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

**Partie 1:
Tri manuel et extraction des vers de
terre**

iTeh STANDARD PREVIEW
*Soil quality — Sampling of soil invertebrates —
Part 1: Hand sorting and extraction of earthworms*
(standards.iteh.ai)

[ISO 23611-1:2018](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/1b90e584-378c-4fc0-8435-5ce10103b7a6/iso-23611-1-2018)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/1b90e584-378c-4fc0-8435-5ce10103b7a6/iso-23611-1-2018>



iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 23611-1:2018

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/1b90e584-378c-4fc0-8435-5ce10103b7a6/iso-23611-1-2018>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2018

Tous droits réservés. Sauf prescription différente ou nécessité dans le contexte de sa mise en oeuvre, 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, Geneva
Tél.: +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 Références normatives	1
3 Termes et définitions	1
4 Principe	2
5 Réactifs	2
6 Appareillage	3
7 Mode opératoire	3
7.1 Prélèvement des vers de terre.....	3
7.1.1 Généralités.....	3
7.1.2 Tri manuel.....	4
7.1.3 Extraction à l'AITC.....	5
7.2 Conservation.....	6
7.3 Détermination de la biomasse.....	6
8 Évaluation des données	7
9 Rapport d'essai	7
Annexe A (informative) Autres méthodes de prélèvement	8
Annexe B (informative) Détermination des espèces de vers de terre	9
Annexe C (informative) Méthode TSBF modifiée	10
Annexe D (normative) Détermination de la capacité de rétention d'eau maximale	11
Annexe E (informative) Exemples de programmes de surveillance des vers de terre (avec présentation des résultats correspondants)	12
Bibliographie	16

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 attirée 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/avant-propos.

Le présent document a été élaboré par le comité technique ISO/TC 190, *Qualité du sol*, sous-comité SC 4, *Caractérisation biologique*.

Cette deuxième édition annule et remplace la première édition (ISO 23611-1:2006), qui a fait l'objet d'une révision technique. Les principales modifications apportées sont les suivantes:

- utilisation d'un nouvel agent chimique d'extraction, l'AITC (isothiocyanate d'allyle) à la place du formol;
- ajout d'exemples de programmes de surveillance des vers de terre (avec présentation de leurs résultats) sous la forme de l'[Annexe E](#), informative.

Une liste de toutes les parties de la série ISO 23611 se trouve sur le site Web de l'ISO.

Introduction

Le présent document a été rédigé pour répondre à un besoin croissant de normalisation de méthodes d'analyse sur le terrain de la faune terrestre. Ces méthodes, traitant principalement du prélèvement, de l'extraction et de la manipulation des invertébrés du sol, sont nécessaires pour les applications suivantes:

- la classification biologique des sols, y compris l'évaluation de la qualité des sols[25][31][39];
- la bio-indication terrestre et la surveillance à long terme[11][14][33];
- l'évaluation des effets de substances chimiques vis-à-vis des animaux du sol (ISO 11268-3).

Étant donné qu'elles peuvent être à la base de décisions importantes (par exemple, s'il convient d'entreprendre ou non la dépollution d'un site particulier), les données relatives à ces applications sont obtenues à l'aide de méthodes normalisées. En fait, l'absence de méthodes normalisées de ce type est l'une des principales raisons pour lesquelles la bioclassification et la bio-évaluation ont été utilisées relativement rarement, jusqu'à présent, dans des habitats terrestres (comme le sol) par rapport aux sites aquatiques.

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. Le présent document décrit le prélèvement des vers de terre.

À l'origine, les méthodes décrites dans le présent document ont été développées pour des études taxonomiques ou écologiques, visant à élucider le rôle des vers de terre dans différents écosystèmes terrestres. Ces animaux sont indubitablement les invertébrés du sol les plus importants dans les régions tempérées et, à un degré moindre, dans les sols des régions tropicales et boréales.[30][16][18] Depuis Darwin (1881) (voir la Référence [8]), leur incidence sur la structure du sol (par exemple, l'aération, la capacité de rétention d'eau) et sur les fonctions du sol comme la décomposition de la litière et le cycle des éléments nutritifs, est bien connue.[10] En raison de leur biomasse souvent très élevée, ils jouent également un rôle majeur dans un grand nombre de réseaux trophiques terrestres.

