



# Propriétés biologiques des sols : recherche sur l'état de la technique des méthodes et dispositifs de détermination – Partie pédofaune.

## Rapport du CCSols n°2

Sophie Campiche  
EnviBioSoil  
Lausanne

EnviBioSoil  
Conseil et Expertise en Biologie et Ecotoxicologie des sols  
Rue des Cerisiers 6, CH-1124 Gollion

Mai 2021

## Impressum

**Auteurs :** Dr. Sophie Campiche, EnviBioSoil – Expertise et Conseil, Lausanne

**Date de parution :** 2022

**Éditeur :** Centre de compétences sur les sols (CCSols), [ccsols.ch](http://ccsols.ch).

Le CCSols travaille sur mandat de trois offices fédéraux : l'OFEV (Office fédéral de l'environnement), l'OFAG (Office fédéral de l'agriculture) et l'ARE (Office fédéral du développement territorial), et est rattaché à la Haute école des sciences agronomiques, forestières et alimentaires (HAFL) de la Haute école spécialisée bernoise (BFH) de Zollikofen.

**Gestion de Projet :** Sandra Racine et le Dr. Armin Keller, CCSols

**Mise en page :** Magma Branding, Sandrainstrasse 3, 3007 Berne, [magma-branding.ch](http://magma-branding.ch)

**Citation recommandée :** Campiche S., Propriétés biologiques des sols - Recherche sur l'état de la technique des méthodes et dispositifs de détermination: Partie pédofaune, Rapport du CCSols Nr. 2, HAFL, CH-3052 Zollikofen-Berne, disponible sur [www.ccsols.ch](http://www.ccsols.ch).

**Remarque :** Ce rapport a été écrit à la demande du CCSols. Seul l'auteur est responsable de son contenu.

**Droits d'auteur :** Conformément au symbole de licence Creative Commons ci-dessous, la reproduction à des fins non commerciales est encouragée, à condition toutefois de mentionner la source et d'envoyer un exemplaire justificatif à l'éditeur. La distribution ne peut se faire que sous les mêmes conditions de licence.



# Table des matières

<b>Résumé</b>	<b>5</b>
<b>1. Introduction et contexte initial</b>	<b>7</b>
<b>2. Méthodologie de la recherche</b>	<b>9</b>
2.1. Focus de la recherche	9
2.2 Critères d'évaluation des paramètres et méthodes biologiques	11
2.3 Littérature et informations de référence utilisées	12
2.4 Tabelles de comparaison des paramètres biologiques	12
<b>3. Résultats</b>	<b>13</b>
3.1 Paramètres biologiques à travers le monde	13
3.2 Vers de terre	18
3.3 Microarthropodes (Collemboles et Acariens)	27
3.4 Nématodes	33
3.5 Protistes	44
3.6 Méthodes fonctionnelles	48
3.7 Comparaison des paramètres biologiques	55
<b>4. Discussion et Conclusion</b>	<b>57</b>
4.1 Vers de terre	58
4.2 Microarthropodes	65
4.3 Nématodes	68
4.4 Protistes	73
4.5 Méthodes fonctionnelles	76
4.6 Conclusions et recommandations générales	78
<b>7. Références bibliographiques</b>	<b>84</b>
<b>8. Annexe</b>	<b>93</b>
8.1 Tableau de comparaison des paramètres biologiques et méthodes	93
8.2 Liste du matériel et coûts	93
8.3 Interviews réalisées	99

## Avant-propos



Pour une utilisation durable des sols en Suisse, il est absolument nécessaire de cartographier les caractéristiques et la qualité des sols dans leurs profondeurs. Dans ce contexte, il s'agit d'explorer quelles options existent pour la mise en œuvre d'une cartographie des sols selon le nouveau état de l'art, et quels besoins en informations sur les sols sont liés avec quels coûts pour les relever. Des méthodes de détermination efficaces et peu coûteuses des caractéristiques biologiques, chimiques et physiques des sols représentent donc un aspect central pour la protection des sols effective.

Jusqu'à présent, l'objectif premier des cartographies des sols était de déterminer l'aptitude des sols à la production agricole. A l'avenir, des projets de cartographie du sol devraient prendre en compte les exigences croissantes d'autres utilisateurs des informations sur le sol. Parmi eux, on compte entre autres l'aménagement du territoire, la protection des sols, des inondations, du climat, de la nature et de la biodiversité et la sylviculture. Cela pose de nouvelles exigences aux caractéristiques des sols à relever dans une cartographie.

Cependant, le besoin d'informations sur les sols étendues se heurte à des coûts élevés pour le travail sur le terrain et pour les analyses au laboratoire. Le développement et la mise en pratique des méthodes de mesure économiques pour le terrain et le laboratoire est donc essentielle pour une cartographie de sol moderne.

Jusqu'à ce jour, les caractéristiques biologiques ont encore été peu relevées dans la cartographie des sols et dans des autres relevés (p.ex. programmes de surveillances et de recherche), en comparaison des propriétés physico-chimiques. Le plupart des divers processus et fonctions du sol (p.ex. la formation et l'entretien de la structure des sols, la décomposition, la transformation et le transport de la matière organique, le déroulement des cycles biogéochimiques, etc) sont très étroitement liés avec la vie dans le sol, son abondance, composition et activité. En même temps les paramètres biologiques peuvent servir comme indicateurs pour évaluer la qualité du sol. Pour déterminer et protéger les précieuses services écosystémiques du sol, qui sont dépendants de sa qualité et de ses fonctions, il est donc indispensable d'aussi faire des relevés biologiques dans un cadre d'une cartographie nationale.

Dans cette optique, cette recherche sur l'état de l'art des méthodes de détermination des caractéristiques de la pédofaune, réalisée par Dr. Sophie Campiche de EnviBioSoil, constitue une base importante. En présentant systématiquement les avantages et les limites des différents paramètres biologiques du sol, le rapport peut également simplifier le choix d'un indicateur biologique du sol.

Le rapport est un outil important pour le CCSols et s'adresse également aux services cantonaux et aux laboratoires, mais aussi aux hautes écoles, aux instituts de recherche et aux bureaux d'ingénieurs pour leur travail.

Je remercie l'auteure pour ce travail réussi et j'espère qu'il soutiendra de nombreux acteurs dans la collecte des paramètres biologiques des sols.

Cordialement,  
Dr. Armin Keller  
Directeur du CCSols

## Résumé

Ce travail de recherche s'inscrit dans le cadre de la mise en place du Centre de compétences sur les sols (CCSols) qui a pour principaux objectifs, entre autres, la création de bases méthodologiques et de références normalisées pour définir les propriétés des sols au niveau national ainsi que la mise en place d'une cartographie des sols à l'échelle du territoire suisse. Dans ce contexte, il est donc essentiel de déterminer les besoins actuels en informations sur les sols, de définir des méthodes pour l'évaluation des propriétés du sol qui soient adaptées aux besoins de tous et finalement d'établir la faisabilité de mise en œuvre d'une cartographie des sols au niveau du territoire suisse. Les propriétés chimiques, physiques et biologiques des sols doivent être considérées dans leur ensemble. Jusqu'à présent, les paramètres biologiques ont encore été peu intégrés dans la cartographie des sols en comparaison des propriétés physico-chimiques. Le but de ce travail de recherche est de cibler les besoins en informations concernant les propriétés biologiques des sols afin d'établir une liste de paramètres biologiques d'intérêt pour la planification adéquate d'une cartographie des sols suisses. Ce travail de recherche s'est concentré sur la pédofaune et plus particulièrement sur les principaux invertébrés endogés comme paramètres biologiques pour les sols.

Dans un premier temps, une revue bibliographique sur l'état de l'art des paramètres biologiques et méthodes employés au niveau national et international pour apprécier la qualité du sol a été réalisée. Celle-ci a montré que plusieurs programmes de surveillance et de recherche qui existent au niveau national et international incluent des paramètres biologiques. Les vers de terre, suivis des microarthropodes (principalement collemboles et acariens) et des nématodes sont parmi les paramètres biologiques les plus utilisés. Les méthodes employées par les différents programmes de surveillance et de recherche ont été évaluées. L'étude bibliographique a montré que si différentes méthodes existent pour étudier un même paramètre biologique, elles restent plutôt unitaires. En effet, le principe de base des méthodologies est en général le même pour le paramètre biologique en question et les différences qui

peuvent exister concernent surtout la phase d'extraction des organismes du sol. La plupart du temps, un standard ISO est disponible pour chaque paramètre biologique, principalement pour les méthodes pratiquant une analyse morphologique des organismes. Ces standards ISO proposent habituellement une méthode de référence générale et listent des méthodes alternatives qui sont souvent celles utilisées par les autres programmes de recherche ou de surveillance. L'étude bibliographique a également montré que bien que l'identification des organismes du sol se fasse encore majoritairement grâce à une analyse morphologique, l'analyse moléculaire par séquençage de l'ADN commence à se démocratiser, particulièrement en ce qui concerne la microfaune (protistes et nématodes). Elle est aussi en développement pour les microarthropodes (collemboles et acariens) et les vers de terre.

Par la suite, ce travail a évalué la pertinence des paramètres et méthodes biologiques considérés et a examiné la faisabilité de leur mise en œuvre (praticabilité, efforts, coûts) pour une cartographie complète des sols en Suisse. Les vers de terre, microarthropodes, nématodes, et protistes ainsi que les méthodes fonctionnelles (Litter Bag, Bait Lamina et Tea Bag, considérant la dégradation de la matière organique), ont été retenus pour ce faire. L'adéquation de ces paramètres biologiques pour la cartographie a été évaluée pour un volume de traitement considérant trois scénarios différents, soit 100, 500 et 1000 échantillons hebdomadaires. L'étude montre que les paramètres biologiques restent chronophages et qu'un nombre d'échantillons inférieur à 100 par semaine serait plus adapté aux méthodologies existantes. En effet, à ce jour, il ne semble pas y avoir de solution disponible pour le traitement d'un grand volume d'échantillons, particulièrement pour les analyses morphologiques. Pour ce type d'analyses et pour de très grands volumes d'échantillons, une optimisation et une automatisation des protocoles méthodologiques seraient à envisager ce qui permettrait de paralléliser et d'alléger les procédures. Les analyses moléculaires semblent être mieux adaptées aux analyses en grande série.



Finalement, des recommandations pour la mise en œuvre de la cartographie des sols à large échelle ont été proposées. L'étude des protistes et nématodes pourrait être réalisée sur les sondages mécaniques du fait du mode de prélèvement de l'échantillon de sol (échantillon composite). Leur étude est également combinable avec l'échantillonnage du sol pour les paramètres microbiologiques comme les bactéries et les champignons ou certains paramètres physico-chimiques. Les autres paramètres biologiques (vers de terre, microarthropodes et méthodes fonctionnelles) sont réservés aux profils.

Il convient de noter que ce rapport reflète l'état de l'art des méthodes de détermination des caractéristiques de la pédofaune au printemps 2021. Les prix, ainsi que les méthodes moléculaires en particulier, peuvent avoir changé depuis.

# 1. Introduction et contexte initial

Ce travail de recherche bibliographique s'inscrit dans le cadre de la mise en place du Centre de compétences sur les sols (CCSols) qui a pour principaux objectifs, entre autres, la création de bases méthodologiques et de références normalisées pour définir les propriétés des sols au niveau national ainsi que la mise en place d'une cartographie des sols à l'échelle du territoire suisse.

En effet, afin de garantir une utilisation durable des sols en Suisse, il est nécessaire d'examiner de manière plus approfondie les propriétés et la qualité des sols au moyen d'une cartographie à l'échelle nationale. Alors que la cartographie des sols précédente visait principalement à évaluer l'aptitude du sol à la production agricole, il est devenu indispensable de déterminer des propriétés supplémentaires afin de maintenir les fonctions du sol et de protéger ce dernier. Un ensemble de données normalisées doit donc être défini afin de couvrir autant de besoins que possible lors de l'utilisation des informations pédologiques de la future cartographie des sols. Les besoins en informations pédologiques sont en effet assez divers au sein de la scène du sol suisse et doivent satisfaire aux nécessités des différents acteurs tels que la confédération, les cantons, le secteur privé, notamment les bureaux d'ingénieurs, le secteur agricole, les instituts de recherche, etc. Dans ce contexte, il est donc essentiel de déterminer les besoins actuels en informations sur les sols, de définir des méthodes pour l'évaluation des propriétés du sol qui soient adaptées aux besoins de tous et finalement d'établir la faisabilité de mise en œuvre d'une cartographie des sols au niveau du territoire suisse. Les propriétés chimiques, physiques et biologiques des sols doivent être considérées dans leur ensemble. Jusqu'à présent, les paramètres biologiques ont encore été peu intégrés dans la cartographie des sols en comparaison des propriétés physico-chimiques. On assiste cependant à une demande croissante pour leur intégration (Keller et Racine, 2019).

La mise en œuvre d'une cartographie des sols à l'échelle nationale nécessite donc d'examiner le besoin en informations sur les sols et d'analyser les différentes options envisageables en termes de coûts, d'efforts et de pertinence des données collectées. La méthode idéale devrait fournir une information fiable et reproductible tout en étant économique et en ne demandant qu'une charge de travail réduite pour sa mise en œuvre. La sélection des propriétés biologiques et le choix des méthodes dépendent également du nombre d'échantillons à traiter par unité de temps. Différents scénarios concernant la capacité d'échantillonnage hebdomadaire et de réalisation doivent donc être évalués. De même, différents niveaux hiérarchiques (profils de référence, profils guides et sondages mécaniques) peuvent être considérés dans la cartographie pour l'étude des propriétés du sol (Keller et Racine, 2019).

Le but de ce travail de recherche est de cibler les besoins en informations concernant les propriétés biologiques des sols afin d'établir une liste de paramètres biologiques d'intérêt pour la planification adéquate d'une cartographie des sols suisses. La première partie de ce travail examine l'état actuel de la technique concernant les propriétés biologiques des sols. Une revue bibliographique sur l'état de l'art des paramètres biologiques et méthodes associées utilisés dans les principaux programmes de surveillance et de recherche au niveau national et international a été réalisée. Par la suite, ce travail a évalué la pertinence des paramètres et méthodes biologiques considérés et a

examiné la faisabilité de leur mise en œuvre (praticabilité, efforts, coûts) pour une cartographie complète des sols en Suisse. L'adéquation des méthodes pour la cartographie a été évaluée pour un volume de traitement d'échantillons hebdomadaires considérant trois scénarios différents, soit 100, 500 et 1000 échantillons. Finalement, des recommandations pour la mise en œuvre pour la cartographie des sols à large échelle sont proposées. Les propriétés biologiques et les méthodes sélectionnées ont été classifiées comme prioritaires ou optionnelles selon les trois niveaux hiérarchiques considérés dans la cartographie pour l'étude des propriétés du sol : 1) les profils de référence, qui désignent des profils de sol représentatifs pour la Suisse et qui doivent être étudiés et décrits de la manière la plus large possible, 2) les profils guides (dans le cadre de la cartographie des sols) et les sondages mécaniques avec prises d'échantillons. Les possibilités de combinaisons méthodologiques (propriétés biologiques entre elles ou avec les propriétés physico-chimiques) ont aussi été évaluées.

Ce travail de recherche se concentre sur les méthodes d'essais biologiques ciblant la pédofaune endogée, plus spécifiquement les vers de terre, les collemboles, les acariens, les nématodes, ainsi que les protistes. La macrofaune de surface, les isopodes, les myriapodes, les fourmis, les larves d'insectes avec stades de développement dans le sol, les mollusques, la mégafaune (p.ex. micromammifères), les plantes, etc., ne sont pas considérés ici. La microflore (bactéries et champignons) fait l'objet d'une autre étude.



## 2. Méthodologie de la recherche

Les paramètres biologiques des sols concernent les propriétés du sol liées à l'activité des organismes (animaux, plantes et microorganismes) qui y vivent, de l'échelle microscopique à l'échelle macroscopique. La composante biologique du sol joue un rôle essentiel dans la détermination de nombreuses caractéristiques du sol et est également responsable de divers processus, tels que la formation et l'entretien de la structure des sols, la décomposition, la transformation et le transport de la matière organique, le déroulement des cycles biogéochimiques, etc. (Bispo et al., 2009 ; Greiner et al., 2017). Au même titre que pour les propriétés physico-chimiques, les paramètres biologiques du sol peuvent être utilisés comme indicateurs pour évaluer la qualité des sols. Ces indicateurs, y compris les indicateurs biologiques, permettent d'iden-

tifier et de quantifier les perturbations, les transformations du sol et les impacts sur les écosystèmes. Cette surveillance des sols permet de relier l'utilisation et la gestion des terres au fonctionnement des sols et aux services écosystémiques et de mettre en place, de suivre et d'assurer les actions de protection et de gestion (Bispo et al., 2009 ; Pulleman et al., 2012). Les paramètres biologiques du sol sont utilisés depuis les années 1990 dans un nombre croissant d'essais sur le terrain et de programmes de surveillance (Pulleman et al., 2012). De nombreux groupes d'organismes et divers processus biologiques ont été utilisés comme indicateurs de la qualité des sols dans les programmes de surveillance et de recherche. Les paramètres biologiques restent cependant encore peu utilisés en comparaison des paramètres physico-chimiques.

---

### 2.1. Focus de la recherche

#### 2.1.1 Paramètres biologiques

Les organismes du sol sont souvent utilisés comme paramètres biologiques, livrant différents types de réponses et informant sur la structure ou sur le fonctionnement de l'écosystème. Les paramètres biologiques peuvent être regroupés en 3 grandes catégories :

- \_ Les *paramètres globaux ou de quantité*, qui sont des paramètres généraux et qui mesurent par exemple la biomasse ou le nombre d'individus pour l'organisme étudié.
- \_ Les *paramètres de structure – diversité*, qui évaluent par exemple le nombre d'espèces et la structure des communautés.
- \_ Les *paramètres d'activité ou de fonction*, qui donnent des informations sur les processus et fonctions du sol.

L'étude d'un seul organisme permet souvent de collecter plusieurs paramètres biologiques de mesures.

Par exemple, l'étude des vers de terre pour un site particulier donnera des informations sur le nombre d'individus présents et sur la biomasse qu'ils représentent pour le lieu (*paramètre global*). Des informations sur le nombre d'espèces présentes pourront également être collectées (*paramètre de structure/diversité*). Finalement, leur répartition en fonction des catégories écologiques auxquelles ils appartiennent donnera des indications sur les fonctions qu'ils jouent au sein de l'écosystème (*paramètres d'activité/fonction*) (voir chapitre 3.2 pour plus de détails).

