecter le sol d'une manière rapide et normalisée

2.5
éluutriateur Oostenbrink ¹⁾
entonnoir en métal avec un flux d'eau de bas en haut permettant de séparer les nématodes des plus grosses particules de sol

Voir la Figure A.3.

2.6
lame d'ensemble
lame microscopique sur laquelle 300 à 400 nématodes sont montés pour l'identification des espèces

2.7
identification
détermination de l'espèce, du genre ou de la famille d'un individu sur la base de caractéristiques morphologiques (cavité buccale, organes sexuels, mensurations) avec une clé d'identification

2.8
échelle colonisateur – persistant (cp)
classification écologique des nématodes, proposée par Bongers ^[4]. [5]

NOTE Le principe est analogue aux stratégies démographiques r-K, largement acceptées en écologie fondamentale. Les familles de nématodes non phytophages sont classées dans l'un des cinq groupes cp. C'est également la base du calcul de l'indice de maturité.

3 Principe

Les échantillons de sol contenant les nématodes sont collectés avec une petite carotte cylindrique (diamètre: environ 2 cm, longueur: 10 cm) ou une tarière (voir la Figure A.2). Pour les applications de surveillance les échantillons de sol sont mélangés dans un échantillon composite, représentatif d'une zone homogène. Le nombre total d'échantillons doit être déterminé en fonction de la surface étudiée et de son homogénéité (par exemple: pédologie, cultures). Les échantillons individuels peuvent être collectés sur le terrain dans des sacs en plastique ou des seaux en plastique. L'échantillon composite est trop volumineux pour un examen direct et, en conséquence, celui-ci est mélangé et sous-échantillonné. Sur le terrain et durant le transport au laboratoire, les échantillons de sol doivent être protégés contre les fortes fluctuations de température, la perte d'eau et les perturbations mécaniques violentes. Ils peuvent être conservés pendant quatre semaines au maximum à 4 °C.

NOTE 1 La méthode d'échantillonnage décrite ci-dessus est dérivée de la «Dutch Method» ^[23] pour déterminer l'infestation par les nématodes à kystes de parcelles cultivées en pomme de terre et a été utilisée depuis longtemps dans plusieurs pays européens.

1) L'éluutriateur Oostenbrink est l'appellation commerciale d'un produit distribué par la société Eijkelkamp, Giesbeek, Pays-Bas (<http://www.eijkelkamp.nl>). Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la présente Norme internationale et ne signifie nullement que l'ISO approuve ou recommande l'emploi exclusif du produit ainsi désigné. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

La méthode de l'entonnoir Oostenbrink est recommandée pour les extractions de routine d'échantillons de sol, dans un réseau de surveillance, par exemple. La méthode Oostenbrink n'est pas la plus simple qui peut être utilisée en toutes circonstances. Cependant, elle présente plusieurs avantages: elle est très normalisée et présente une efficacité d'extraction constante. La méthode de l'entonnoir Oostenbrink combine trois moyens de base qui peuvent être utilisés pour la séparation des nématodes des sols: le lavage, le tamisage et le mouvement actif. Par conséquent, elle permet d'obtenir de meilleurs résultats que l'une des méthodes de base individuellement. Les autres avantages sont donnés ci-dessous:

- des échantillons de sol relativement importants, quelque soit le type de sol, peuvent être traités en une fois (100 g à 500 g);
- des suspensions de nématodes limpides;
- l'isolement de la plupart des nématodes vivants et actifs;
- il existe de nombreuses années d'expérience sur des nombres extrêmement élevés d'extractions de sol en routine;
- elle est utilisée dans de nombreux pays dans le monde entier.

Après l'échantillonnage, les nématodes sont extraits du sol en utilisant l'élutriateur Oostenbrink ¹⁾ (modèle III) (voir la Figure A.3 et l'Annexe B). Dans cette technique, un courant ascendant d'eau sépare les nématodes des particules du sol et les maintient en suspension tandis que les particules plus lourdes décantent au fond [1], [14], [19], [23]. Cette suspension de nématodes et de petites particules traverse trois tamis (taille de maille: 45 µm). Les particules retenues sur les tamis sont lavées et recueillies sur un filtre en ouate (filtre pour lait). Le filtre en ouate est monté sur un tamis et le tout est placé dans une cuvette avec 100 ml d'eau courante. Pendant trois jour, les nématodes se séparent des débris par leur mouvement actif vers le bas. Ainsi, les nématodes vivants traversent activement le filtre et se retrouvent dans la cuvette contenant l'eau.

Après l'extraction, les nématodes sont comptés dans 2 x 710 % des 100 ml de suspension, puis concentrés, fixés et montés sur des lames d'ensemble. Puis, au moins 150 individus ou un pourcentage fixe du nombre total de nématodes dans l'échantillon sont identifiés au microscope.

Les nématodes adultes peuvent être identifiés au niveau de l'espèce. Cependant, les populations dans le sol sont souvent dominées par des juvéniles et le genre est un seuil taxonomique pratique (mais moins sensible).

D'autres méthodes d'extraction telles que l'élutriateur Seinhorst ^[19] ou l'entonnoir Baerman (voir l'Annexe C) peuvent être utiles dans des cas particuliers, mais ne sont pas recommandées en tant que mode opératoire général parce que l'élutriateur Oostenbrink est robuste, facile à utiliser et généralement quantitativement supérieur à la plupart des autres techniques. En variante, les techniques de centrifugation sont les plus adaptées.

NOTE 2 Cette partie de l'ISO 23611 n'est pas applicable pour les nématodes aquatiques parce que ceux-ci ne traversent pas le filtre. Il existe des techniques de centrifugation spécifiques pour les échantillons de sédiments.