Dans la version précédente du présent document, le formol chimique était recommandé comme fluide d'extraction. Cependant, au cours des dernières années, un faisceau grandissant de preuves a confirmé que le formol possède des propriétés critiques, en particulier sur le plan de la toxicité pour l'homme. En décembre 2012, le Comité d'évaluation des risques (CER) de l'Agence européenne des produits chimiques (ECHA) a déclaré qu'il existait suffisamment de preuves scientifiques pour faire entrer le formol dans la classe des produits chimiques «probablement cancérigènes pour l'homme (catégorie Ib)». En outre, des effets négatifs ont été observés sur des organismes non cibles (y compris les micro-organismes du sol, la mésofaune et les végétaux) (voir la Référence [7], par exemple). Cette substance a donc été remplacée.

En raison des réserves grandissantes concernant l'utilisation du formol, plusieurs autres substances ont été étudiées. Dans la Référence [40], l'isothiocyanate d'allyle (AITC) a été soumis à essai afin d'évaluer son efficacité comme agent chimique d'expulsion pour le prélèvement des vers de terre. L'AITC est un produit de décomposition naturel des glucosinolates de nombreuses Brassicacées, c'est-à-dire des composants qui donnent son goût piquant à la moutarde. Selon l'Agence européenne des produits chimiques (ECHA), son utilisation en extérieur ne pose aucun problème.

Au cours des dernières années, des études ont été réalisées dans le but de comparer l'efficacité d'extraction du formol et de l'AITC sur les mêmes sites et aux mêmes dates. D'après la Référence [22], aucune différence n'a été observée quant au nombre ou à la biomasse de vers de terre extrait(e) sur des sites de culture selon que l'on utilisait du formol ou de l'AITC comme agent d'extraction. Dans une récente étude non publiée (voir la Référence [28]), aucune différence significative du point de vue du nombre/de la biomasse de vers de terre n'a été constatée lors de la comparaison de l'efficacité des deux agents chimiques d'extraction. En outre, aucune interaction n'a été observée sur les différents sites échantillonnés entre les agents d'extraction et le sol, ce qui indique qu'en matière d'efficacité des agents d'extraction, aucune différence propre aux sites n'a été notée. Lorsque l'on trace une courbe de

la corrélation entre le nombre de vers de terre extraits avec l'AITC et celui obtenu avec le formol dans un graphique de Bland-Altman (un moyen courant pour comparer une méthode de référence et une autre méthode dans les sciences médicales), aucun biais significatif de la méthode à l'AITC n'apparaît par rapport à la méthode au formol, ce qui indique la similarité/l'interchangeabilité des deux méthodes.

Des informations de base sur l'écologie des vers de terre et leur utilisation en tant que bio-indicateurs dans un environnement terrestre sont disponibles dans les références citées dans la bibliographie.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 23611-1:2018](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/1b90e584-378c-4fc0-8435-5ce10103b7a6/iso-23611-1-2018)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/1b90e584-378c-4fc0-8435-5ce10103b7a6/iso-23611-1-2018>

Qualité du sol — Prélèvement des invertébrés du sol —

Partie 1: Tri manuel et extraction des vers de terre

1 Domaine d'application

Le présent document spécifie une méthode pour le prélèvement et la manipulation de vers de terre sur le terrain, comme prérequis 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 des organismes).

Le présent document est utilisé pour tous les biotopes terrestres abritant des vers de terre. La conception de l'échantillonnage pour les études sur le terrain est, de manière générale, décrite dans l'ISO 18400-101 et les lignes directrices relatives à la détermination des effets sur site des polluants vis-à-vis des vers de terre sont données dans l'ISO 11268-3. Ces aspects peuvent varier en fonction des exigences nationales ou des conditions climatiques/régionales du site sur lequel l'échantillon doit être prélevé (voir également l'Annexe C).