Dans certains cas, la mesure des paramètres fonctionnels passe par une seule mesure spécifique. C'est le cas par exemple des méthodes cherchant à évaluer l'activité biologique comme la dégradation de la matière organique dans les sols avec la méthode Bait Lamina, le Litter Bag ou le Tea Bag Index.

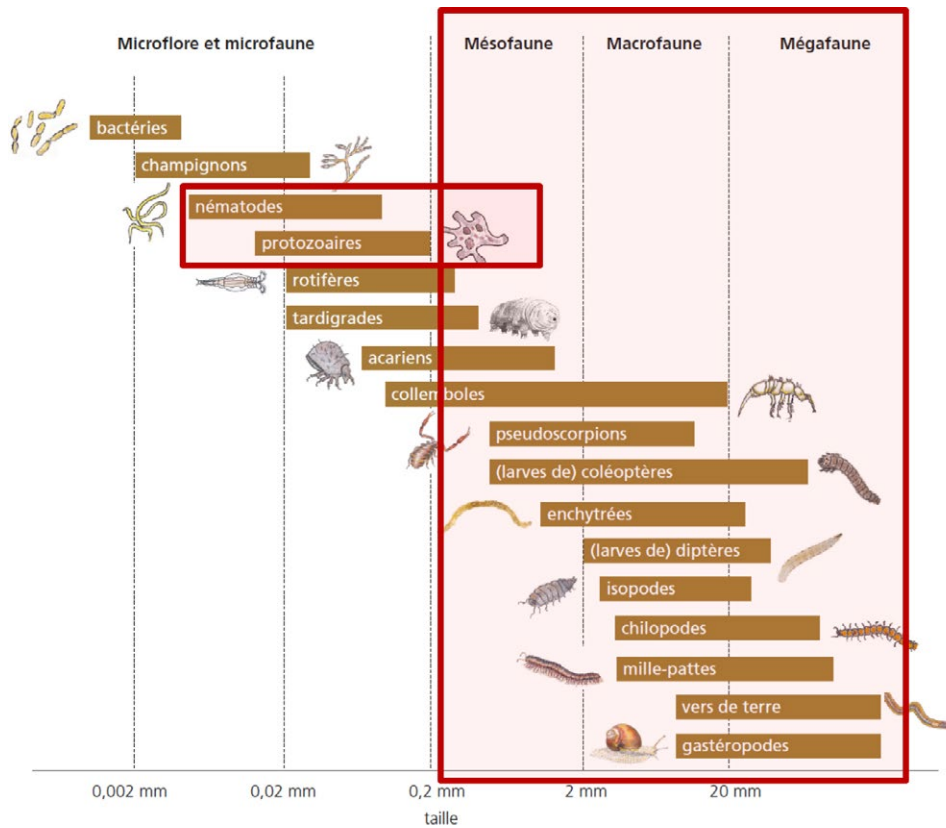


Figure 1 : Classes d'organismes du sol (selon leur taille) considérés dans ce travail de recherche. Ils sont indiqués par les rectangles rouges et représentent la pédofaune uniquement. La microflore n'est pas prise en compte. (Origine de la figure : Walser et al. (2021)).

## 2.1.2 Organismes d'intérêt

Dans ce travail de recherche, les organismes du sol considérés pour les paramètres biologiques se limitent à la pédofaune et aux protistes. Les paramètres biologiques du sol pour la microflore (bactéries et champignons) sont examinés dans une autre étude. Par pédofaune, on entend les organismes de la microfaune, comme les nématodes et protozoaires (par extension les protistes), ainsi que les organismes de la méso, macro- et mégafaune, tels que acariens, collemboles, enchytréides et vers de terre (Figure 1).

Les paramètres biologiques considèrent souvent l'abondance, la diversité et la structure des communautés d'organismes du sol comme variable de mesure. L'activité biologique de ces organismes et le rôle qu'ils jouent dans les processus et fonction du sol, comme la dégradation de la matière organique, peuvent également être pris en compte.

Comme illustré dans Figure 1, les organismes de la faune du sol sont divers. Afin de mieux cibler la recherche sur les paramètres biologiques présen-

tant un intérêt pour une cartographie des sols, une étude bibliographique a été réalisée pour connaître les principaux programmes de surveillance ou de recherche d'envergure sur les sols utilisant ces paramètres et les organismes impliqués pour l'Europe (voir aussi chapitre 3.1). Les projets de recherche s'intéressant aux organismes du sol, à la qualité et à la surveillance des sols en Suisse ont également été inclus dans l'étude. Les paramètres biologiques sélectionnés dans ces programmes ont été répertoriés et une liste des méthodes employées pour leur étude a été établie (Figure 2).



Figure 2 : Approche utilisée pour cibler les paramètres biologiques d'intérêt dans une cartographie des sols.

---

## 2.2 Critères d'évaluation des paramètres et méthodes biologiques

Différents critères ont été considérés pour évaluer la pertinence et la faisabilité de mise en œuvre des paramètres et méthodes biologiques dans la cartographie des sols.

---

### 2.2.1 Mise en œuvre des méthodes

Pour évaluer la faisabilité de mise en œuvre des méthodes, plusieurs éléments ont été pris en compte, soit les ressources nécessaires à :

- \_ La phase de terrain : prélèvement des organismes ou des échantillons de sol, ou mise en place/retrait des outils de mesure (Bait Lamina ou Tea Bag, par exemple), en fonction des diverses modalités d'échantillonnage
- \_ La préparation et le traitement des échantillons pour l'analyse
- \_ L'analyse et l'interprétation des paramètres biologiques

Le terme «ressources» englobe :

- \_ Les investissements temporels (temps nécessaire à la réalisation de la procédure)
- \_ Les besoins et coûts matériel
- \_ Le niveau d'expertise requis pour le travail à effectuer

Le matériel pris en compte comprend l'appareillage spécifique requis pour la méthode et les consommables nécessaires à la réalisation. Le matériel de laboratoire de base (p.ex. hotte de ventilation, pipettes de précision etc.) n'a pas été considéré.

Les critères de pertinence et de mise en œuvre spécifiques à chaque bioindicateur sont définis plus en détail dans les différentes sections relatives au sujet (voir chapitre 3).

---

### 2.2.2 Considérations additionnelles et contraintes d'utilisation

Pour chaque indicateur biologique, des informations et considérations additionnelles précisent les conditions d'utilisation de celui-ci. Ces informations devraient servir à pouvoir orienter l'emploi des paramètres biologiques pour la cartographie des sols. Elles sont définies en fin de section pour les indicateurs correspondants (chapitre 3).

---

## 2.3 Littérature et informations de référence utilisées

La recherche d'informations sur les paramètres biologiques d'intérêt pour une cartographie des sols s'est axée sur les informations disponibles dans les bases de données nationales et dans les publications scientifiques et méthodes de mesure publiées, citées et/ou utilisées dans les programmes de surveillance et de recherche répertoriés. Pour les projets de recherche suisse, l'information a été obtenue lors d'entretiens personnels avec les experts responsables du projet de recherche et via les publications scientifiques ou la littérature grise publiées par le groupe de recherche sur le sujet.

Les méthodes considérées font l'objet de normes nationales ou internationales ou sont validées par des institutions nationales (littérature grise dans certains cas). Les méthodes prometteuses, mais encore en phase de développement, ont également été prises en considération dans la mesure du possible.

Les méthodes inventoriées pour chacun des organismes considérés sont décrites plus en détail dans le chapitre 3.

---

## 2.4 Tabelles de comparaison des paramètres biologiques

Les informations recueillies lors de la revue de littérature au sujet des programmes de surveillance et de recherche utilisant des paramètres biologiques, (organismes et méthodes employées pour leur évaluation), ont en premier lieu été compilées dans un tableau Excel. Des données concernant l'organisme considéré, des informations de référence sur la méthode, sur les différentes phases de la procédure méthodologique, sur les contraintes d'utilisation et méthodologiques et sur les particularités à considérer, etc. ont été collectées. Le tableau de comparaisons des méthodes peut être consulté en annexe (Annexe 8.1).

Une liste des principaux instruments de mesure et du matériel jugés les plus importants et nécessaires à la réalisation de chaque méthode a été établie (liste non exhaustive). Les tarifs en vigueur pour le matériel d'intérêt ont été listés afin de pouvoir estimer et comparer le coût matériel des différentes méthodes (Annexe 8.2).

## 3. Résultats

Les informations ci-dessous proviennent de la revue bibliographique effectuée sur les principaux programmes de surveillance et de recherche utilisant des paramètres biologiques en Europe et en Suisse (chapitre 3.1). Les données brutes recueillies sur les paramètres biologiques employés dans ces programmes et les méthodes utilisées pour leur évaluation ont été saisies dans un tableau Excel (Annexe 8.1), afin de regrouper l'information et de pouvoir faire des comparaisons. Les informations collectées ont été utilisées pour la rédaction de ce chapitre.

### 3.1 Paramètres biologiques à travers le monde

La recherche de littérature montre que les paramètres biologiques sont utilisés depuis plusieurs années déjà dans une optique de mesure et de surveillance de la qualité des sols, ainsi que pour l'évaluation de la biodiversité et du fonctionnement de l'écosystème. Ces indicateurs biologiques viennent compléter et renforcer les outils physico-chimiques déjà disponibles pour ce faire. L'intégration de mesures biologiques dans des programmes d'observation et réseaux de mesures de la qualité des sols s'observe tant au niveau national qu'international. Elle s'insère également à l'échelle de programmes de recherche suisse et européens. Le Tableau 1 (chapitre 3.1.4) liste les principaux programmes et réseaux de mesures intégrant des paramètres biologiques pour la surveillance et la mesure de la qualité des sols et de la biodiversité. Le Tableau répertorie également les indicateurs retenus pour la pédofaune et processus fonctionnels. Les indicateurs microbiens n'y sont pas intégrés.

On peut citer le projet **ENVASSO** (ENVironmental ASsessment of Soil for mOnitoring; 2006–2008) dont l'objectif principal a été de définir et de documenter un système de surveillance des sols visant à protéger les sols en Europe. Afin d'examiner la menace du déclin de la biodiversité de sols, deux aspects clés ont été pris en compte, soit la «diversité des espèces» et les «fonctions biologiques» du sol. Les organismes sélectionnés pour l'aspect «diversité» et ciblant la pédofaune sont les vers de terre et la macrofaune totale, les enchytréides, acariens et collemboles pour la mésofaune, et les nématodes et protistes pour la microfaune. Concer-

#### ENVASSO – Indicateurs pédofaune

- \_ Vers de terre (diversité, abondance et biomasse) \* (*enchytréides si vers de terre absent*)
- \_ Macrofaune totale
- \_ Collemboles (diversité et abondance) \*
- \_ Acariens
- \_ Nématodes
- \_ Protistes
- \_ Activité biologique (Litter Bag, Bait Lamina)

(\* indicateurs inclus dans le set de paramètres biologiques minimums recommandés)

#### 3.1.1 Programmes européens

Plusieurs programmes de recherche européens se sont intéressés, ces 15 dernières années, aux paramètres biologiques et à la biodiversité des sols.

nant l'aspect «fonctions biologiques», des indicateurs permettant des mesures d'activité telle que l'activité alimentaire (p.ex. Bait Lamina) ont été retenus (Tableau 1). Un set minimum de bioindicateurs est recommandé. Concernant la pédofaune, il comprend les vers de terre (diversité, abondance et biomasse) et les collemboles (diversité et abondance). Les enchytréides sont utilisés en remplacement des vers de terre si ces derniers sont absents (les vers de terres sont souvent rares ou même absents dans les sols acides et gorgés d'eau où ils sont remplacés par des enchytréides).

L'aspect «fonctions biologiques» pour la pédofaune n'est pas retenu dans le set minimum (Huber et al., 2008 ; Micheli et al., 2008). Le set d'indicateurs minimum a été testé dans six régions pilotes réparties dans 5 pays (Allemagne, France, Hongrie, Irlande et Portugal). Les régions pilotes couvraient des surfaces allant de 2.7 km<sup>2</sup> à un peu moins de 70 000 km<sup>2</sup> (Arrouays et al., 2008).

Le projet **EcoFINDERS** (Ecological Function and Biodiversity Indicators in European Soils ; 2011 – 2014) est un autre exemple de projet européen dont le but a été de fournir les outils nécessaires pour concevoir et mettre en œuvre des stratégies d'utilisation durable des sols. Ce programme de recherche a, entre autres, visé à caractériser la biodiversité des sols européens et à déterminer les relations entre la diversité des organismes du sol, le fonctionnement du sol et les services écosystémiques rendus (<http://esdac.jrc.ec.europa.eu/projects/ecofinders>). Des indicateurs biologiques des sols pertinents et rentables pour la surveillance de la biodiversité et de la fonction des écosystèmes en Europe ont été sélectionnés. Au final, 18 indicateurs ont été retenus parmi environ 200 méthodes biologiques répertoriées au départ. Les indicateurs biologiques considérés se sont concentrés sur les caractéristiques microbiennes, faunistiques et fonctionnelles intégrant des approches morphologiques aussi bien que des approches moléculaires ou des mesures basées sur les processus (biologiques) du sol. Ils ont été testés sur six sites expérimentaux en Europe (Allemagne (2 sites), France, Slovénie, Portugal et Royaume-Unis) (Griffiths et al., 2016 ; Stone et al., 2016). Les indicateurs sélectionnés par le projet EcoFINDERS concernant la pédofaune et la mesure d'activité biologique sont listés dans le Tableau 1 (chapitre 3.1.4).

Toujours à l'échelle européenne, le projet **LUCAS** (Land Use/Cover Area frame statistical Survey) est une enquête approfondie et régulière de la couche arable menée dans toute l'Union européenne pour obtenir des statistiques pertinentes pour les politiques sur l'effet de la gestion des terres sur les caractéristiques des sols. Environ 45 000 échantillons de sol ont été collectés à partir de deux périodes, 2009 – 2012 et 2015, ciblant spécifiquement les propriétés physicochimiques. Les données et les résultats dérivés (cartes des sols européens) sont en libre accès sur le site Web du Centre européen de données sur les sols (ESDAC ; <https://esdac.jrc.ec.europa.eu/>). Lors de l'enquête LUCAS 2018, de nouveaux paramètres tels que la biodiversité des sols, ont été considérés. Cette dernière a été évaluée sur 1000 sites à travers l'Europe par des méthodes de metabarcoding de l'ADN pour plusieurs groupes d'organismes : bactéries et archées (ADNr 16S), champignons (internal transcribed spacer, (ITS)), eucaryotes (ADNr 18S), nématodes (p. ex. next generation sequencing (NGS)), arthropodes de la mésofaune (p. ex. gene cox1) et vers de terre (p. ex. ADN mitochondrial). La méthodologie utilisée pour analyser les trois premiers groupes cibles d'organismes du sol est bien établie. À l'inverse, des limites techniques, par exemple, la nécessité d'extraire l'ADN d'une grande quantité de sol pour améliorer la détectabilité des espèces, se posent quant à la manière la plus appropriée d'explorer les autres groupes d'organismes du sol. Le sujet a donc été ouvert à discussion pour les experts du domaine afin de débattre des meilleures stratégies possibles pour la prise d'empreintes génétiques à grande échelle d'organismes du sol autres que les micro-organismes et les eucaryotes 18S (Orgiazzi et al., 2018). Les résultats de l'enquête 2018 ne sont pas encore publiés.

### 3.1.2 Programmes nationaux

En **Allemagne**, certains Bundesländer intègrent des paramètres biologiques dans leur programme de suivi des sites à long terme (**Bodendauerbeobachtungsflächen** (BDF)). Les vers de terre et autres annélides (p.ex. les enchytréides) font partie des paramètres biologiques les plus souvent mesurés pour les invertébrés du sol. Quelques Länder consi-



dèrent également les collemboles et les nématodes. Il n'y a cependant pas encore d'approche uniforme au niveau national. Les paramètres biologiques pour la pédofaune n'étant pas mesurés systématiquement dans tous les Länder ou seulement à intervalles irréguliers. Des propositions pour une meilleure cohérence des paramètres de mesures ont été faites (Römbke et al., 2012). A titre d'exemple, le Land du **Schleswig-Holstein** (BDF SH) réalise un suivi des vers de terre et autres annélides (enchytréides) tous les 6 ans sur ses 37 sites de surveillance à long terme (Klüver et al., 2020 ; [www.schleswig-holstein.de/DE/Fachinhalte/B/boden/bodenDauerbeobachtung.html](http://www.schleswig-holstein.de/DE/Fachinhalte/B/boden/bodenDauerbeobachtung.html)). Le Land Bade-Wurtemberg (BDF BW) a quant à lui mis en place un programme de surveillance des communautés de collemboles, depuis plus de 30 ans, sur 57 sites forestiers d'observation à long terme (Balkenhol & Russell, 2007).

De nouveau en Allemagne, le projet **MonViA** toujours en cours, a pour but la surveillance à l'échelle nationale de la biodiversité des terres agricoles («Monitoring der biologischen Vielfalt in Agrarlandschaften»). Établi sur mandat du Ministère Fédéral de l'Alimentation et de l'Agriculture (Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft, BMEL), le projet intègre la faune du sol et plus spécifiquement, le développement d'un concept de surveillance des effets des mesures culturales sur la diversité et la fonction des communautés de vers de terre (<http://www.agrarmonitoring-monvia.de>).

Le Musée d'Histoire naturelle Senckenberg à Görlitz en Allemagne et des partenaires ont développé «Edaphobase», une infrastructure de stockage de données en libre accès qui combine des données provenant de sources hétérogènes (littérature scientifique, collections de musées, données brutes de projet, etc.) sur les organismes du sol (nématodes, collemboles, acariens, chilopodes, diplopodes, isopodes, enchytréides, and vers de terre), sur leur distribution et les paramètres d'habitat de leurs sites d'occurrence à travers le monde (cartes) (<https://portal.edaphobase.org>).