NOTE 3 La détermination au microscope optique est basée sur des caractères morphologiques. Dans certains cas, il n'est pas possible de reconnaître un spécimen au niveau de l'espèce, par exemple des jeunes. Avec une nouvelle technique basée sur l'analyse d'ADN, les individus jeunes peuvent également être identifiés au niveau de l'espèce. Dans quelques années, cette nouvelle technique devrait être opérationnelle.

4 Réactifs

4.1 Formol [solution de formaldéhyde, 6 % (fraction volumique)].

4.2 Paraffine, avec un point de fusion proche de 60 °C.

5 Appareillage

Utiliser du matériel de laboratoire standard ainsi que ce qui suit.

5.1 Échantillonnage

5.1.1 Outil de prélèvement d'échantillon de sol, de type à tube ouvert, fermé ou divisé.

EXEMPLE Dispositif de prélèvement d'échantillon de sol (diamètre: 23 mm) ou une tarière (Figures A.2 et A.3); disponibles dans le commerce.

5.1.2 Seau en plastique, pour la collecte d'échantillons de sol sur le terrain.

5.1.3 Récipient en plastique, pour le mélange de l'échantillon composite.

5.1.4 Tamis, de 8 mm de taille de pore.

5.1.5 Sacs en plastique ou **réipients en verre** (transport et stockage).

5.1.6 Marqueur permanent ou **étiquettes préimprimées**.

5.2 Extraction

5.2.1 Bécher, ayant une capacité de 100 ml à 250 ml.

5.2.2 Balance, pouvant peser de 1 kg à 25 kg, pour peser la masse d'échantillon totale.

5.2.3 Élutriateur Oostenbrink ¹⁾ (voir également l'Annexe B).

5.2.4 Trois tamis, de 45 µm de taille de pore et de 30 cm de diamètre.

5.2.5 Un tamis, de 250 µm de taille de pore et de 10 cm de diamètre.

5.2.6 Bassine en plastique, d'environ 2 l de capacité.

5.2.7 Bague de fixation.

5.2.8 Tamis d'extraction, de 1 000 µm de taille de pore et de 16 cm de diamètre.

5.2.9 Filtres à lait ou **en ouate**.

5.2.10 Plateaux bas (boîtes de Petri) ou **cuvettes d'extraction spéciales**.

5.2.11 Flacon en verre, de 100 ml de capacité, avec bouchon à vis.

5.3 Comptage

5.3.1 Loupe binoculaire, avec un grossissement ×10 à ×50.

5.3.2 Plaque de comptage avec une grille.

NOTE Des plaques de comptage de différentes tailles et de différents pas de grille sont disponibles auprès des fabricants de matériel de laboratoire. Elles peuvent également être préparées à partir de boîtes de Petri en gravant une grille au fond à l'aide d'une aiguille.

5.3.3 Compteur à main.

5.3.4 Pompe d'aquarium, pour mélanger les suspensions de nématodes.

5.3.5 Pipette (goutte à goutte en verre), avec volume réglable.

5.3.6 Aiguille permettant de manipuler les nématodes.

5.3.7 Flacon, ayant un volume de 100 ml.

5.4 Fixation et préparation de lames d'ensemble

5.4.1 Pompe à eau, pour concentrer les suspensions.

5.4.2 Lames en verre, de 50 mm × 76 mm.

5.4.3 Lamelles couvre-objet, de 45 mm × 45 mm.

5.4.4 Plaque chauffante électrique.

5.4.5 Poinçon en métal, 40 mm × 40 mm, pour le joint de paraffine sur les lames de verre.

5.5 Identification

5.5.1 Microscope, avec un grossissement ×400 à ×1 000.

5.5.2 Indicateur micrométrique oculaire.

5.5.3 Clés d'identification [3].

5.5.4 Formulaire normalisé, pour lister les résultats d'identification.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/1c46fd96-744e-4844-89fb-c0c0fbf2fd15/iso-23611-4-2007>

6 Mode opératoire

6.1 Généralités

Pour s'assurer de la qualité de l'analyse, chaque échantillon doit recevoir un code unique dès qu'il est prélevé sur le terrain. Ce code (étiquette) doit rester avec l'échantillon durant toutes les étapes de traitement et d'analyse. Il convient d'utiliser un ou plusieurs formulaires normalisés électroniques pour suivre l'acheminement des échantillons et la collecte des résultats d'analyse. Ces données de base peuvent être combinées dans un fichier de tableur ou de base de données pour les calculs et analyses statistiques réalisées.

6.2 Échantillonnage

Étant donné que la densité et la diversité des nématodes du sol sont les plus élevées dans les 10 cm supérieurs du sol minéral, un outil de prélèvement d'échantillon de sol (5.1.1) avec un tube de prélèvement de 10 cm ou 15 cm de longueur est approprié pour la plupart des applications de surveillance biologique. Il est recommandé d'utiliser un tube fermé de longueur et de diamètre fixes.

EXEMPLE 1 Un outil de prélèvement d'échantillon de sol consiste en une tarière à gouge en acier inoxydable (disponible dans différentes dimensions) constituée d'un tuyau de tarière en acier, d'un seau de collecte (5.1.2) et d'une tige avec une poignée en acier. En raison de la forme conique du tuyau, l'échantillon est aisément poussé vers le seau de collecte lorsque l'échantillon suivant est prélevé. La profondeur d'échantillonnage est constante et les carottes de sol peuvent être aisément collectées dans une grande parcelle (voir la Figure A.1). Ce dispositif peut être utilisé dans de nombreuses situations.