Le présent document ne s'applique pas aux sols semi-terrestres et il peut s'avérer difficile de l'appliquer dans des conditions climatiques ou géographiques extrêmes (en haute montagne, par exemple). Les méthodes pour quelques autres groupes d'organismes du sol, tels que les Collembolés, sont traitées dans d'autres parties de l'ISO 23611.

2 Références normatives

ISO 23611-1:2018

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/1b90e584-378c-4fc0-8435-5ce10103b7a6/iso-23611-1-2018>

Les documents suivants cités dans le texte 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 10390, *Qualité du sol — Détermination du pH*

ISO 10694, *Qualité du sol — Dosage du carbone organique et du carbone total après combustion sèche (analyse élémentaire)*

ISO 11260, *Qualité du sol — Détermination de la capacité d'échange cationique effective et du taux de saturation en bases échangeables à l'aide d'une solution de chlorure de baryum*

ISO 11277, *Qualité du sol — Détermination de la répartition granulométrique de la matière minérale des sols — Méthode par tamisage et sédimentation*

ISO 11465, *Qualité du sol — Détermination de la teneur pondérale en matière sèche et en eau — Méthode gravimétrique*

3 Termes et définitions

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

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 <http://www.electropedia.org/>

3.1 vers de terre
vers de terre mégadriles vivant dans le sol appartenant à l'ordre des *Oligochaeta* (classe *Clitellata*, phylum *Annelida*)

Note 1 à l'article: La longueur des individus adultes peut varier de quelques centimètres à plus de 1 m.

EXEMPLE Espèces des familles des *Lumbricidae* (Holarctiques), des *Glossoscolecidae* (Amérique latine), des *Eudrilidae* (Afrique) ou des *Megascolecidae* [Asie, Amérique du Nord (Côte Pacifique)].

3.2 espèces pérégrines
vers de terre actuellement présents dans un grand nombre de régions du monde, généralement introduits par l'homme

Note 1 à l'article: Des exemples bien connus d'espèces pérégrines sont des espèces de lombricidés telles que *Aporrectodea caliginosa* (originaire d'Eurasie, mais vivant actuellement aussi aux Amériques et en Australie) ou l'espèce pantropicale *Pontoscolex corethrus* (probablement originaire du Nord du Brésil et/ou des Guyanes).

Note 2 à l'article: Voir la Référence [18].

3.3 clitellum
épaissement épidermique en forme d'anneau ou de selle uniquement présent chez les vers adultes et situé près de leur partie antérieure, et qui évoluera éventuellement en cocon

iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

4 Principe

Sur un site donné, les vers de terre sont prélevés dans le sol en combinant deux méthodes différentes:

- tri manuel des animaux sur une surface donnée (par exemple, 0,25 m²) de profondeur variable selon l'utilisation du terrain (par exemple, sur les sites de culture: 20 cm), les propriétés du sol et le champ d'application du prélèvement;
- extraction des vers du sol par application d'AITC.

La première méthode est connue depuis une centaine d'années environ, alors que la seconde méthode mettant en œuvre le nouvel agent d'extraction a été proposée il y a environ 15 ans.[7][22][40] Après l'extraction, les vers de terre sont fixés, puis transportés jusqu'au laboratoire. Là, ils sont conservés de manière à pouvoir être stockés indéfiniment dans une collection (à des fins taxonomiques, par exemple). De plus, la détermination de la biomasse des vers de terre est décrite. Pour finir, les valeurs d'abondance et de biomasse peuvent être recalculées et rapportées à une surface (généralement 1 m²) ou plus rarement à un volume.

NOTE 1 D'autres méthodes peuvent se révéler utiles dans certaines circonstances (par exemple, l'extraction électrique), mais ne peuvent être recommandées en tant que mode opératoire général (voir l'Annexe A).