La **France** a mis en place, ces dernières années, plusieurs programmes pour renseigner sur l'état du sol, ses propriétés et ses fonctions. Le programme du **Réseau de Mesures de Qualité des**

**Sols (RMQS)**, financé en partie par l'Agence de la transition écologique (ADEME), a pour objectif l'évaluation et le suivi à long terme de la qualité des sols de France depuis les années 2000. Des observations et des mesures physiques, chimiques et biologiques des sols y sont effectuées tous les 15 ans sur l'ensemble du territoire français (2240 sites au total) selon un maillage de 16 km<sup>2</sup>. Ces mesures ont permis la mise en place de référentiels et la cartographie d'un grand nombre des données physico-chimiques, pédologiques et biologiques. Pour la pédofaune, les mesures biologiques se sont concentrées sur l'observation des lombriciens et des macroinvertébrés totaux pour la macrofaune endogée (p. ex. oligochètes, isopodes, diplopodes, chilopodes, arachnides, gastéropodes, coléoptères (larves et adultes), isoptères, hyménoptères, lépidoptères (larves), diptères (larves), etc. (ISO 23611-5, 2011)), des collemboles et acariens pour la mésofaune et des nématodes pour la microfaune. Les observations ont été faites pour les sites RMQS de la région Bretagne (RMQS BioDiv), soit 109 sites au total (<https://www.gissol.fr/le-gis/programmes/rmq-34> et [https://ecobiosoil.univ-rennes1.fr/page/programme-rmq-biodiv#Sites\\_RMQS\\_Bio-Div](https://ecobiosoil.univ-rennes1.fr/page/programme-rmq-biodiv#Sites_RMQS_Bio-Div)). Actuellement, une étude de faisabilité et un projet pilote sont en cours (2020 – 2021) pour étudier plus spécifiquement les possibilités de mise en place d'un réseau de surveillance de la biodiversité (**RMQS-Biodiversité ou réseau de mesure de la biodiversité du sol (RMBS)**) à l'échelle du pays et s'appuyant sur le réseau RMQS déjà en place. Pour l'étude de la pédofaune, les protistes, les nématodes, la mésofaune et la macrofaune endogée et de surface (collemboles, acariens, coléoptères, vers de terre, etc.) ainsi que l'ADN environnemental sont proposés dans le projet.

Le programme français **ADEME Bioindicateurs II**, qui s'est déroulé de 2009 à 2012, a eu pour but le développement et la validation d'indicateurs biologiques pour surveiller la qualité des sols afin de compléter les outils physico-chimiques déjà disponibles (<https://ecobiosoil.univ-rennes1.fr/ADEME-Bioindicateur/index.php>; Bispo et al., 2009). Pour la pédofaune, les vers de terre, la macrofaune totale, et les nématodes ont été retenus. A noter que les escargots font également partie du set de bioindicateurs proposés pour la pédofaune, mais permettent d'évaluer les risques écologiques de contamination des sols (bioindicateurs d'accumulation).

Pour la France, on peut encore citer le projet CASDAR **AgrInnov** (2012 – 2015) (Ranjard, 2011), suivi par le REVA (réseau d'expérimentation et de veille à l'innovation agricole ; <https://www.ofsv.org/le-reva>) qui visent entre autres à fournir des indicateurs biologiques pour la mesure de la qualité des sols agricoles. Les indicateurs de faune du sol retenus sont les vers de terre et les nématodes. Les Litter Bags ont été utilisés pour les mesures fonctionnelles (dégradation de la matière organique).

Les **Pays-Bas** ont également mis en place un réseau de surveillance des sols à l'échelle nationale (the Netherlands Soil Monitoring Network (NSMN)) comprenant plus de 300 sites d'observation, combinant une vingtaine de catégories d'utilisation du sol et types de sols différents et représentant environ 75 % de la superficie totale du pays (sans maillage). Les paramètres biologiques, «**Biological Indicator System for Soil Quality (BISQ)**», y sont intégrés depuis 1997. Le BISQ cherche à faire le lien entre la biodiversité et le fonctionnement du sol, plus précisément entre les plus importantes fonctions du maintien de la vie (dégradation de la matière organique, cycle des nutriments, etc.) les processus écologiques (fragmentation, minéralisation du carbone et de l'azote) et les principaux groupes d'organismes du sol qui y sont liés. Les grands groupes trophiques observés pour la pédofaune sont les vers de terre, les enchytréides, les microarthropodes (collembolles et acariens) et les nématodes (Rutgers et al., 2008 ; Rutgers et al., 2009).

Le **Royaume-Uni** possède également un programme de surveillance national, le «**Countryside Survey**», intégrant l'observation des sols et comprenant des cartes d'occupation du sol et des enquêtes de terrains. Le programme vise à surveiller l'état des sols et à protéger cette ressource. Le programme est en cours depuis 1978 et comprend 629 sites d'un km<sup>2</sup> de surface, répartis sur l'ensemble du territoire (échantillonnage aléatoire stratifié). Les observations sont répétées tous les 10 ans. Pour la pédofaune, la diversité des invertébrés du sol et plus particulièrement les collembolles et acariens est mesurée (<https://countrysidesurvey.org.uk/>; Emmett et al., 2010). L'Observatoire britannique des sols (UK soil observatory) fournit des cartes montrant les paramètres biologiques du sol sur la base des données du Countryside Survey et extrapolées à l'aide de la cartographie de la couverture du sol (<http://www.ukso.org/>).

### 3.1.3 Programmes suisses

Pour la **Suisse**, c'est l'**Observatoire National des Sols (NABO)** qui se consacre à la surveillance de la qualité des sols et en évalue les propriétés chimiques, physiques et biologiques. Trente sites (10 sites en terres arables, 10 sites de prairies, 10 sites forestiers) de mesures sont dédiés à l'observation de la biologie des sols (NABObio) mais se concentrent actuellement sur la mesure des paramètres microbiens. Le programme de surveillance cantonale des sols (**KABObio**) du **canton de Berne** en revanche inclut des indicateurs biologiques pour la pédofaune. En effet, les vers de terre y sont observés tous les 5 à 8 ans pour 19 sites du canton (communication personnelle Claudia Maurer, Office de l'agriculture et de la nature du canton de Berne).

Plusieurs **projets de recherche scientifiques** sont en cours pour étudier la diversité et les fonctions des communautés de la pédofaune pour l'écosystème sol. Les paramètres biologiques concernés sont:

- Les vers de terre, avec Claire Le Bayon, Professeure titulaire au Laboratoire d'écologie fonctionnelle de l'université de Neuchâtel (UniNE),
- Les microarthropodes (collembolles, acariens, etc.) avec le Dr. Jürg Enkerli du Groupe de recherche d'écologie moléculaire à l'Agroscope,
- Les nématodes, avec le Dr. Beat Frey, Directeur de l'Unité de recherche sur les Processus rhizosphériques à l'Institut fédéral de recherches sur la forêt, la neige et le paysage (WSL),
- Les protistes, avec le Professeur Thierry Heger du Groupe Science du sol et environnement de la Haute école de viticulture et œnologie de Changins (HES-SO Changins) et le Professeur Edward Mitchell du Laboratoire de Biodiversité du sol à l'Université de Neuchâtel (UniNE),
- Les méthodes fonctionnelles comme le test Tea Bag (Andreas Fliessbach, FiBL) ou le test Bait Lamina (Campiche et al., 2015) ont été ou sont encore utilisées dans plusieurs programmes de recherche en Suisse.

### 3.1.4 Résumé

Pays & Programmes utilisant des paramètres biologiques	Nb. de sites évalués	Maillage	Vers de terre	Enchytréides	Collemboles	Acariens	Nématodes	Protistes	Macrofaune	Bait Lamina	Litter Bag	Tea Bag	Bande de coton
<b>Europe</b>													
ENVASSO	6 régions pilotes (5 pays)	non	x	x <sup>1</sup>	x	(x)	(x)	(x)	(x)	(x)	(x)		
ECOFINDERS	6 sites (6 pays)	non	x	x	x	x	x	(x)		x			
LUCAS 2018 2	1000	non	x		x <sup>3</sup>	x <sup>3</sup>	x						
<b>Suisse</b>													
FaBo Berne	19	non	x										
Autres projets de recherche			x	(x)	x	x	x	x		x <sup>4</sup>			(x)
<b>Allemagne</b>													
BDF Schleswig- Holstein (SH)	37	non	x	x									
BDF Bade-Wurtemberg (BW)	57	non			x								
<b>France</b>													
BIOINDICATEURS II	47	non	x	x	x	x			x <sup>5</sup>				
RMQS BioDiv	109	16 km <sup>2</sup>	x	x	x	x			x <sup>5</sup>				
RMBS <sup>2</sup>	n.d.	n.d.	x	x	x	x	x	x					x
AgrINNOV	248	non	x				x				x		
<b>Pays-Bas</b>													
BISQ	300	non	x	x	x	x	x						
<b>Royaume-Uni</b>													
Countryside Survey	629	Échantillonnage aléatoire stratifié			x	x			x <sup>5</sup>				

Tableau 1 : Principaux programmes de surveillance et de recherche utilisant des paramètres biologiques en Suisse et en Europe et organismes du sol impliqués.

x paramètres biologiques inclus dans le set minimum recommandé ou faisant l'objet de projets de recherche nationaux en cours pour la Suisse.

(x) paramètres biologiques considérés mais non inclus dans le set minimum d'indicateurs testés/recommandés, ou paramètres biologiques ayant fait l'objet de projets de recherche en Suisse par le passé.

n.d information non disponible.

<sup>1</sup> Les enchytréides sont considérés si les vers de terre sont absents (p.ex. dans certaines forêts).

<sup>2</sup> Projets récents toujours en cours et dont les résultats ou informations détaillées relatives au projet ne sont pas encore disponibles.

<sup>3</sup> L'enquête LUCAS 2018 utilise le terme général «arthropodes de la mésofaune» pour définir les groupes d'organismes utilisés pour l'analyse de la biodiversité des sols. Dans la table, ces derniers sont référés sous les collemboles et les acariens.

<sup>4</sup> Les Bait Lamina sont actuellement utilisés dans plusieurs petits projets de recherche en Suisse, p.ex. à la HAFL à Zollikofen (littérature grise).

<sup>5</sup> Macrofaune endogée uniquement.

Les vers de terre sont les indicateurs le plus souvent utilisés dans les programmes de surveillance et de recherche listés ci-dessus, soit dans 11 programmes sur les 13 considérés. Viennent ensuite les collemboles (10/13), les acariens et nématodes (9/13). La macrofaune, les enchytréides, les protistes et les méthodes fonctionnelles sont utilisés dans 5 ou moins de 5 des programmes répertoriés.

Des informations utiles pour évaluer la pertinence de ces paramètres biologiques (organismes et méthodes d'évaluation associées) et permettant d'examiner la faisabilité de leur mise en œuvre pour une cartographie complète des sols en Suisse sont données ci-dessous. Les organismes les plus utili-

sés dans les programmes de surveillance et de recherche, soit les vers de terre, les collemboles, les acariens et les nématodes, ainsi que les protistes et certaines méthodes fonctionnelles seront discutés en priorité. Leur importance pour une cartographie des sols est débattue dans le chapitre discussion (chapitre 4).

Les programmes LUCAS 2018 et RMBS sont toujours en cours. Par conséquent, à l'heure actuelle, il n'a malheureusement pas été possible de trouver et de reporter des informations pertinentes et détaillées sur les méthodologies utilisées pour l'analyse des paramètres biologiques relatifs à ces deux projets.

## 3.2 Vers de terre

Les vers de terre (Annelida, Oligochaeta) font partie de la macrofaune et sont considérés comme les ingénieurs des travaux du sol. Ils jouent un rôle essentiel entre autres dans la décomposition des débris végétaux morts, l'augmentation des teneurs en matière organique et la concentration des éléments nutritifs, l'amélioration de la stabilité des agrégats, l'aération du sol, la stimulation de l'activité microbienne pour ne citer que quelques exemples. Une quarantaine d'espèces sont répertoriées en Suisse. Celles-ci peuvent être classées

en trois groupes écologiques (les épigés, les endogés et les anéciques) en fonction de leur emplacement dans le sol, de leur comportement et de leur choix de nourriture (Figure 3). L'importance des vers de terre pour le fonctionnement du sol est fortement liée à ces différences (Rutgers et al., 2008 ; Pfiffner, 2013). De par ces caractéristiques, les vers de terre sont très fréquemment utilisés comme indicateurs biologiques pour la surveillance et la mesure de la qualité du sol et pour l'évaluation de la biodiversité et du fonctionnement des sols.



Figure 3 : Ver(s) de terre endogés (à gauche) et anécique (à droite). Photos : L. Pfiffner, FiBL

### 3.2.1 Méthodes répertoriées

Les méthodes répertoriées pour l'étude des vers de terre sont aux nombres de cinq et sont celles employées dans les programmes de surveillance et de recherche européens, internationaux et nationaux définis au chapitre 3.1. Elles sont listées ci-dessous (Tableau 2).

La méthodologie de base est la même pour les cinq méthodes identifiées mais quelques variations sont constatées au sein des différentes étapes de la procédure. Le principe méthodologique général et les disparités méthodologiques sont définis dans les deux chapitres suivants.

Méthodes répertoriées	Programmes de surveillance ou de recherche
ISO 23611-1 <sup>1</sup>	ENVASSO ; EcoFINDERS ; BDF SH
ADEME <sup>2,3</sup>	Bioindicateurs II ; RMQS BioDiv
Cube à la bêche <sup>4</sup>	BISQ ; AgrINNOV
Agroscope <sup>5</sup>	KABObio Berne
UniNE <sup>6</sup>	Recherche suisse (UniNE)

Tableau 2 : Méthodes répertoriées pour l'évaluation des vers de terre et programmes de surveillance et de recherche les utilisant.

#### Références :

- <sup>1</sup> ISO 23611-1:2018. *Soil quality – Sampling of soil invertebrates – Part 1: Hand-sorting and extraction of earthworms.*
- <sup>2</sup> «Bioindicateurs II» (<https://ecobiosoil.univ-rennes1.fr/ADEME-Bioindicateur/index.php>) pour le programme ADEME Bioindicateurs II et Cluzeau et al. 2009 pour le programme ADEME RMQS BioDiv («Cahier des méthodes»).
- <sup>3</sup> Les méthodes ADEME des projets Bioindicateurs II et RMQS BioDiv sont des adaptations de Bouché 1972 et de la méthode ISO 23611-1.
- <sup>4</sup> Rutgers et al., 2009 pour le programme BISQ et Ranjard, 2011 pour le programme AgrINNOV.
- <sup>5</sup> Méthodes de référence Agroscope B-RW-E, B-RW-H, B-RW-B (Agroscope, 2015)
- <sup>6</sup> Littérature grise (protocole) et communication personnelle Claire Le Bayon, UniNE





Figure 4 : Principe méthodologique de base pour l'étude des vers de terre.

### 3.2.2 Principe méthodologique de base

#### Analyses morphologiques

La méthodologie pour étudier les vers de terre consiste en 2 phases principales (Figure 4):

1. Le prélèvement sur le terrain : les vers de terre sont extraits du sol à l'aide d'un extractant chimique (les vers adoptent un comportement de fuite en réponse aux propriétés irritantes de la solution déversée dans le sol) et/ou par tri manuel sur un bloc de sol, pour une surface déterminée.
2. L'analyse morphologique, afin de dénombrer et d'identifier les vers de terre.

#### Analyses moléculaires

La méthodologie actuelle pour étudier des vers de terre utilise principalement l'analyse morphologique pour l'identification des vers. Cependant, le potentiel des techniques d'identification par analyse moléculaire (barcoding ou metabarcoding d'ADN) est sujet à une considération croissante (projet LUCAS 2018 mais également déjà considéré dans le projet EcoFinders). Pour ce type d'identification, les vers de terre prélevés sur le terrain sont caractérisés génétiquement à partir d'une courte séquence d'ADN spécifique. Le barcoding et metabarcoding ont comme avantage de mieux appréhender la diversité des espèces présentes (meilleure discrimination des espèces, identification des juvéniles,...), mais également d'investiguer la part de la biodiversité des vers de terre encore inconnue (identification de nouveaux taxons) (Decaens et al., 2013). Ces techniques ne sont pas encore franchement établies comme méthode d'analyse et les données de référence pour l'identification ainsi que les données pour constituer un référentiel de base doivent encore être complétées. Cependant, son potentiel de développement est grand et mérite d'être pris en considération.

D'autres essais se sont intéressés à identifier les communautés de vers de terre à partir d'échantillons de sol (metabarcoding d'ADN environnemental (ADNe), échantillonner directement le sol et ne pas d'organismes) (Bienert et al., 2012 ; Pansu et al., 2015 ; Rota et al., 2020). Ici également, la technique est encore dans sa phase de développement. C'est par exemple une des méthodes envisagées dans le projet RMBS.

### 3.2.3 Différences méthodologiques

Les divergences méthodologiques entre les différentes méthodes apparaissent surtout pour la phase de prélèvement (phase 1) et concernent principalement :

- La surface de prélèvement, avec des variations allant de 0.125 à 1 m<sup>2</sup>.
- Le type d'extractant chimique utilisé : formaldéhyde ou dérivés de la moutarde (farine de graines de moutarde, moutarde condimentaire forte, isothiocyanate d'allyle (AITC ; un glucosinolate correspondant à l'huile volatile de moutarde), jus d'oignons), qui sont des irritants pour les vers de terre, et le nombre d'arrosages recommandés avec la solution irritante.
- Les dimensions du bloc de sol extrait à la bêche pour le tri manuel des vers de terre.
- L'ordre de la procédure d'extraction : extraction chimique suivie de l'extraction manuelle, ou inversement. Dans certains cas, uniquement l'extraction manuelle est réalisée (tri manuel sur «cube à la bêche»), sans extraction chimique (programme BISQ et AgrInnov).
- Le liquide utilisé pour la fixation et la conservation des vers de terre.
- Le nombre de prélèvements recommandés par sites.



Les principales différences sont définies plus en détail dans la table ci-dessous (Tableau 3).

Plus d'informations et de précisions sur les différentes méthodes pour les vers de terre sont également disponibles dans le fichier Excel synthétisant les méthodes biologiques en annexe (Annexe 8.1).

Méthode	Surface de prélèvement	Extractant (Extraction chimique)	Bloc de sol (cm) (Tri manuel <sup>2</sup> )	Liquide de conservation	Nb. de prélèvement par site
<b>ISO 23611-1<sup>1</sup></b>					
1 <sup>ère</sup> édition 2006	0.25 m <sup>2</sup>	Formaldéhyde	50 x 50 x 20	Ethanol 70%	n.s.
2 <sup>e</sup> édition 2018	0.25 m <sup>2</sup>	AITC	50 x 50 x 20	Ethanol 70%	n.s.
<i>Alternatives</i>	0.125 m <sup>2</sup> ou 1 m <sup>2</sup>	<i>Farine de moutarde, méthode électrique (Octet method) <sup>3</sup></i>		<i>Solution formolée 4%</i>	
<b>ADEME</b>					
BioindicateursII	1 m <sup>2</sup>	Formaldéhyde	25 x 25 x 20	Solution formolée	3 à 4
RMQS BioDiv	1 m <sup>2</sup>	Formaldéhyde	25 x 25 x 25	Solution formolée	3 à 4
<b>Cube à la bêche</b>					
BISQ	/	/	20 x 20 x 20	n.s.	3 * 6
AgriInnov	/	/	20 x 20 x 25	Alcool	6
<b>Agroscope (Méthodes de référence Agroscope)</b>					
	0.25 m <sup>2</sup>	Formaldéhyde	50 x 25 x 20		6 à 10
<i>Alternatives</i>		<i>Farine de moutarde</i>			
<b>UniNE</b>					
	1 m <sup>2</sup>	Farine de moutarde	25 x 25 x 20	Ethanol 70% ou Solution formolée 4%	3 à 5
<i>Alternatives</i>		<i>Jus d'oignons (Singh et al., 2018)</i>			

Tableau 3 : Principales divergences méthodologiques répertoriées pour les méthodes vers de terre.

n.s. = non spécifié

<sup>1</sup> La méthode ISO 23611-1 a été rééditée en 2018 (2<sup>e</sup> édition) et remplace le formaldéhyde, utilisé comme extractant chimique dans la première édition de 2006, par l'AITC, un dérivé de la moutarde.

<sup>2</sup> La méthode ISO est la seule à procéder à l'extraction manuelle avant l'extraction chimique, ce qui n'est pas le cas des autres méthodes utilisant les 2 modes d'extraction. Cependant, dans certains cas, elle recommande uniquement l'un des 2 modes d'extraction.

<sup>3</sup> La méthode électrique utilise un anneau (diamètre: 52 cm) comprenant 8 électrodes à insérer dans le sol et qui génère un champ électrique par lequel les vers sont chassés du sol. Les avantages de cette méthode sont qu'elle ne nécessite aucune utilisation de produits chimiques, ne nécessite pas d'eau et est moins laborieuse et plus rapide que les autres méthodes. Les désavantages comprennent la lourdeur et le prix élevé de l'équipement. Plus important encore, le taux de réussite de cette méthode semble dépendre assez fortement des conditions du sol (en particulier de la teneur en eau). Diverses comparaisons méthodologiques n'ont pas montré d'avantages évidents de la méthode d'extraction électrique par rapport aux méthodes d'extraction chimiques (ISO 23611-1, 2018).

A noter que la norme ISO apparaît comme plus polyvalente que les autres méthodes répertoriées. Elle laisse une certaine liberté de choix des variables méthodologiques (p.ex. différentes surfaces de prélèvement possibles, procédure d'extraction combinant l'extraction manuelle et chimique ou recommandant uniquement l'une des deux extractions, différents types d'extractants (AITC ou farine de moutarde), etc.) en fonction du but de recherche et de la région géographique, du type d'utilisation du sol et du type de sol considéré (voir fichier Excel synthétisant les méthodes biologiques en annexe 8.1 pour des précisions). D'un autre côté, cette flexibilité peut rendre difficile la comparaison des résultats et l'établissement d'un référentiel. Les différentes variables méthodologiques doivent être discutées et clairement définies avant la mise en place d'un programme de surveillance ou de recherche se basant sur la méthode ISO et ce en fonction des buts visés.

### 3.2.4 Points à considérer

Quelques considérations additionnelles sont à prendre en compte concernant les variables méthodologiques listées ci-dessus, à savoir :

- *Surface de prélèvement* : de petites surfaces de prélèvements (p. ex. 0.25 m<sup>2</sup>) sont plutôt adaptées lorsque l'on s'attend à collecter un grand nombre de vers de terre (prairie en région tempérée par exemple) (ISO 23611-1, 2018).
- *Toxicité du formaldéhyde* : le formaldéhyde a été l'extractant chimique recommandé et utilisé par la plupart des méthodes jusqu'à peu. Cependant, depuis 2018, la méthode ISO n'utilise plus le formaldéhyde au vu de sa toxicité. Il a été remplacé par l'AITC. En effet, le formaldéhyde présente une toxicité humaine et environnementale. Pour l'homme, c'est un irritant des yeux, du nez et de la gorge et il est classé comme substance cancérogène avérée par le Centre international de recherche sur le cancer (CIRC) (IARC, 2006) depuis 2004 et comme probablement cancérogène (catégorie 1b) par la Commission européenne depuis 2014 (Règlement (UE) n°605/2014). Son utilisation présente donc un risque et des précautions appropriées doivent être prises pour éviter un contact par inhalation ou cutané. Pour l'environnement, des effets négatifs ont été reportés pour les microorganismes du sol, la mésofaune et les plantes (ISO 23611-1, 2018). L'AITC est avant tout un irritant pour la peau et les yeux. Il nécessite un matériel de protection adapté (gants, lunettes et habits de protection).
- *Efficacité des extractants chimiques* : l'efficacité d'extraction des vers de terre est jugée équivalente entre le formaldéhyde et l'AITC en termes de biomasse et du nombre d'individus extraits, et ce quel que soit le type de sites échantillonnés (Pelosi et al., 2009 ; Singh et al., 2015 ; ISO 23611-1, 2018 ; Singh et al., 2018). Cela semble donc garantir l'interchangeabilité des deux méthodes d'extraction. La méthode d'extraction employant la moutarde condimentaire forte (moutarde commerciale) est jugée moins efficace que l'AITC et le formaldéhyde en termes de densité (Pelosi et al. 2009). La farine de moutarde est spécialement efficace pour extraire les vers anéciques mais jugée moins appropriée lorsqu'une évaluation précise des communautés de vers de terre est requise (Singh et al., 2015). Selon Singh 2018, un extractant à base de jus d'oignons peut également être utilisé et serait tout aussi performant que les deux autres (AITC et formaldéhyde). La préparation de la solution à base de jus d'oignons peut cependant s'avérer laborieuse (communication personnelle Claire Le Bayon, UniNE).
- *Temps d'extraction* : les temps d'attentes pour l'extraction chimique varient légèrement en fonction des méthodes et des extractants utilisés. Ils se situent dans un laps de temps allant de 30 à 45 minutes (voir table Excel en Annexe 8.1 sur les méthodes pour des précisions).
- *Ordre des procédures d'extraction* : la méthode ISO est la seule à procéder au tri manuel des vers de terre avant de réaliser l'extraction chimique. Les autres méthodes (ADEME, Agroscope, UniNE) préconisent le processus inverse, soit l'extraction chimique avant le tri manuel ce qui semble mieux adapté aux sols tempérés (Cluzeau et al., 2009). De plus, il semble que les vers anéciques soient plus difficiles à capturer si

l'extraction manuelle est réalisée en premier lieu (communication personnelle Claire Le Bayon, UniNE).

- *Extraction manuelle uniquement* : les programmes BISQ et AgrInnov pratiquent l'extraction manuelle uniquement (cube à la bêche). Le nombre de vers de terre collectés dans ce cas est inférieur au nombre de vers de terre capturés avec la méthode utilisant les deux extractions combinées. Ce sont surtout les vers anéciques qui ne sont pas attrapés (communication personnelle Claire Le Bayon, UniNE et Claudia Maurer, Office de l'agriculture et de la nature du canton de Berne). En revanche, l'extraction utilisant le cube à la bêche est plus simple et plus courte à mettre en œuvre.
- *Choix du liquide de conservation*: une solution formolée 4% ou l'éthanol 70% sont les deux liquides de préservation recommandés pour conserver les vers de terre jusqu'à l'analyse et également après celle-ci si les échantillons doivent être archivés. Bien que plus toxique que l'éthanol, le formaldéhyde à l'avantage de préserver la couleur des vers, ce qui n'est pas le cas de l'éthanol. Le formaldéhyde facilite donc l'identification morphologique des vers de terre mais des mesures de protection adaptées doivent être prises en raison de sa toxicité et son utilisation sur le terrain est peu recommandée. L'alcool est moins toxique, ce qui est un avantage pour les manipulations sur le terrain. Dans le cas où des analyses de génétique moléculaire (barcoding et metabarcoding d'ADN par exemple) sont envisagées, l'éthanol (95%) est généralement conseillé comme liquide de conservation, parce que le formaldéhyde peut causer des lésions de l'ADN.
- *Nombre de prélèvements (réplicats)*: le nombre de réplicats réalisés par sites varie assez fortement pour une même méthode (p. ex. méthode Agroscope avec 6 à 10 réplicats) mais également entre celles-ci. En fonction du type de sol, il est recommandé par exemple de faire 6 réplicats en zone agricole plus uniforme alors que 10 réplicats sont suggérés pour les sites forestiers (Agroscope, 2015). En zone alluviale, 3 réplicats seulement sont acceptables (communi-

cation personnelle Claire Le Bayon, UniNE). Les ressources financières et temporelles à disposition pour réaliser l'analyse sont également à prendre en considération (voir chapitre 4.1.2).

### 3.2.5 Variables mesurées

Après le prélèvement des vers de terre sur le terrain, ces derniers sont dénombrés et identifiés sur la base de leur morphologie au laboratoire. En règle générale, les paramètres mesurés sont :

- L'abondance totale (nombre d'individus/m<sup>2</sup>) ; aussi possible, mais plus rare : abondance par m<sup>3</sup>
- La biomasse totale (g/m<sup>2</sup>) ; aussi possible, mais plus rare : biomasse par m<sup>3</sup>
- La richesse spécifique (nombre d'espèces)
- L'abondance par catégories écologiques (nombre d'individus/m<sup>2</sup> pour les anéciques, endogés et épigés) ou par groupes taxonomiques définis
- La structure de la population par âge (par ex. ratio adulte/juvénile)
- La diversité et équitabilité (importance relative des espèces ou des catégories écologiques)

Les quatre premiers paramètres (abondance, biomasse, richesse spécifique et abondance par catégories écologiques) sont les plus fréquemment mesurés parmi les cinq méthodes listées.

Moins fréquemment, on relève aussi (ISO 23611-1, 2018):

- Le coefficient de dominance (en pourcentage de la population, valeur statistique)
- Les altérations morphologiques chez les individus
- Le nombre et la biomasse de turricules en surface (nb/m<sup>2</sup> ou g/m<sup>2</sup>) (projets de recherche et communication personnelle Claire Le Bayon, UniNE ; Pfiffner, 2013)

Les résultats obtenus sont exprimés en abondance ou biomasse totale d'individus par prélèvement, c'est-à-dire comme la somme du nombre de vers de terre ou de leur masse obtenue lors de l'extrac-

tion chimique et de l'extraction manuelle (somme des 2 échantillons). Les résultats sont ensuite convertis en nombre d'individus ou biomasse pour 1 m<sup>2</sup>, en appliquant un facteur de correction en fonction de la surface de prélèvement échantillonnée (facteur de correction de 4 pour une surface de prélèvement de 0.25 m<sup>2</sup>, par exemple). Un facteur de correction peut également être appliqué pour corriger la perte de masse due à la solution de conservation et au contenu en particules de sol présentes dans le système digestif des verres (ISO 23611-1, 2018).

### 3.2.6 Contraintes d'utilisation

- *Saisonnalité* : en région tempérée, le prélèvement de vers de terre est optimal au printemps (sortie d'hiver) et à l'automne, saisons auxquelles les vers de terre sont les plus actifs. Le prélèvement est réalisé en général de fin mars à début mai pour le printemps et de mi-septembre à fin octobre/début novembre pour l'automne, en fonction de l'altitude et des conditions météorologiques. Il est préférable de travailler le matin, période à laquelle les vers de terre sont les plus actifs (communication personnelle Claire Le Bayon, UniNE).
- *Conditions climatiques* : éviter les conditions extrêmes : gel au sol/ températures du sol trop basses, fort ensoleillement/températures élevées (température de l'air minimale > 5°C avec un optimal à 10° ± 3°C) (Agroscope, 2015), conditions très sèches/faibles taux d'humidité du sol, qui induisent la diapause des vers de terre et ont une influence négative sur le nombre d'individus prélevés. Les extractions chimiques dans les sols gorgés d'eau doivent également être évitées, le liquide d'extraction ayant de la peine à pénétrer correctement.
- *Topographie* : la méthodologie utilisant l'extraction chimique est adaptée aux terrains plats et aux sols avec une pente légère à modérée. Elle n'est pas adaptée aux fortes pentes. En effet, les terrains en pente ou régions de montagne se prêtent difficilement à l'arrosage, en raison du ruissellement de la solution d'extraction (communication

personnelle Claire Le Bayon, UniNE et Claudia Maurer, Office de l'agriculture et de la nature du canton de Berne). Les conditions extrêmes, par exemple haute montagne et fortes pentes, sont donc à éviter.

- *Perturbations* : éviter les perturbations faites au sol (tassement) les jours précédents. Éviter les anomalies de surface (piétinement/ couloir de passage/empreinte de roues, bouses de vache, ...). Ne pas échantillonner directement après les récoltes ou les travaux agricoles (par exemple, attendre min. 24 h après la fauche ou fumure et 2 à 3 mois après le labour ou autre travail intensif du sol) (Agroscope, 2015).
- *Volume d'eau pour l'extraction chimique* : l'extraction chimique requiert de grands volumes d'eau, et ce quel que soit l'extractant utilisé (voir annexe 8.1). En effet, entre 10 et 30L d'eau sont requis pour chaque placette de prélèvement (réplica) selon la méthode employée, ce qui amène à des volumes d'eau finaux compris entre 60L et 100L par site en fonction du nombre de répliques choisies. De tels volumes d'eau peuvent représenter une difficulté pour les sites difficilement accessibles par voie motorisée (comme les sites de montagnes par exemple).
- *Farine de moutarde* : la dispersion de la farine de moutarde dans l'eau est laborieuse (suspension à faire plusieurs heures avant le prélèvement). De plus, la concentration en huile volatile peut varier selon la variété de graines de moutarde utilisées pour la farine, ce qui peut amener des différences du pouvoir d'extraction.
- *Formaldéhyde* : le formaldéhyde est très toxique et des précautions appropriées doivent être prises lors de son utilisation (matériel de protection adapté, hotte d'aspiration, etc.).

### 3.2.7 Ressources nécessaires

#### 3.2.7.1 Ressource temporelle et expertise requise

La ressource temporelle et l'expertise nécessaires sont estimées ci-dessous (Tableau 4). La ressource temporelle considère le temps requis par 1 personne pour effectuer le travail pour 1 réplicat (= 1 placette de prélèvement). Les temps de trajet pour se rendre sur le lieu d'étude ne sont pas pris en compte ici.

Au total, pour un site et pour réaliser la méthode dans son entier (prélèvement et analyses), il faudra donc compter environ 9h de temps de travail effectif si l'on considère que 3 réplicats par site sont requis.

Procédure pour 1 réplicat	Durée totale/durée effective <sup>1</sup>	Expertise
<b>Phase 1 – Prélèvement/extraction</b>		
<i>Extraction chimique</i>	30 – 45 minutes	+
<i>Tri manuel (Cube bêche)</i>	15 – 30 minutes	+
<b>TOTAL Prélèvement</b>	<b>~ 1 heure</b>	
<b>Phase 2 – Analyses morphologiques <sup>2</sup></b>		
<i>Abondance totale</i>	5 minutes	+
<i>Biomasse totale</i>	5 minutes	+
<i>Richesse spécifique</i>	90 minutes	++
<i>Abondance par cat. écologiques</i>	15 minutes	+(+)
<b>TOTAL Analyses</b>	<b>~ 2 heures</b>	
<b>TOTAL pour la méthode</b>	<b>~ 3 heures <sup>3</sup></b>	

Tableau 4 : Ressource temporelle et expertise requise pour l'étude des vers de terre (tâche effectuée par 1 personne pour 1 réplicat). Surface considérée pour l'extraction chimique : 0.25 m<sup>2</sup>, volume considéré pour le tri manuel : bloc de sol avec les dimensions 0.2 m x 0.2 m x 0.2 m.

*1 réplicat = 1 placette de prélèvement*

*+ = compétences de base; ++ = compétences avancées; +++ = spécialiste*

<sup>1</sup> *Pour les vers de terre, les différentes procédures ne comprennent pas de temps d'attente conséquent et le temps de travail total représente donc également le temps de travail effectif.*

<sup>2</sup> *Seuls les paramètres les plus fréquemment mesurés ont été pris en compte.*

<sup>3</sup> *entre 2h40 et 3h10*

### 3.2.7.2 Matériel et coûts estimés

- Matériel spécifique : aucun matériel spécifique n'est requis pour l'étude des vers de terre excepté une loupe binoculaire (prix moyen 700 CHF) pour l'identification morphologique et une balance de précision pour la mesure de la biomasse (prix moyen 130 CHF) ainsi que du petit matériel de terrain et de laboratoire (thermomètre, tamis...).
- Consommables : les consommables principaux sont l'extractant choisi pour prélever les vers de terre (AITC, formaldéhyde, farine de moutarde, ou jus d'oignon), le matériel pour procéder à l'extraction (estagnons, arrosoirs, cadre métallique) et les récipients (flacons plastiques) et liquide de préservation (formaldéhyde ou éthanol) pour conserver les vers de terre.

Les coûts suivants sont estimés :

Vers de terre (analyse morphologique)	Prix moyen CHF
Coûts d'investissement	1300.00
Consommables (1 réplicat ; utilisation de l'AITC comme extractant)	7.50

Tableau 5 : Coûts estimés pour l'investissement matériel et les consommables pour les vers de terre.

A noter que la comparaison des coûts estimés pour les 3 extractants montre que l'AITC est le moins cher (coûts calculés en fonction de la quantité de substance nécessaire pour 10L de solution) :

AITC (1g; 0.13 CHF) < formaldéhyde (25ml; 0.19 CHF) < farine de moutarde (120g; 1.20 CHF)

Les détails des coûts, fournisseurs et équipement matériel (p.x. stéréomicroscope) se trouvent en annexe (Annexe 8.2).