NOTE 2 Le prélèvement de vers de terre 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 macrofaune). La conception de tels programmes n'est pas comprise dans le présent document.

NOTE 3 Quelques indications sur la taxinomie des vers de terre pérégrins (répartis dans un grand nombre de régions du monde), appartenant principalement à la famille des *Lumbricidae*, sont fournies dans l'Annexe B.

5 Réactifs

5.1 Isothiocyanate d'allyle (AITC), qualité synthétique [à environ 94 % à 97 % (fraction volumique)].

5.2 Isopropanol, à 100 % (fraction volumique).

5.3 Éthanol, à 70 % (fraction volumique).

5.4 Formol, solution de formaldéhyde à 4 % (fraction volumique), à des fins de stockage uniquement.

5.5 Éthanol, à 95 % (fraction volumique), à des fins de stockage lorsque des méthodes génétiques telles que le codage à barres sont utilisées.

6 Appareillage

Matériel courant de laboratoire et ce qui suit.

6.1 Récipients en plastique, de 250 ml et de 500 ml, pour le stockage des vers de terre.

6.2 Gants en caoutchouc.

6.3 Pinces.

6.4 Bâche en plastique épais, de 1 m² à 2 m².

6.5 Bêche ou pelle.

6.6 Microscope à dissection, à faible grossissement ($\times 10$ à $\times 40$).

6.7 Balance, pesant de 0,01 g à 200 g.

6.8 Bonbonne à eau, de préférence de 20 l de capacité, remplie d'eau (20 l par point d'échantillonnage).

6.9 Arrosoir.

6.10 Crayon, carnet de notes, marqueur indélébile, étiquettes, qui tiennent dans le récipient.

6.11 Thermomètre, pour mesurer la température de l'air, par exemple.

6.12 Enceinte de séchage, pour déterminer l'humidité du sol.

7 Mode opératoire

7.1 Prélèvement des vers de terre

7.1.1 Généralités

Le prélèvement des vers de terre est effectué en combinant deux méthodes différentes: le tri manuel et l'extraction à l'AITC. Les différentes revues traitant de l'écologie des vers de terre, s'appuyant sur plusieurs études comparatives, recommandent clairement la combinaison d'une méthode physique et d'une méthode chimique, indépendamment de l'agent chimique d'expulsion (Références [9], [10] et [18] par exemple).

Il convient de réaliser le prélèvement pendant les périodes de l'année où les animaux ne sont pas contraints par les conditions environnementales (à savoir une faible humidité du sol et/ou des températures élevées) à un métabolisme réduit (c'est-à-dire qu'ils ne réagissent pas à l'AITC). Dans les régions tempérées, les périodes défavorables au prélèvement correspondent à l'hiver et surtout au milieu de l'été.[18] Il convient que les vers de terre issus d'un même point d'échantillonnage, mais

prélevés selon les deux méthodes, soient stockés dans des récipients en plastique distincts. À la fin du prélèvement, le sol excavé et examiné est remis sur le point d'échantillonnage d'origine. Dans certains cas, il convient de n'utiliser que l'une des deux méthodes: par exemple, lorsqu'aucun animal fouisseur profond n'est répertorié pour un site donné, l'extraction à l'AITC n'est pas nécessaire. Par ailleurs, dans les sites où se trouvent des vers de terre géants (certaines régions d'Amérique du Sud, d'Asie du Sud-Est et d'Australie), le tri manuel ne présente aucune utilité.^[26] Une méthode très similaire, connue sous le nom de méthode TSBF modifiée, convient tout particulièrement aux régions tropicales (voir l'Annexe C).

NOTE La détermination des vers de terre intervient généralement après conservation, mais si le spectre des espèces d'un site de prélèvement est bien connu, les vers de terre peuvent aussi être déterminés alors qu'ils sont vivants^[35] (voir également l'Annexe B).