### 3.2.8 Résumé de la méthodologie verre de terre

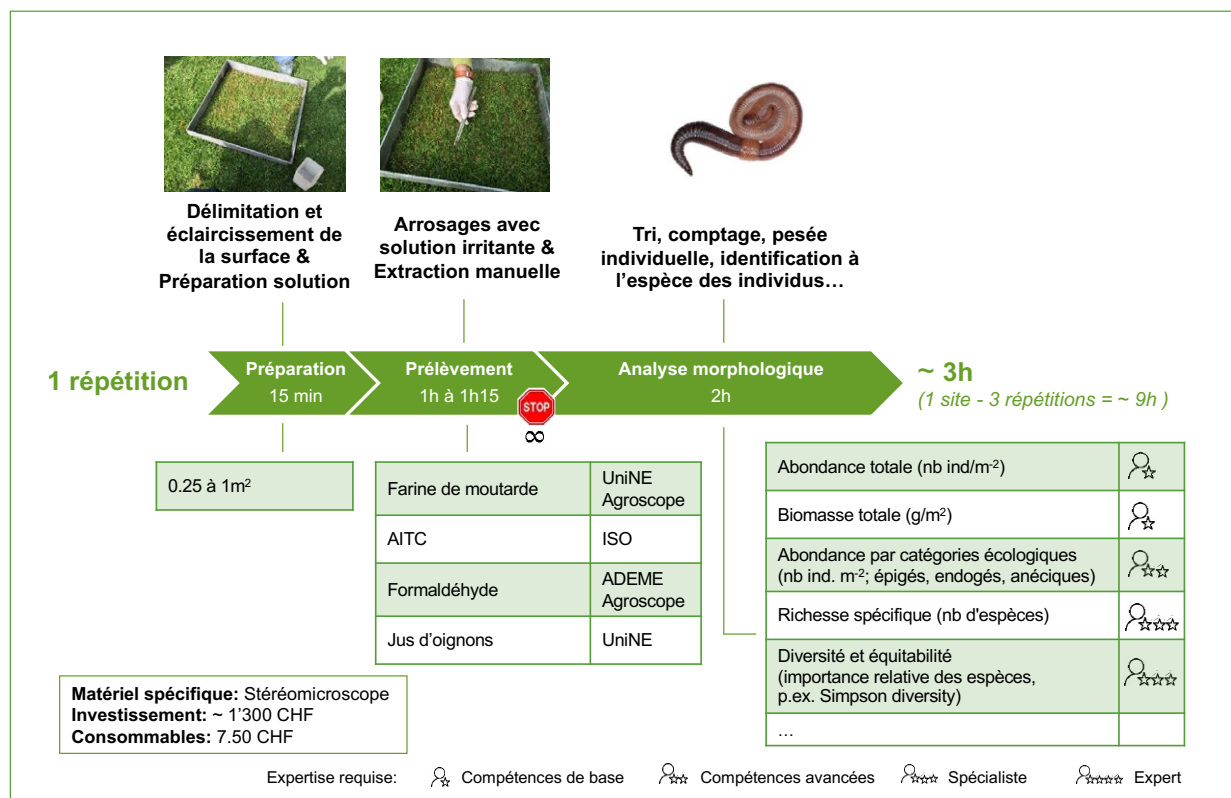


Figure 5 : Résumé des procédures méthodologiques pour les vers de terre. Le signe «stop» spécifie la durée maximum du temps de stockage possible des échantillons entre chaque phase (∞ = stockage possible pour une longue période, c. à d. plusieurs mois) (Figure de S. Campiche, présentée lors du Workshop de synthèse du CCSols sur les méthodes d'évaluation en août 2020).



### 3.3 Microarthropodes (Collemboles et Acariens)

Les microarthropodes font partie de l'embranchement des arthropodes. Leur point commun est leur petite taille à l'état adulte, soit quelques millimètres de longueur totale. Ils sont principalement représentés par les Acariens et les Collemboles (Figure 6), qui sont en général les groupes de microarthropodes les plus importants dans le sol, avec des abondances et des richesses spécifiques remarquables avec plus de 45 000 espèces identifiées pour les acariens (et une diversité non décrite probablement supérieure à 80 000 espèces) et 7 500 espèces pour les collemboles de par le monde.

Les microarthropodes comprennent aussi des larves et des imagos d'insectes ptérygotes, des Protozoaires, des Diploures, des Thysanoures, des Pauropodes. Ils effectuent tout leur cycle de développement dans la litière et les premiers centimètres du sol et peuvent également intervenir dans

les autres composantes du sol, comme la rhizosphère. Les microarthropodes du sol sont d'importants régulateurs de l'activité bactérienne et fongique, dont ils sont les prédateurs. Ils sont aussi des détritivores et sont souvent appelés «les transformateurs de litière». Leur présence est fortement liée à leur ressource principale : la matière organique. Les acariens sont généralement classés selon 3 groupes principaux : Oribatida, Gamasida et Prostigmata. Les collemboles peuvent quant à eux être regroupés au sein de 3 groupes fonctionnels, les épi- hémi- et eu-édaphiques, en fonction de critères morphologiques (Jeffery et al., 2010 ; Cortet, 2014 ; FAO, 2020).

Les microarthropodes, plus particulièrement les acariens et collemboles sont, après les vers de terre, les organismes les plus souvent utilisés dans les programmes de surveillance et de recherche répertoriés (chapitre 3.1).



Figure 6 : Acariens (droite) et collembole (gauche) (Photo : A. Murray, Licence: CC BY-SA 2.0)

Méthodes répertoriées	Programmes de surveillance ou de recherche
ISO 23611-2 <sup>1</sup> (extraction MacFadyen)	ENVASSO ; EcoFINDERS ; BioindicateursII ; RMQS BioDiv
Tullgren funnel <sup>2,3</sup>	BISQ ; Countryside survey <sup>4</sup>

Tableau 6: Méthodes répertoriées pour l'évaluation des collemboles et acariens (microarthropodes) et programmes de surveillance et de recherche les utilisant.

Références :

- <sup>1</sup> ISO 23611-2:2006. Soil quality – Sampling of soil invertebrates Part 2: Sampling and extraction of micro-arthropods (Collembola and Acarina).
- <sup>2</sup> Rutgers et al., 2009 (BISQ) et Emmett et al., 2010 (Countryside survey).

Remarque :

- <sup>3</sup> La méthode Tullgren funnel (ou Berlese funnel ou aussi Berlese-Tullgren funnel) est également mentionnée dans l'ISO comme méthode alternative pour l'extraction des microarthropodes du sol.
- <sup>4</sup> Les programmes BISQ et Countryside ne citent pas spécifiquement l'ISO comme méthode de référence. Cela tient certainement du fait que ces deux programmes ont été lancés avant que l'ISO ne soit officiellement disponible.

### 3.3.1 Méthodes répertoriées

Les microarthropodes sont utilisés dans les programmes de surveillance et de recherche ENVASSO, EcoFINDERS, BDF BW, Bioindicateurs II, RMQS BioDiv, BISQ et Countryside Survey (chapitre 3.1). Les méthodes utilisées dans ces programmes sont décrites ci-dessous (Tableau 6), à l'exception de celle utilisée dans le programme BDF BW car des informations détaillées à ce sujet n'ont pas pu être trouvées. L'utilisation des microarthropodes comme indicateurs de biodiversité des sols par analyse moléculaire est aussi en phase de développement dans des projets de recherche européens et suisses (chapitres 3.1.3 et 3.1.1).

La méthodologie de base pour l'étude des microarthropodes du sol est la même pour les deux méthodes identifiées dans les programmes de surveillance et de recherche. Le principe méthodologique général et les disparités méthodologiques sont définis dans les deux chapitres suivants.

### 3.3.2 Principe méthodologique de base

#### Analyses morphologiques

Le principe méthodologique général consiste en trois phases (Figure 7):

1. Le prélèvement sur le terrain de carottes de sol non perturbées, découpage en tranches et préservation individuelle des tranches.
2. L'extraction des microarthropodes des carottes de sol au laboratoire. En règle générale, une méthode d'extraction comportementale est utilisée. Elle se base sur une extraction sèche avec apport de chaleur (par exemple MacFadyen ou Tullgren funnel). Cette technique s'appuie sur la création d'un gradient de température entre un récipient chaud contenant l'échantillon de sol et un dispositif froid de collecte des microarthropodes. Les microarthropodes vont fuir l'augmentation de température et la sécheresse de la carotte de sol pour se diriger dans le récipient de collecte froid.
3. Dénombrement des microarthropodes sous stéréomicroscope et identification au microscope après préparation et montage sur lame de microscopie.



Figure 7 : Principe méthodologique de base pour l'étude des microarthropodes.

### Analyses moléculaires

Les programmes de surveillance et de recherche précités utilisent l'analyse morphologique pour l'identification des microarthropodes. En Suisse, Dr. Jürg Enkerli du Groupe de recherche d'écologie moléculaire à l'Agroscope dirige un projet de recherche sur la biodiversité des microarthropodes dans les sols suisses dans le cadre de la Stratégie suisse pour la biodiversité de l'OFEV. Le groupe cherche à développer les techniques d'analyses moléculaires (metabarcoding d'ADN) pour leur identification. En raison des contraintes temporelles de la revue bibliographique, la procédure et les coûts d'une analyse moléculaire pour les microarthropodes ne sont pas détaillés dans ce rapport, mais ceux-ci sont considérés similaires à ce qui est fait pour les nématodes et protistes. On peut donc se référer à l'analyse moléculaire de ces organismes pour comparaison (chapitres 3.4.2, 3.4.7, 3.5.1 et 3.5.5).

### 3.3.3 Différences méthodologiques

Les divergences méthodologiques entre les deux méthodes («ISO» MacFadyen et Tullgren funnel) concernent surtout la phase d'extraction (phase 2) ou différents appareillages pour l'extraction sèche à la chaleur peuvent être utilisés (Tableau 7).

Méthode	Diamètre de la carotte <sup>1</sup> et profondeur de l'échantillonnage	Nb. de carottes par sites	Technique d'extraction
<b>ISO 23611-2 (MacFadyen)</b>	ø 5.6 cm, Plusieurs tranches de 5 cm d'épaisseur à différentes profondeurs <sup>2</sup> : – horizon humique avec litière – horizon minéral à 0–5 cm et 5–10 cm	Min. 3	MacFadyen
<i>Alternatives</i>			– Berlese-Tullgren funnel – Extraction de Kempson <sup>3</sup> si uni- quement collecte de litière. – Flottaison à l'heptane
<b>Tullgren funnel</b>			
BISO	ø 5.8 cm, 3 tranches de 2.5 cm de hauteur	3 * 6	Tullgren funnel
Countryside Survey	ø 4 cm, 8 cm de profondeur du sol	5	Tullgren funnel

Tableau 7 : Principales divergences méthodologiques répertoriées pour les méthodes microarthropodes (ISO 23611-2 et Tullgren funnel).

<sup>1</sup> Utilisation d'un carottier stratifié (split soil corer), carotte de sol non perturbée.

<sup>2</sup> L'ISO et le programme ENVASSO recommandent la séparation de l'horizon humique de l'horizon minéral. Le programme Bioindicateur II ne prélève que les 5 premiers centimètres de sol (ø 5 cm, profondeur 0–5 cm ; 4 carottes). Le programme RMQS BioDiv prélève jusqu'à 15 cm de profondeur (3 profondeurs : 0–5, 5–10 et 10–15 cm) quand cela est possible dans la pratique.

<sup>3</sup> L'extraction de Kempson fonctionne sur le même principe que l'extraction MacFadyen, excepté que le système de refroidissement utilise un bain d'eau froide pour l'extraction de Kempson alors que de l'air froid humide est utilisé dans le cas de l'extraction MacFadyen. L'extraction Berlese-Tullgren funnel utilise un système simplifié de gradient de température. En général, une ampoule à incandescence est utilisée comme corps de chauffe et placée en dessus du récipient supérieur contenant l'échantillon de sol. Le récipient du bas collectant les organismes reste à température ambiante.

### 3.3.4 Points à considérer

- *Tranches de sol* : si nécessaire, l'épaisseur des couches de la carotte de sol prélevée peut-être adaptée (réalisation de couches plus fines p.ex.). Chaque tranche de sol est collectée individuellement dans un tube de plastique pour ne pas perturber la structure de l'échantillon.
- *Litière* : dans le cas où seulement la litière est collectée, celle-ci est prélevée sur une surface de 25 cm x 25 cm x 15 cm en utilisant un cadre métallique à bord tranchant pour la délimitation.
- *Procédure d'extraction* : la méthode comportementale avec extraction sèche à la chaleur (extraction de MacFadyen ou alors Tullgren funnel) est en général préférée aux méthodes alternatives comme la flottaison à l'heptane. Cette méthode n'est cependant efficace que pour les stades vivants actifs, avec une efficacité d'extraction moyenne de 75% à 80%. Les œufs, les stades dormants et les organismes enfermés dans des débris végétaux ne sont pas extraits par cette technique. Lorsque la méthode comportementale ne peut être employée et dans certaines circonstances, par exemple pour les sols très argileux ou limoneux, la méthode de flottaison à l'heptane peut être utilisée (l'heptane étant toxique pour la santé humaine et l'environnement, des précautions adaptées doivent être prises lors de son utilisation). Cette méthode tire parti des propriétés de la cuticule de l'arthropode d'adhérer à l'heptane. Dans le cas où seule la litière est prélevée, un extracteur de Kempson est recommandé (ISO 23611-2, 2006).
- *Extraction simultanée* : l'extracteur de MacFadyen peut permettre l'extraction de plusieurs échantillons de sol en parallèle (le plus souvent entre 48 et 84 échantillons selon l'appareil).
- *Temps d'extraction* : le temps d'extraction des microarthropodes de l'échantillon de sol varie en fonction de la technique utilisée. Il faut compter entre 9 et 10 jours pour extraire les organismes avec un extracteur MacFadyen (ISO 23611-2, 2006) et 7 jours pour l'extraction Tullgren funnel (Rutgers et al., 2006). L'extraction par flottaison à l'heptane requiert une demi-journée.

- *Analyses morphologiques* : l'analyse morphologique, plus particulièrement celle des acariens, demande une phase de préparation avant que les microarthropodes puissent être observés sous microscope. En effet, un éclaircissement/dépigmentation des spécimens âgés ou fortement sclérotisés est parfois nécessaire pour permettre l'identification. La dépigmentation peut prendre plusieurs jours selon le groupe d'acariens considéré. Les Astigmata ne nécessitent pas de dépigmentation.

### 3.3.5 Variables mesurées

Après l'extraction des microarthropodes des carottes de sol, leur abondance et leur diversité sont déterminées sous la loupe binoculaire et sous le microscope optique au laboratoire. Les paramètres suivants sont utilisés:

*Microarthropodes en général (collemboles, acariens et autres microarthropodes):*

- L'abondance totale des microarthropodes (nombre d'individus/m<sup>2</sup>, plus rarement par volume ou unité de poids sec de sol)
- Le nombre d'espèces ou autres groupes taxonomiques ou écologiques définis
- Les indices de diversité (diversité alpha (richesse spécifique), beta ou gamma (structure et composition des communautés))

*Acariens :*

- L'abondance totale (nombre d'individus/m<sup>2</sup>)
- L'abondance des 3 groupes d'acariens : Oribatida, Gamasida et Prostigmata (nombre d'individus/m<sup>2</sup>)

*Collemboles :*

- L'abondance totale (nombre d'individus/m<sup>2</sup>)
- L'abondance pour les 3 groupes fonctionnels : épi-, hémi- et eu-édaphique (nombre d'individus/m<sup>2</sup>)
- La richesse spécifique (nombre d'espèces)
- La diversité spécifique (indice de diversité p.ex. indice de Shannon, indice d'équitabilité, etc.)

Le nombre total d'individus (ou espèces ou groupes d'individus) doit être reporté par carotte de sol entière, c'est-à-dire comme étant la somme du nombre d'individus obtenus pour la totalité des sous-carottes analysées si l'échantillon a été fractionné. Les résultats obtenus sont ensuite exprimés en abondance totale d'individus/m<sup>2</sup> (facteur de conversion de 509 pour un diamètre de carottier de 5cm, par exemple). Si l'abondance des individus doit être exprimée en unité de poids sec de sol, un séchage de l'échantillon à 105°C après l'extraction des individus est nécessaire.

### 3.3.6 Contraintes d'utilisation

- \_ *Saisonnalité* : l'échantillonnage est réalisé de préférence au printemps.
- \_ *Conditions climatiques extrêmes* : méthode non adaptée pour les sols en conditions climatiques extrêmes (sols durs, gelés ou inondés, sécheresse).
- \_ *Durée de stockage* : L'extraction avec des méthodes comportementales devrait de

préférence être réalisée le jour de l'échantillonnage mais il est possible de différer celle-ci jusqu'à quatre jours au maximum (ISO 23611-2, 2006).

- \_ *Identification des acariens (analyse morphologique)*: au vu de la grande diversité des acariens (plus de 45 000 espèces identifiées), leur identification à l'espèce reste extrêmement complexe et n'est accessible que pour quelques experts au niveau mondial.

### 3.3.7 Ressources nécessaires

#### 3.3.7.1 Ressource temporelle et expertise requise

La ressource temporelle et l'expertise nécessaires sont estimées ci-dessous (Tableau 8). Sauf indication contraire, la ressource temporelle considère le temps requis par 1 personne pour effectuer le travail pour 1 échantillon (= 1 tranche de la carotte de sol). Les temps de trajet pour se rendre sur le lieu d'étude, la préparation et la mise en place du matériel sur le terrain ne sont pas pris en compte ici.

Procédure pour 1 échantillon	Durée totale		Durée effective		Expertise	
	Acariens	Coll.	Acariens	Coll.	Acariens	Coll.
<b>Phase 1 – Prélèvement</b> Pour 1 carotte	5 min <sup>1</sup>		5 min <sup>1</sup>		+	
<b>Phase 2 – Extraction</b> <i>MacFadyen</i> <i>ou Tullgren funnel</i>	10 jours <sup>1,2</sup> 7 jours <sup>1</sup>		5 min <sup>1</sup> 5 min <sup>1</sup>		+ +	
<b>Phase 3 – Analyses morphologiques</b> <i>Tri des microarthro.</i> <i>Préparation</i> <i>Identification</i> <b>TOTAL Analyses</b>	30 min <sup>1</sup> 1 à 7 jours <sup>3</sup> 2h <b>1 à 7 jours</b>	5 min 2h	30 min <sup>1</sup> 10 min 2h <b>4h45</b>	5 min 2h	++ +++	++ +++
<b>TOTAL pour la méthode</b> <i>MacFadyen</i> <i>ou Tullgren funnel</i>	<b>11 à 17 jours</b> <b>8 à 14 jours</b>		<b>5h</b> <b>5h</b>			

Tableau 8 : Ressource temporelle et expertise requises pour l'étude des microarthropodes (tâche effectuée par 1 personne pour 1 échantillon).

1 échantillon = 1 tranche de la carotte de sol

+ = compétences de base ; ++ = compétences avancées ; +++ = spécialiste ; ++++ = expert

<sup>1</sup> Procédure commune aux acariens et collemboles.

<sup>2</sup> Plusieurs extractions peuvent être réalisées en simultané (48 à 84 échantillons selon l'appareil)

<sup>3</sup> En fonction de l'âge des spécimens ou degré de sclérotisation.

### 3.3.7.2 Matériel et coûts estimés

- **Matériel spécifique** : le matériel spécifique requis pour l'étude des microarthropodes comprend principalement un carottier stratifié (prix moyen 850 CHF) et accessoires (tubes), un extracteur MacFadyen (technique d'extraction recommandée par l'ISO ; prix moyen 15000 CHF, disponible chez [www.ecotech.de](http://www.ecotech.de)), une plaque chauffante (prix moyen 500 CHF) une loupe binoculaire (prix moyen 700 CHF) et un microscope à contraste de phase pour l'identification morphologique (prix moyen 2000 CHF).
- **Consommables** : les consommables comprennent principalement les produits chimiques pour les liquides de fixation/préserver des organismes (liquide de Von Törne, éthanol), les consommables (lames et lamelles) et milieux de préparation et montage pour l'observation en microscopie optique et les récipients pour le stockage des organismes (vials plastiques).

Les coûts suivants sont estimés :

Microarthropodes (analyse morphologique)	Prix moyen CHF
Coûts d'investissement	19 000.00
Consommables (1 échantillon)	16.50

Tableau 9 : Coûts estimés pour l'investissement matériel et les consommables pour les microarthropodes.

Le détail des coûts, fournisseurs et équipement matériel se trouvent en annexe (Annexe 8.2).

### 3.3.8 Résumé de la méthodologie microarthropodes

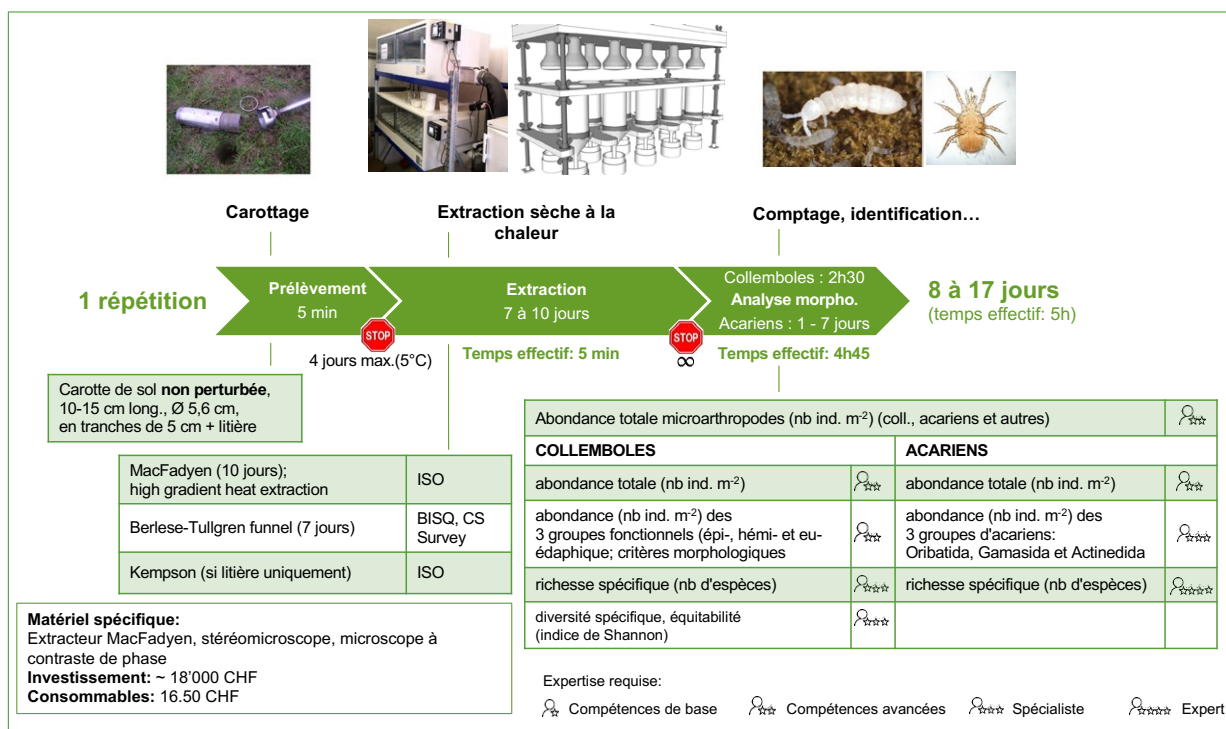


Figure 8 : Résumé des procédures méthodologiques pour les microarthropodes. Les signes «stop» spécifient la durée maximum du temps de stockage possible des échantillons entre chaque phase (∞ = stockage possible pour une longue période, c. à d. plusieurs mois) (Figure de S. Campiche, présentée lors du Workshop de synthèse du CCSols sur les méthodes d'évaluation en août 2020).



## 3.4 Nématodes

Les nématodes (Protostomia, Nematoda) sont des vers microscopiques de l'ordre de 1 mm de longueur vivants dans le sol (Figure 9). Ubiquistes, on les retrouve dans tous les milieux, sous tous les climats et sous toutes les latitudes, avec des densités de l'ordre de 1 million de nématodes par m<sup>2</sup> pour un sol ordinaire. Ils sont essentiels à la vie du sol et jouent un rôle clé dans la chaîne trophique. En fonction de leur régime alimentaire, les nématodes peuvent être classés en différents groupes trophiques reflétant une des fonctionnalités du sol : les nématodes phytophages (obligatoires ou facultatifs), qui renseignent sur la nature et l'état de la couverture végétale et, éventuellement, le risque de perte de rendement, les nématodes microbivores (bactérovores et fongivores) qui renseignent sur le compartiment microbien, la dynamique de la matière organique et le recyclage des nutriments, les nématodes de niveaux trophiques supérieurs (omnivores et carnivores/prédateurs) qui reflètent les perturbations physiques ou chimiques du milieu. Certains sont des parasites des plantes ou des animaux (Villenave, 2014 ; Van den Hoogen et al., 2019 ; FAO, 2020) . Ces nombreuses caractéristiques en font de bons bioindicateurs.

Les nématodes sont utilisés comme indicateurs dans 8 des programmes de recherche et d'observation cités au chapitre 3.1, soit les programmes EcoFINDERS, Bioindicateurs II, RMQS BioDiv, et AgrInnov de France, le programme de surveillance BISQ des Pays-Bas et la recherche suisse (Dr. Beat Frey, WSL). Les méthodes décrites ci-dessous sont celles utilisées par ces programmes.



Figure 9 : Nématode du sol  
(Photo : Cristina Menta, Licence : CC BY 3.0)

### 3.4.1 Méthodes répertoriées

Quatre méthodes ont été répertoriées pour l'étude des nématodes du sol parmi les programmes de surveillance et de recherche identifiés. La différence fondamentale entre ces méthodes est que certaines pratiquent une analyse morphologique des nématodes alors les autres réalisent une analyse moléculaire (Tableau 10).

Les méthodes ISO et ADEME des programmes Bioindicateurs II, AgrInnov, BISQ et RMQS BioDiv procèdent à l'analyse morphologique des nématodes extraits de l'échantillon de sol, tandis que les méthodes utilisées par le programme EcoFINDERS, de même que la recherche suisse effectuée par Dr. Beat Frey au WSL utilisent l'analyse moléculaire. Dr. Beat Frey explore actuellement, dans le cadre de la Stratégie suisse pour la biodiversité de l'OFEV,

deux possibilités différentes d'analyse moléculaire pour les nématodes, soit le metabarcoding d'ADN (analyse génétique des communautés de nématodes extraites d'un échantillon de sol) et le metabarcoding d'ADN environnemental (ADNe) (analyse génétique des communautés de nématodes à partir d'un échantillon de sol brut ; méthode en cours de développement) par NGS. La méthode d'analyse moléculaire T-RFLP utilisée à l'époque par le programme EcoFINDERS (2011 – 2014) est considérée comme dépassée au vu de l'avancée des techniques actuelles dans ce domaine. Elle ne sera donc pas discutée plus loin.

Le principe général de la méthode pour une analyse morphologique et pour une analyse moléculaire (séquençage d'amplicons), ainsi que les différences méthodologiques sont expliqués aux chapitres suivants.

Méthodes répertoriées	Programmes de surveillance / Projets de recherche les utilisant
<b>Analyse morphologique</b> ISO 23611-4 <sup>1</sup> ADEME <sup>2</sup>	Bioindicateurs II ; AgrINNOV ; BISQ <sup>5</sup> RMQS BioDiv
<b>Analyse moléculaire</b> T-RFLP <sup>3,6</sup> Séquençage d'amplicons (NGS) <sup>4,7</sup>	EcoFINDERS recherche suisse (WSL)

Tableau 10 : Méthodes répertoriées pour l'évaluation des nématodes et programmes de surveillance et de recherche les utilisant.

#### Références :

- <sup>1</sup> ISO 23611-4: 2007. Soil quality – Sampling of soil invertebrates – Part 4: Sampling, extraction and identification of soil-inhabiting nematodes.
- <sup>2</sup> Cluzeau et al., 2009 («Cahier des méthodes»). La méthode ADEME se base également sur l'ISO 23611-4 pour une partie de la procédure.
- <sup>3</sup> Griffiths et al., 2016 et Donn et al., 2012 (EcoFINDERS).
- <sup>4</sup> Resch et al., 2021 ; Frey, 2020 et communication personnelle Beat Frey, WSL

#### Remarques :

- <sup>5</sup> Le programme BISQ (Rutgers et al., 2009) reporte l'ébauche de l'ISO 23611-4 (ISO/WD 23611- 4: Sampling, extraction and identification of free-living stages of nematodes, 2004) comme méthode pour l'étude des nématodes. La méthode ISO 23611-4 a par conséquent été retenue comme méthode répertoriée.
- <sup>6</sup> T-RFLP : terminal-restriction fragment length polymorphism (Polymorphisme de longueur des fragments de restriction terminaux). Cette technique permet d'obtenir l'empreinte moléculaire (profil) d'une communauté d'organismes en se basant sur la position d'un site de restriction la plus proche d'une extrémité marquée d'un gène amplifié.
- <sup>7</sup> Séquençage d'amplicons (NGS) : le séquençage d'amplicons est un type d'analyse par séquençage à haut débit (next generation sequencing (NGS)). Cette méthode utilise la PCR pour créer des séquences d'ADN appelées amplicons. Elle permet le séquençage rapide de milliers à des millions de molécules d'ADN ou d'ARN simultanément, et donc le séquençage de plusieurs gènes et de plusieurs individus simultanément.

### 3.4.2 Principe méthodologique de base

#### Analyses morphologiques

Le principe méthodologique général consiste en trois phases (Figure 10):

1. Le prélèvement sur le terrain de carottes de sol pour former un échantillon composite, puis tamisage de l'échantillon.
2. L'extraction des nématodes d'une fraction de l'échantillon de sol au laboratoire. Plusieurs procédures d'extraction sont possibles. Elles se basent sur des procédés de sédimentation permettant la séparation des particules de sol et des nématodes en fonction de leur densité, sur la motilité des nématodes et/ou sur des techniques de filtration et tamisage successifs. Elles concernent les formes mobiles de nématodes uniquement.
3. Dénombrement des nématodes sous stéréomicroscope et identification au microscope après préparation et montage sur lame de microscopie.

#### Analyses moléculaires (NGS)

Le principe méthodologique général consiste en trois ou quatre phases selon la technique utilisée (metabarcoding d'ADNe ou metabarcoding d'ADN, respectivement) (Figure 11) :

##### Metabarcoding d'ADN

1. Le prélèvement sur le terrain de carottes de sol pour former un échantillon composite.
2. L'extraction des nématodes d'une fraction de l'échantillon de sol au laboratoire (voir point n°2 ci-dessus, chapitre 3.4.2)
3. L'extraction d'ADN des nématodes collectés.
4. L'amplification (par PCR) d'un segment de l'ADN (= «barcode») et le séquençage de l'ADN par Next Generation Sequencing (NGS) avec illumina MiSeq en utilisant des primers spécifiques pour les nématodes.

##### Metabarcoding d'ADNe

1. Le prélèvement sur le terrain de carottes de sol pour former un échantillon composite.
2. L'extraction d'ADNe de l'échantillon de sol directement (les échantillons de sol peuvent être congelés avant de procéder à l'extraction).
3. L'amplification (par PCR) d'un segment de l'ADN (= «barcode») et le séquençage de l'ADN par Next Generation Sequencing (NGS) avec illumina MiSeq en utilisant des primers spécifiques pour les nématodes.

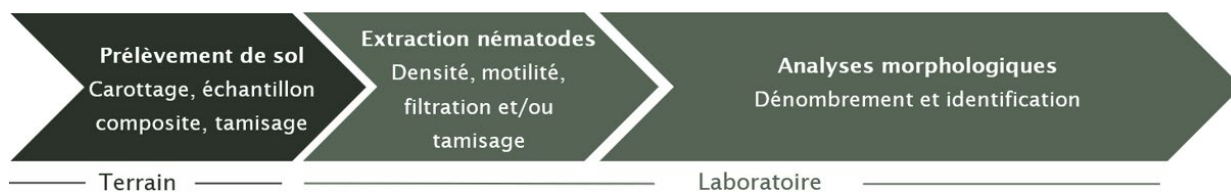


Figure 10 : Principe méthodologique de base pour l'étude morphologique des nématodes.

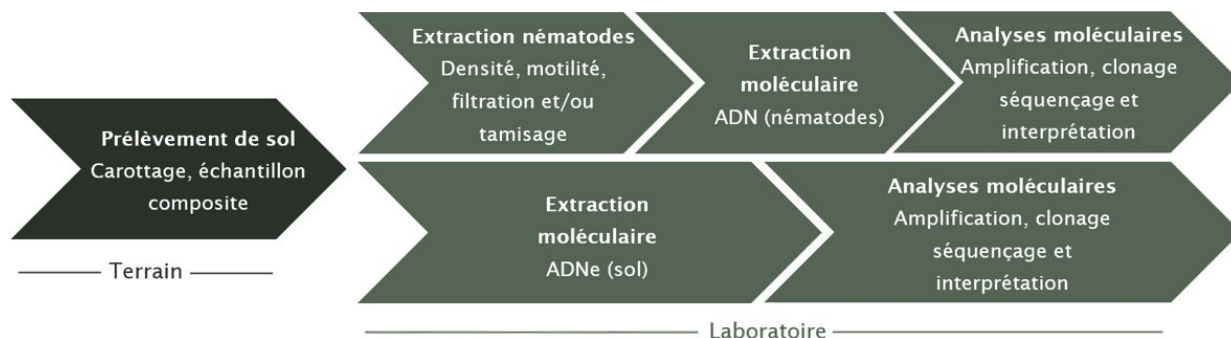


Figure 11: Principe méthodologique de base pour l'étude moléculaire des nématodes (metabarcoding d'ADN (ligne du haut) et metabarcoding d'ADNe (ligne du bas)).

### 3.4.3 Différences méthodologiques

Outre la différence majeure concernant la technique d'analyse (morphologique versus moléculaire) pour l'étude des nématodes, de petites divergences méthodologiques sont aussi observées pour le prélèvement des échantillons de sol et pour l'extraction des nématodes (metabarcoding d'ADN). (Tableau 11).

En plus des méthodes d'extraction des nématodes du sol mentionnées ci-dessus, il en existe quelques autres (voir Figure 12, chapitre 3.4.4): le standard EPPO : PM 7/119 (1) «Nématode extraction» édité en 2013 par l'Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes en donne un aperçu. Ce dernier liste la procédure à suivre et examine les avantages et inconvénients des principales méthodes d'extraction des nématodes (spécifiquement pour les phytopathogènes) présents dans les échantillons de plantes, échantillons de sol et pour les formes kystiques de nématode dans le sol (nématodes à kystes) (EPPO, 2013).

Méthode	Taille de l'échantillon composite <sup>1</sup>	Fraction granulométrique conservée	Techniques d'extraction
ISO 23611-4	25 carottes <sup>2</sup> (ø 2.3 cm, 10 – 15 cm de profond.)	< 8 mm	Élutriation Oostenbrink (densité), puis tamisage et filtration (motilité, tamisage/filtration) <i>Alternative : Baermann funnel (motilité) ou élutriation Seinhorst (densité)</i>
ADEME	32 carottes <sup>2,3</sup> (ø 7 cm, 15 cm de profond.)	< 6 mm	Élutriation de Seinhorst (densité), puis tamisage et filtration (motilité, tamisage/filtration) <i>Extraction de Cobb (tamisage/filtration) pour la 1<sup>ère</sup> campagne de mesure</i>
Analyse moléculaire (NGS)	8 carottes <sup>4</sup> (ø 5 cm, 10 cm de profond.)	n. d.	Elutriation Oostenbrink (densité) <sup>5</sup>

Tableau 11 : Principales différences méthodologiques répertoriées pour la procédure de prélèvement de sol et d'extraction des nématodes du sol.

*n. d.* = non défini.

<sup>1</sup> Réalisé par carottage simple

<sup>2</sup> Pour 100 m<sup>2</sup>

<sup>3</sup> Pour le programme Bioindicateur II, 4x12 carottes ont été prélevées sur 100 m<sup>2</sup>, soit 48 carottes.

<sup>4</sup> Le prélèvement s'effectue sur une surface d'environ 4 m<sup>2</sup>.

<sup>5</sup> L'élutriation Oostenbrink n'est pas nécessaire dans le cas de l'analyse moléculaire des nématodes par metabarcoding d'ADNe. Pour le metabarcoding d'ADN, les nématodes sont extraits des échantillons de sol par élutriation Oostenbrink mais les procédures complémentaires n'ont pas été spécifiées.