Si les vers de terre prélevés sont utilisés pour d'autres analyses ou d'autres essais, par exemple des mesures de biomarqueurs ou des essais biologiques, le stockage ou l'incubation des vers dans une petite portion de sol du site de prélèvement est recommandé(e). En cas d'extraction à l'AITC, il est nécessaire de rincer les vers à l'eau du robinet avant l'incubation dans le sol.

Pour l'interprétation des résultats d'essai, les caractéristiques suivantes doivent être déterminées pour le site à étudier:

- a) le pH, conformément à l'ISO 10390;
- b) la texture (sableuse, argileuse, limoneuse), conformément à l'ISO 11277;
- c) la teneur en eau, conformément à l'ISO 11465;
- d) la capacité de rétention d'eau, telle que spécifiée à l'Annexe D;
- e) la capacité d'échange cationique, conformément à l'ISO 11260;
- f) la teneur en carbone organique, conformément à l'ISO 10694.

STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)
ISO 23611-1:2018
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/1b90e584-378c-4fc0-8435-5ce10103b7a6/iso-23611-1-2018>

7.1.2 Tri manuel

Il convient de choisir les dimensions du point d'échantillonnage selon la taille et la densité moyennes attendues des vers de terre. Un carré de 50 cm × 50 cm suffit généralement dans les régions holarctiques, où la longueur de la plupart des vers de terre adultes est comprise entre 1 cm et 20 cm environ. Cependant, dans les régions à faible densité en vers de terre [par exemple, les sols à faible pH (< 4,5) ou ceux cultivés par l'homme], des surfaces plus étendues (à savoir de 1 m²) sont recommandées (voir l'ISO 11268-3). Par ailleurs, dans les zones à forte densité en vers de terre (par exemple, un grand nombre de prairies dans les régions tempérées), une surface plus réduite de 1/8 m² suffit.^[29] Des tailles d'échantillons encore plus réduites (par exemple, 1/16 m²^[41]) peuvent produire des nombres très faibles, et donc variables, de vers de terre par échantillon, ce qui entraîne une augmentation du nombre d'échantillons (par exemple, 16 répliqués).

Dans tous les cas, le sol est prélevé à l'aide d'une bêche ou d'une pelle (6.5) sur une profondeur pouvant aller jusqu'à 20 cm pour chaque point d'échantillonnage (20 cm conviennent pour un grand nombre de sites tempérés, mais la profondeur dépend également des propriétés du site). Le sol excavé est étalé sur une bâche en plastique (6.4). Cette opération peut être effectuée sur le terrain mais, en particulier dans les périodes de mauvais temps, la totalité du mode opératoire peut également être réalisée en laboratoire ou sous serre. Le sol est ensuite examiné avec soin à la recherche de vers de terre. Les vers de terre de grande taille sont recueillis à la main avec des gants en caoutchouc (6.2) et ceux de petite taille à l'aide de pinces (6.3). Afin d'éviter l'autotomie des vers et pour ne pas les endommager davantage, il convient de ne toucher les animaux que dans leur partie antérieure. Si des vers de terre sont coupés par la bêche utilisée pour creuser le sol, les deux parties sont ramassées pour une mesure correcte de la biomasse, tandis que seules les parties antérieures sont comptées lors de la détermination du nombre d'individus.

NOTE 1 Il est possible d'identifier la partie antérieure des vers adultes à l'œil nu par la position du clitellum: celui-ci est toujours situé plus près de la tête que de la queue.

Il convient de fixer immédiatement les vers de terre recueillis dans de l'éthanol à 70 % (5.3), dans des récipients en plastique (6.1) de 250 ml ou de 500 ml, pendant au moins 0,5 h, mais sans dépasser 24 h. Si la solution d'éthanol est diluée par les fluides corporels et/ou contient des particules de sol, elle doit être changée au bout de 24 h à 48 h. Les récipients doivent être étiquetés et il convient de consigner les observations (par exemple, si les vers étaient ou non en quiescence) dans le carnet de notes (6.10).