### 3.4.4 Points à considérer (prélèvement et extraction des nématodes)

- *Surface de prélèvement* : Un échantillonnage sur une surface de 1 ha est recommandé par la méthode ISO (au minimum 0.5 ha), soit 100 prélèvements pour 1 ha. Au vu de l'ampleur de la tâche, la surface de prélèvement est souvent réduite à 100 m<sup>2</sup> (programme RMQS BioDiv et Bioindicateur II). La surface de prélèvement doit être homogène en termes de propriétés du sol, végétation et type d'utilisation du sol (ISO 23611-4, 2007).
- *Taille de l'échantillon* : plus le nombre de carottes formant l'échantillon composite est élevé, meilleure est la représentativité de l'estimation de l'abondance et de la composition en espèces des nématodes (un maximum est atteint à partir de 300 carottes ; 100 carottes par hectare sont recommandées par l'ISO (ISO 23611-4, 2007). Pour les zones plus petites (par exemple 100 m<sup>2</sup>), ce dernier mentionne qu'environ 25 carottes suffisent pour donner un aperçu de la composition moyenne des nématodes sur le site et pour collecter suffisamment de volume de sol pour l'extraction. Il s'agit du même ordre de grandeur que le nombre de carottes prélevées par la méthode ADEME (soit 32 carottes pour 100 m<sup>2</sup>). Un sous-échantillon représentatif est ensuite prélevé à partir de l'échantillon composite tamisé pour réaliser l'extraction des nématodes (p. ex. 1L pour la méthode ISO).
- *Volume de sol pour l'extraction* : le volume de sol requis pour l'extraction dépend de la technique utilisée. Les techniques recommandées par l'ISO, l'ADEME et l'analyse moléculaire NGS permettent de traiter des quantités de sol relativement grandes en une seule fois, soit jusqu'à 250 ml de sol (100 à 500 g).
- *Efficacité de la technique d'extraction* : il n'existe malheureusement pas de technique d'extraction idéale pour toutes les espèces de nématodes dans toutes les conditions, et ce en raison de la variété de tailles, de la différence de motilité des nématodes et/ou des différences en termes de compacité et de teneur en matière organique des échantillons de sol. Le choix de la technique dépend également du but de l'extraction, de l'efficacité requise, du temps et des moyens financiers disponibles (EPPO, 2013) (à noter qu'une analyse moléculaire par metabarcoding d'ADNe à partir d'un échantillon de sol brut permet de pallier cette problématique). La méthode d'extraction par élutriation Oostenbrink reste cependant selon les standards ISO et EPPO, une des plus efficaces en termes d'efficacité (taux de rendement) et de qualité d'extraction des nématodes mobiles du sol. Dans la méthode ISO, l'extraction combine trois moyens de base pour la séparation des nématodes du sol : le lavage (densité ; élutriation Oostenbrink), le tamisage/filtration et le mouvement actif (motilité). Par conséquent, elle obtient de meilleurs résultats que n'importe laquelle des méthodes de base utilisées individuellement. En revanche, c'est la technique qui requiert l'équipement le plus gourmand en termes de coûts et de volumes d'eau utilisés. Les techniques alternatives proposées par l'ISO (extraction de Baermann seule, élutriation de Seinhorst) sont en comparaison de l'élutriation Oostenbrink jugées moins efficaces par l'ISO mais sont en revanche peu coûteuses. Plus de détails sur les coûts et bénéfices des méthodes listées par l'EPPO sont disponibles dans la figure ci-dessous (Figure 12).

— *Temps d'extraction* : les temps d'extraction sont fonction des techniques utilisées et varient selon celles-ci. L'élu-triation Oostenbrink et l'élu-triation de Seinhorst requièrent des temps d'extraction similaires, soit entre 15 à 30 min par échantillon. Pour la phase de filtration après élu-triation, la durée optimale recommandée par l'ISO après l'élu-triation Oostenbrink est de 72h. Les résultats expérimentaux montrent que 59% des nématodes sont récoltés pendant les 24 premières heures, 73% après deux jours et 82% sont capturés après trois jours. Un temps de filtration plus long présente plusieurs inconvénients tels que l'évaporation

de l'eau dans les plats, la mort des nématodes et l'éclosion des œufs présents dans les débris (ISO 23611-4, 2007). Dans certains cas, une extraction de Baermann est réalisée après l'élu-triation Oostenbrink. La durée de cette extraction en elle-même est de 24h à 72h selon l'EPPO (2013) et 48h à 72h selon l'ISO 23611-4 (2007).

Pour la phase de filtration après l'élu-triation de Seinhorst selon la méthode ADEME, 48h d'attente sont recommandées (Figure 12). Les ressources temporelles des différentes méthodes sont discutées plus en détail au chapitre 3.4.7.1.

**Table 2** Costs and benefits of the extraction methods mentioned in the EPPO Diagnostic Protocols for plant-parasitic nematodes (modified after Van Bezooijen, 2006)

Extraction method	Principle	Maximum sample size	Extraction efficacy	Cost of equipment	Labor costs	Water use	Time until evaluation*	Quality of extraction (clean)
<b>Plant material</b>								
Direct examination	Motility	10 g	+	+	+	+	10 min	+
Baermann funnel/Oostenbrink dish	Motility	50 g	++	+	++	+	24 h	+++
Root incubation	Motility	20 g	++	+	++	+	72 h	++
Mistifier	Motility	50 g	+++	++	+	+++	24 h	++
Maceration and filtration	Size and shape	50 g	+++	++	++	++	15 min	+
Maceration and centrifugal flotation	Density	50 g	+++	+++	++	++	30 min	++
Enzymatic digestion	Size and shape	10 g	++	++	++	+	72 h	+
<b>Soil</b>								
Baermann funnel/Oostenbrink dish	Motility	250 mL	+	+	++	+	24 h	+++
Flotation and sieving	Density and size and shape	200 mL	++	++	+++	++	15 min	+
Flegg modified Cobb	Density and size and shape	1000 mL	++	++	+++	+++	24 h	++
Oostenbrink elutriator and Baermann funnel	Density	250 mL <sup>†</sup>	+++	+++	++	++	24 h	+++
Oostenbrink elutriator and centrifugation	Density	250 mL <sup>†</sup>	+++	+++	++	++	60 min	+++
Centrifugal flotation	Density	250 mL	++	+++	++	++	15 min	+++
<b>Cysts</b>								
Baunacke method	Density and size and shape	100 mL	+	+	++	+	10 min	+
Paper strip method	Density and size and shape	250 mL	++	++	++	++	15 min	++
Fenwick can	Density	500 mL	++	+++	++	+++	15 min	++
Schuilung centrifuge	Density	500 mL <sup>‡</sup>	+++	+++	++	+++	15 min	++
Seinhorst elutriator	Density	2500 mL <sup>§</sup>	+++	+++	++	++	15 min	++
Centrifugal flotation	Density	250 mL	++	+++	++	++	15 min	++
Wye washer	Density	1000 mL <sup>§</sup>	++	++	++	+++	15 min	++

+ small (low); equipment costs <100 EUR.

++ medium; equipment costs 100–5000 EUR.

+++ large (high); equipment costs >5000 EUR.

\*The time given is that needed to extract a sample and receive a suspension ready for evaluation. In many cases additional cleaning steps (e.g. Baermann funnel, Oostenbrink dish, centrifugal flotation) are required that will prolong the process.

<sup>†</sup>Upscaled versions of the Oostenbrink elutriator can process 1000 mL soil.

<sup>‡</sup>Upscaled versions of the Seinhorst elutriator can process 2000 mL soil.

<sup>§</sup>Upscaled versions of the Wye washer can process 2000 mL soil.

Figure 12 : Coûts et bénéfices des méthodes d'extraction pour les nématodes phytopathogènes selon l'Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes (EPPO : PM 7/119 (1) Nematode extraction. 2013).



### 3.4.5 Variables mesurées

#### Analyses morphologiques

Après l'extraction des nématodes des échantillons de sol, l'abondance et la composition de la nématofaune sont déterminées sous la loupe binoculaire (=stéréomicroscope) et sous le microscope optique au laboratoire. Les paramètres suivants sont utilisés :

- \_ L'abondance totale
- \_ L'abondance de nématodes libres (phytophages exclus)
- \_ L'abondance des nématodes phytoparasites
- \_ La composition de la communauté, en général basée sur les espèces, sur les familles et/ou les genres, sur les guildes fonctionnelles ou sur les groupes trophiques. Les types écologiques sont également définis.

Sur la base de la composition et de l'abondance de la nématofaune du sol, des indices sont ensuite calculés. *Ceux-ci aident à déterminer le fonctionnement biologique et l'état des sols étudiés. On trouve :*

- \_ Indices de Diversité fréquemment utilisés (p. ex. Shannon, Simpson, ...)
- \_ Indice de Structure (SI); *Le SI reflète la stabilité du milieu : plus le SI est élevé, moins le milieu est perturbé. Il est fonction de l'abondance relative de plusieurs familles de nématodes (les bactérivores, les fongivores, les omnivores et les prédateurs (Villenave, 2014).*
- \_ Indice d'Enrichissement (EI); *Il renseigne sur la dynamique des éléments nutritifs ; l'EI augmente avec la disponibilité des nutriments, en particulier l'azote. Il est particulièrement utile dans les agroécosystèmes. (Villenave, 2014).*
- \_ Indice de Maturité (MI) : «Maturity Index», indice permettant la mesure des perturbations environnementales basée sur la composition des espèces de nématodes («colonizer-persist classes» (cp)). Les nématodes phytoparasites en sont exclus
- \_ Indice des nématodes PhytoPhages (PPI ; «Plant Parasitic Index»)
- \_ Proportion de nématodes bactérivores et fongivores (rapport NCR et IC)
- \_ Indice des Voies de Décomposition de la matière organique (IVD)

*MI, PPI et IVD sont utilisés pour déterminer les effets de différentes perturbations, stress et pratiques sur le sol (Villenave, 2014).*

**→ Pour le détail du calcul et plus d'information sur les différents indices, on peut se référer entre autres aux publications de Bongers (1989, 1999), Ferris et al. (2001) et Ferris (2010).**

Ces données sont exprimées en unité de poids de sol frais, de poids de sol sec et de surface (dm<sup>2</sup> ou m<sup>2</sup>). Les valeurs «par unité de surface» peuvent être calculées à partir du diamètre de la carotte de sol, du nombre de carottes dans l'échantillon composite, du poids total de l'échantillon composite et du poids de la quantité de sol extraite (ISO 23611-4, 2007).

#### Analyses moléculaires

Les analyses de génétique moléculaire conviennent particulièrement pour l'évaluation de :

- \_ La diversité spécifique (diversité alpha)
- \_ La structure et la composition des communautés (diversité beta)

Les analyses par PCR quantitative peuvent livrer des données sur l'abondance de certains taxons ou groupes d'organismes. En revanche, les analyses moléculaires ne permettent pas de fournir de l'information sur l'abondance globale (nombre d'individus global) ou le calcul d'indices (indice de Maturité MI par exemple). Pour cela, une analyse morphologique sous microscope est toujours nécessaire (communication personnelle Beat Frey, WSL).

### 3.4.6 Contraintes d'utilisation

- \_ *Saisonnalité* : l'échantillonnage peut se faire toute l'année ; le printemps et l'automne sont cependant les périodes les plus favorables (Villenave, 2014).
- \_ *Conditions climatiques* : éviter les conditions très sèches/avec un faible taux d'humidité du sol et les conditions de gel
- \_ *Perturbations* : éviter la prise d'échantillons dans les fossés, chemins ou traces (ISO 23611).
- \_ *Formaldéhyde* : la fixation des nématodes pour l'analyse morphologique requiert du formaldéhyde. Celui-ci est très toxique et des précautions appropriées doivent être prises lors de son utilisation (matériel de protection adapté, hotte d'aspiration, etc.).

### 3.4.7 Ressources nécessaires

#### 3.4.7.1 Ressource temporelle et expertise requise

La ressource temporelle et l'expertise nécessaires sont estimées ci-dessous (Tableau 12 et Tableau 13). La ressource temporelle considère le temps requis par 1 personne pour effectuer le travail pour 1 réplicat (= sous-échantillon de l'échantillon composite) pour l'analyse morphologique et l'analyse moléculaire. Les temps de trajet pour se rendre sur le lieu d'étude, la préparation et la mise en place du matériel sur le terrain ne sont pas pris en compte ici.

#### Analyses morphologiques

Procédure pour 1 réplicat	Durée totale	Durée effective	Expertise
<b>Phase 1 – Prélèvement</b>			
<i>Carottage, échantillon comp. (n = 25 à 32)</i>	20 – 30 min	20 – 30 min	+
<i>Homogénéisation et tamisage <sup>1</sup></i>	30 min	30 min	+
<b>TOTAL Prélèvement</b>	<b>~ 1 h</b>	<b>~ 1 h</b>	
<b>Phase 2 – Extraction</b>			
<b>Oostenbrink (ISO)</b>			
<i>Elutriation</i>	15 min	10 min	+
<i>Filtration – Tamisage</i>	72 h	5 min	+
<b>Total</b>	<b>72 h</b>	<b>15 min</b>	
<b>ou Seinhorst (ADEME)</b>			
<i>Elutriation</i>	30 min	10 min	+
<i>Filtration – Tamisage</i>	48 h	5 min	+
<b>Total</b>	<b>48 h</b>	<b>15 min</b>	
<b>Phase 3 – Analyses morphologiques</b>			
<i>Préparation</i>	6 h	1 h	++
<i>Dénombrement et identification</i>	2 h	2 h	+++
<b>TOTAL Analyses</b>	<b>~ 8 h</b>	<b>~ 3 h</b>	
<b>TOTAL pour la méthode</b>			
<b>Oostenbrink</b>	<b>~ 3.5 jours</b>	<b>~ 4 h</b>	
<b>Seinhorst</b>	<b>~ 2.5 jours</b>	<b>~ 4 h</b>	

Tableau 12 : Ressource temporelle et expertise requise pour l'étude des nématodes (analyses morphologiques; tâche effectuée par 1 personne pour 1 réplicat).

1 réplicat = 1 sous-échantillon de l'échantillon composite (en général fraction de 250 ml, soit environ 300 g de sol)

+ = compétences de base ; ++ = compétences avancées ; +++ = spécialiste

<sup>1</sup> Les sols argileux ou avec beaucoup de racines demandent plus de temps pour les procédures de tamisage et d'homogénéisation (ISO 23611-4, 2007).

## Analyses moléculaires (metabarcoding d'ADN et d'ADNe)

Procédure pour 1 réplicat	Durée totale	Durée effective	Expertise
<b>Phase 1 – Prélèvement</b> <i>Carottage (n = 85)</i>	10 min	10 min	+
<b>Phase 2 – Extraction des nématodes</b> (uniquement pour le metabarcoding d'ADN) <b>Oostenbrink</b> <sup>1</sup>	<b>72 h</b>	<b>15 min</b>	+
<b>Phase 3 – Extraction génomique</b> <i>Extraction d'ADN</i> <sup>2</sup> et quantification	2 h	2 h	++
<b>Phase 4 – Analyse moléculaire</b> <sup>3</sup> <i>Séquençage (prestation externe)</i> <i>Analyse génomique et interprétation</i>	1 à 3 semaines <sup>4</sup> << 4 à 8 h <sup>6</sup>	4 à 55 h << 4 à 8 h <sup>6</sup>	+++
<b>TOTAL pour la méthode (hors séquençage)</b> <i>Metabarcoding d'ADN</i> <i>Metabarcoding d'ADNe</i> <sup>5</sup>	~ 3.5 jours 6 à 10 h	~ 6 h 30 min à 10 h 30 min 6 à 10 h	

Tableau 13 : Ressource temporelle et expertise requises pour l'étude des nématodes (analyses moléculaires avec metabarcoding d'ADN et d'ADNe; tâche effectuée par 1 personne pour 1 réplicat).

+ = compétences de base ; ++ = compétences avancées ; +++ = spécialiste

<sup>1</sup> extraction Oostenbrink selon analyse morphologique (voir Tableau 12 pour les détails).

<sup>2</sup> Il est possible d'extraire l'ADN de plusieurs échantillons en parallèle lors de cette étape ce qui permet de réduire sensiblement le temps par échantillon et également d'automatiser la procédure (voir chapitre 4.3.2)

<sup>3</sup> La ressource et l'expertise requise pour l'analyse moléculaire se base sur ce qui est fait pour les protistes, les mêmes prestataires externes étant parfois utilisés pour les nématodes.

<sup>4</sup> Temps nécessaire entre l'envoi des échantillons et l'obtention des résultats.

<sup>5</sup> Le metabarcoding d'ADNe ne comprend pas la phase 2. L'ADN est extrait directement à partir de l'échantillon de sol.

<sup>6</sup> Ces données sont basées sur les ressources temporelles estimées pour les protistes (chap. 3.5.5 et chap. 4.4.2), en considérant l'état de la recherche lors de l'écriture de ce document. En réalité les ressources temporelles pour la détermination des nématodes sont aujourd'hui sensiblement moindres

### 3.4.7.2 Matériel et coûts estimés

#### Analyses morphologiques

- **Matériel spécifique** : il comprend principalement l'élu triateur Oostenbrink (technique recommandée par l'ISO ; prix moyen 6 000 CHF) et des tamis (prix moyen 150 CHF) pour l'extraction des nématodes, ainsi qu'un stéréomicroscope (prix moyen 700 CHF), un microscope (prix moyen 2 000 CHF) et le petit matériel additionnel pour le prélèvement, l'extraction et la microscopie (p. ex. boîtes de comptage), etc. (prix global moyen 2 150 CHF).
- **Consommables** : les consommables comprennent le petit matériel pour l'extraction des nématodes (p. ex. filtres) et l'observation sous microscope (p. ex. lames et lamelles), etc.

Les coûts suivants sont estimés pour l'analyse morphologique:

Nématodes (analyse morphologique)	Prix moyen CHF
Coûts d'investissement	11 000.00
Consommables (1 réplikat)	5.50

Tableau 14 : Coûts estimés pour l'investissement matériel et les consommables pour les nématodes (morphologique).

Le détail des coûts, fournisseurs et équipement matériel se trouvent en annexe (Annexe 8.2).