La fixation immédiate dans le formol à 4 % (fraction volumique) (5.4) est possible, mais elle n'est pas recommandée étant donné qu'il convient de réduire la manipulation de ce composé autant que possible, en particulier en conditions de terrain.

NOTE 2 Afin d'éviter des modifications morphologiques (par exemple, une inversion du prostomium) dues à la fixation immédiate dans l'éthanol, les vers de terre peuvent être placés brièvement (pendant environ une minute) dans de l'eau du robinet chaude (30 °C à 40 °C, par exemple). Les vers de terre sont laissés au repos dans l'eau et peuvent ensuite être transférés dans l'éthanol.

7.1.3 Extraction à l'AITC

Le même point d'échantillonnage que celui dans lequel l'horizon superficiel a été prélevé pour le tri manuel est utilisé pour l'extraction à l'AITC. Une quantité suffisante d'eau (5 l à 10 l par point) doit être transportée au préalable vers les sites à l'aide de grandes bonbonnes à eau (6.8). Pour préparer la solution d'AITC, une quantité de 1 g d'AITC est dissoute dans 50 ml d'isopropanol et la solution ainsi obtenue est complétée à 10 l avec de l'eau. La masse volumique de l'AITC est de 1,013 kg/l; autrement dit, en utilisant une fraction volumique, la concentration est de 98,7 ml/l. La solution d'AITC diluée est appliquée soigneusement et de manière homogène sur la surface du point d'échantillonnage dont l'horizon superficiel a été prélevé pour le tri manuel. Il convient d'appliquer la solution en plusieurs fois (généralement 2 à 3), selon la capacité d'infiltration du sol, jusqu'à ce que 5 l à 10 l de solution d'AITC ait été ajoutés, en fonction des propriétés du sol (si le point d'échantillonnage couvre une surface supérieure à 0,25 m², la quantité de solution d'AITC doit être augmentée en conséquence). Pendant l'application, le point d'échantillonnage doit être observé afin de recueillir tous les vers de terre apparaissant à la surface du sol du point d'échantillonnage. Le prélèvement se termine 30 min après l'application du dernier arrosage.

L'AITC se décompose facilement dans l'eau, c'est donc également le cas dans la solution mère d'isopropanol. La décomposition est accélérée par le rayonnement solaire et la chaleur. La solution finale doit donc être préparée immédiatement avant son utilisation.

Il convient de recueillir les vers de terre de grande taille à la main avec des gants en caoutchouc (6.2) et ceux de petite taille à l'aide de pinces (6.3). L'AITC est répulsif et entraîne l'émergence rapide des vers de terre du sol. Il convient de ne recueillir les vers de terre que lorsque la plus grande partie, voire de préférence la totalité, du corps est visible, sous peine de les endommager ou d'entraîner leur rétraction dans le sol. Afin d'éviter l'autotomie des vers et pour ne pas les endommager, il convient de ne toucher les animaux que dans leur partie antérieure, généralement devant le clitellum. Il convient de fixer immédiatement les vers de terre recueillis dans de l'éthanol à 70 % (fraction volumique) (5.3) dans des récipients en plastique (6.1) de 250 ml ou de 500 ml, pendant au moins 30 min, mais sans dépasser 24 h. Les récipients doivent être étiquetés et il convient de consigner toute observation dans le carnet de notes (6.10).

Dans les sites abritant des vers de terre géants (Amérique du Sud, Asie du Sud-Est et Australie) et où le tri manuel ne se prête pas à leur collecte, il convient d'appliquer la solution d'AITC sur une surface de 4 m² (la quantité d'AITC doit être augmentée en conséquence). Avant de commencer, les herbes et la litière doivent être déblayés de la surface du sol. Pour le reste, le procédé de prélèvement est en tout point identique.

L'extraction à l'AITC n'est pas nécessaire en l'absence de fousseurs verticaux (notamment *Lumbricus terrestris* ou *Aporrectodea longa*) sur un site donné (par exemple, si le sol est très acide). La présence de ces grands vers est indiquée par les empreintes de surface et la litière recueillie au niveau des orifices