#### Analyses moléculaires (metabarcoding d'ADN et d'ADNe)

- **Matériel spécifique** : il comprend principalement l'élu triateur Oostenbrink (prix moyen 6 000 CHF) ainsi que le matériel additionnel (env. 1 000 CHF) pour l'extraction des nématodes de l'échantillon de sol. Le matériel pour la préparation et quantification de l'ADN comprend principalement un spectrophotomètre (p.ex. Denovix DS-11 ou DS-11FX, prix moyen 13 000 CHF), une centrifugeuse (prix moyen 8 000 CHF), un agitateur pour tubes à essai (prix moyen 350 CHF), etc. Le séquençage est donné à un prestataire de service externe, par exemple Microsynth ([www.microsynth.ch](http://www.microsynth.ch)) et Fasteris ([www.fasteris.com](http://www.fasteris.com)) en Suisse, ou Génome Québec au Canada ([cesgq.com](http://cesgq.com)). A titre indicatif, le prix moyen d'un séquenceur de type Illumina MiSeq nécessaire à ce type d'analyses est de 110 000 CHF.
- **Coût par échantillon** : le coût pour un échantillon depuis la phase d'extraction d'ADN jusqu'au séquençage est estimé à 45 CHF (communication personnelle Beat Frey, WSL).

Les coûts suivants sont estimés pour l'analyse moléculaire :

Nématodes (analyse moléculaire – metabarcoding d'ADN et d'ADNe)	Prix moyen CHF
Coûts d'investissement (sans séquenceur) – ADN	28 500.00
Coûts d'investissement (sans séquenceur) – ADNe	21 500.00
Coût d'analyse (1 échantillon ; extraction -> séquençage) – ADN et ADNe	45.00

Tableau 15 : Coûts estimés pour l'investissement matériel et les consommables pour les nématodes (analyse moléculaire d'ADN et d'ADNe)

Le détail des coûts, fournisseurs et équipement matériel se trouvent en annexe (Annexe 8.2).

### 3.4.8 Résumé de la méthodologie nématodes

#### Analyse morphologique

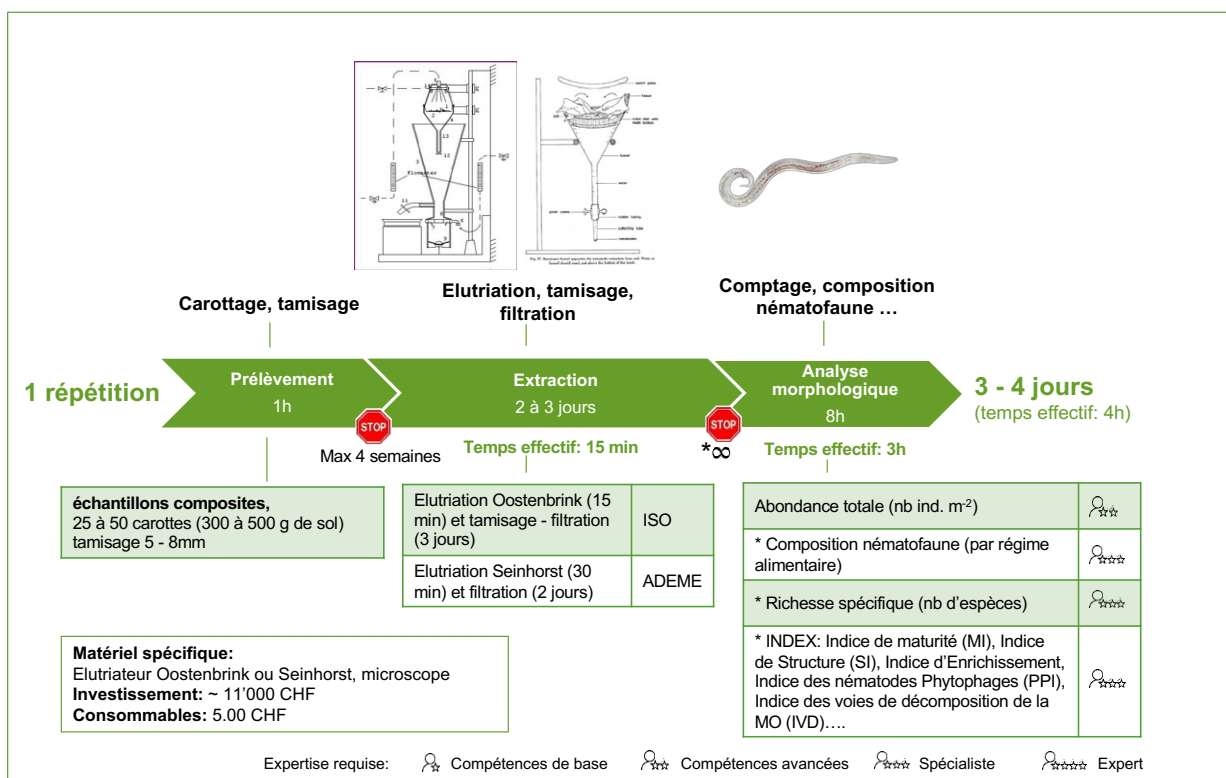


Figure 13 : Résumé des procédures méthodologiques pour les nématodes (analyse morphologique). Les signes «stop» spécifient la durée maximum du temps de stockage possible des échantillons entre chaque phase (∞ = stockage possible pour une longue période, c. à d. plusieurs mois) (Figure de S. Campiche, présentée lors du Workshop de synthèse du CCSols sur les méthodes d'évaluation en août 2020).

### 3.5 Protistes

Les protistes sont des organismes essentiellement unicellulaires, parfois pluricellulaires, regroupant tous les eucaryotes qui ne sont ni des plantes (Plantae), ni des champignons (Fungi), ni des animaux (Animalia). Ils sont présents dans les écosystèmes aquatiques aussi bien que terrestres (Figure 14). Les protistes du sol jouent un rôle fondamental dans le fonctionnement de ce dernier, dans les processus de dégradation de la matière organique et dans le cycle des nutriments par exemple. On peut les classer en 4 grands groupes écologiques fonctionnels : les phagotrophes (se nourrissant de bactéries, de champignons et d'autres protistes), les symbiotiques (incluant le parasitisme, le commensalisme et le mutualisme), les saprotrophes (participant à la dégradation de la matière organique) et les phototrophes ou mixotrophes (contenant de la chlorophylle et participant à la fixation du carbone). Leur nombre atteint généralement des dizaines de milliers d'individus par gramme de sol. Leur diversité et leur structure communautaire dans les sols fournissent une indication précieuse sur les conditions environnementales. Sensibles aux perturbations de

l'environnement, ils sont considérés comme des indicateurs utiles pour évaluer la qualité du sol, mais également pour prédire les changements futurs dans le fonctionnement de l'écosystème. Cependant, leur potentiel d'utilisation en tant que bio-indicateurs reste encore peu exploité à l'heure actuelle pour les raisons suivantes : ils sont moins étudiés que les procaryotes, champignons et invertébrés du sol ; il existe peu de spécialistes des protistes (taxonomistes et écologistes) ; tous les groupes taxonomiques ne sont pas encore compris de manière égale. De plus, la plupart des espèces restent encore non décrites ce qui peut limiter leur potentiel de bioindication (Geisen et al., 2018).

Plusieurs méthodes existent pour étudier la diversité et l'abondance des protistes (analyse de communautés). On peut classer ces méthodes en deux catégories : 1) l'analyse microscopique par observation directe ou par technique de culture, plutôt utilisée par le passé, 2) l'analyse moléculaire d'ADN et d'ARN, qui est la technique préférée actuellement (Figure 15) (Geisen & Bonkowski, 2018).

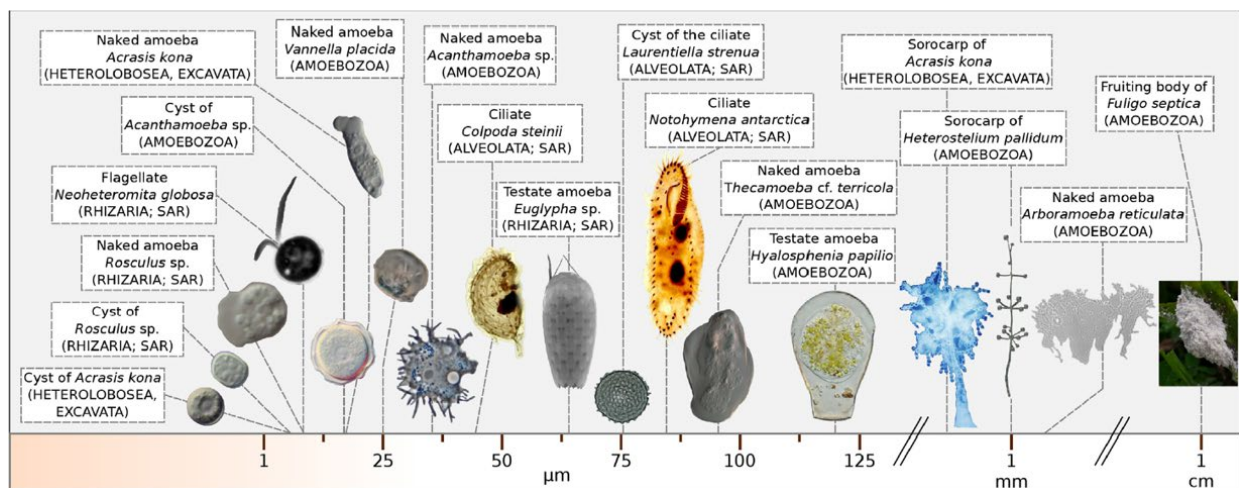


Figure 14 : Protistes libres du sol classés selon leur taille (longueurs), morphologie et affiliation phylogénétique (Geisen et al., 2017)



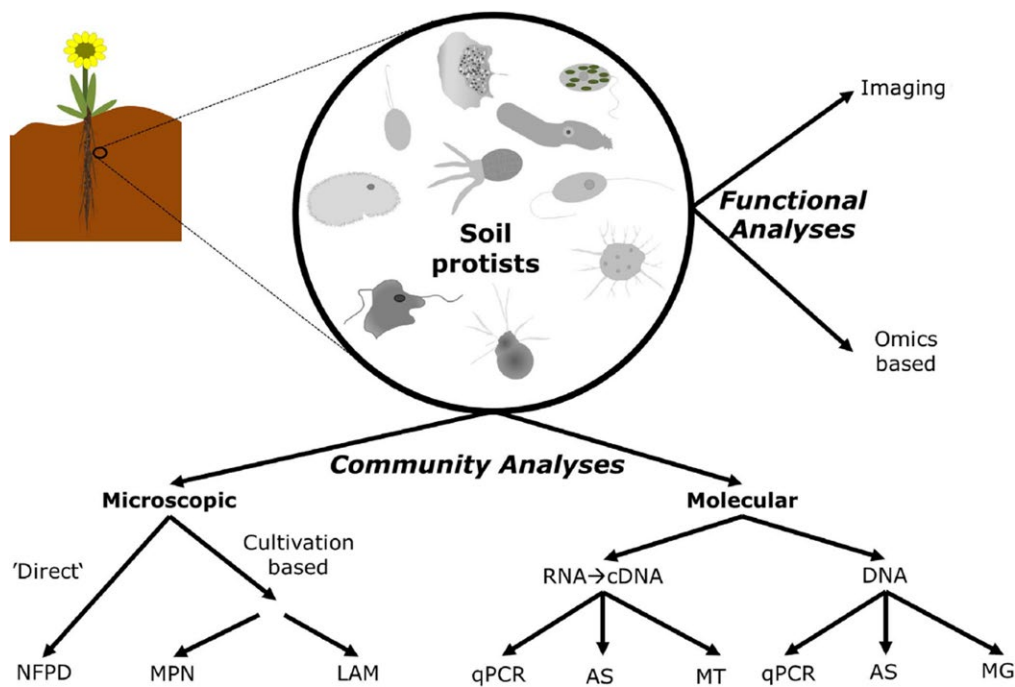


Figure 15 : Résumé des méthodes existantes pour étudier les protistes du sol selon Geisen et Bonkowski 2018. Les méthodes courantes pour étudier les communautés de protistes du sol sont séparées en deux approches principales, l'une utilisant des analyses microscopiques pour identifier les protistes à des résolutions différentielles, l'autre utilisant des méthodes moléculaires sur des acides nucléiques extraits (ADN ou ADNc après transcription inverse de l'ARN). Abréviations : NFPD: non-flooded petri dish method; MPN: Most probable number technique; LAM: Liquid aliquot method; qPCR: quantitative polymer chain reaction; MT: Metatranscriptomic high-throughput sequencing (HTS); AS: Amplicon HTS; MG: Metagenomic HTS.

A l'heure actuelle, il n'y a pas encore de norme (Standard ISO par exemple) pour étudier les protistes du sol. Les méthodes existantes restent du domaine de la recherche et les références méthodologiques sont à examiner dans les publications scientifiques (voir Geisen et Bonkowski 2018 pour quelques exemples).

Parmi les programmes de surveillance et de recherche cités au chapitre 3.1, les protistes ont été considérés dans les programmes européens Envasso et EcoFinders mais n'ont pas été retenus dans le set d'indicateurs final, une analyse de type morphologique au microscope ayant été jugée trop complexe. De plus, les méthodes moléculaires en étaient encore à leur début lors du lancement de ces deux programmes il y a une dizaine d'années et donc difficilement intégrables dans la pratique à ce moment. Cependant, grâce aux récentes avancées dans le domaine du metabarcoding, de plus en plus de projets liés à la biodiversité et à l'écologie microbienne des sols intègrent également l'analyse des protistes (voir notamment George et al., 2019, Santos et al., 2020, Hilton et al., 2021).

En Suisse, les protistes font partie des programmes de recherche du Groupe Science du sol et environnement de la Haute école de viticulture et œnologie de Changins (Professeur Thierry Heger) et du Laboratoire de Biodiversité du sol de l'Université de Neuchâtel (Professeur Edward A. D. Mitchell). Dans le cadre de la Stratégie suisse pour la biodiversité de l'OFEV, l'équipe de Thierry Heger développe une approche permettant de caractériser les communautés de protistes de différents sols suisses de manière simple et pratiquement exhaustive en utilisant des méthodes de génétique moléculaire (metabarcoding).

La méthode décrite ci-après pour étudier les protistes du sol est celle utilisée pour les travaux de recherche du Professeur Thierry Heger de la Haute école de Changins, qui utilise cette analyse moléculaire par metabarcoding d'ADNe. La description ci-dessous se base sur les informations fournies dans les publications et en communication personnelle avec le Professeur Heger.

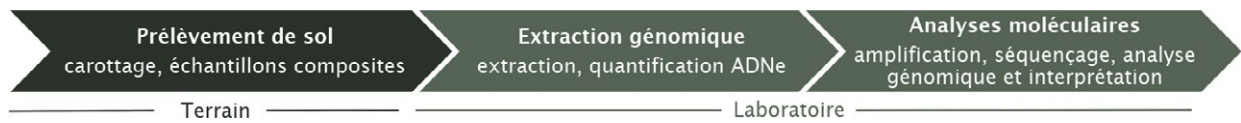


Figure 16 : Principe méthodologique de base pour l'étude moléculaire des protistes.

### 3.5.1 Principe méthodologique de base

Le principe méthodologique pour étudier les protistes consiste en 3 phases principales :

1. Le prélèvement sur le terrain de carottes de sol pour former un échantillon composite (3 carottes par réplicat, 6.5 cm de diamètre sur 10 cm de profondeur) (Samaritani et al., 2017)
2. L'extraction et la quantification d'ADNe en laboratoire à partir des échantillons de sol collectés (0.5 g de sol frais) (Fournier et al., 2020a)
3. L'amplification de l'ADN par PCR avec un primer général pour eucaryotes, le séquençage (Next Generation Sequencing (NGS 18S rRNA amplicons), par illumina MiSeq, réalisé par le «Centre for Comparative Genomics and Evolutionary Bioinformatics» (Halifax, Canada)), le traitement des séquences de données (vérification de la qualité, tri pour éliminer les séquences de données non utilisables) et l'interprétation (assignation taxonomique des séquences d'ADNe identifiées, analyse de communautés et de diversité, etc.) (Fournier et al., 2020b)

### 3.5.2 Points à considérer

En l'absence d'une méthode normée pour l'étude des protistes, des divergences existent en fonction des divers travaux de recherche effectués à ce jour dans ce domaine ainsi qu'en fonction des avancées des techniques d'analyses. Le principe de base méthodologique reste cependant le même. Ces différences concernent par exemple : le nombre d'échantillons de sol collectés pour former l'échantillon composite, la composition des produits utilisés dans le tampon d'extraction d'ADNe («extraction buffer»), la technique et l'appareillage pour réaliser l'amplification et le séquençage, etc. Pour que les résultats puissent être comparables, il est important de s'accorder sur une méthodologie définie au préalable.

### 3.5.3 Variables mesurées

Les principaux paramètres mesurés sont :

- \_ La diversité génétique des protistes, nombre d'espèces (diversité  $\alpha$ )
- \_ La composition des communautés (diversité  $\beta$ )
- \_ L'analyse des réseaux microbiens

### 3.5.4 Contraintes d'utilisation

- \_ *Saisonnalité* : les prélèvements se font de préférence au printemps et en automne, ou à l'optimum de végétation. Des prélèvements réalisés en plein été ou en plein hiver peuvent présenter une diversité de protistes différente que ceux réalisés au printemps ou en automne (Fournier et al., 2020a).
- \_ *Contraintes climatiques* : les périodes sèches sont à éviter.

### 3.5.5 Ressources nécessaires

#### 3.5.5.1 Ressource temporelle et expertise requise

Procédure pour 1 réplicat	Durée totale	Durée effective	Expertise
<b>Phase 1 – Prélèvement</b> <i>Carottage (échantillon composite n = 3)</i>	<b>5 min</b>	<b>5 min</b>	+
<b>Phase 2 – Extraction génomique</b> <i>Extraction d'ADNe <sup>1</sup> et quantification</i>	<b>2 h</b>	<b>2 h</b>	++
<b>Phase 3 – Analyse moléculaire</b> <i>Séquençage (prestation externe)</i> <i>Analyse génomique et interprétation</i>	1 à 3 semaines <sup>2</sup> 4 à 8 h	4 à 55 h <sup>3</sup> 4 à 8 h	+++
<b>TOTAL pour la méthode (hors séquençage)</b>	<b>6 à 10 h</b>	<b>6 à 10 h</b>	

Tableau 16 : Ressource temporelle et expertise requise pour l'étude des protistes (tâche effectuée par 1 personne pour 1 réplicat).

1 réplicat = échantillon composite à 3 carottes de sol

+ = compétences de base ; ++ = compétences avancées ; +++ = spécialiste

<sup>1</sup> Il est possible d'extraire l'ADN de plusieurs échantillons en parallèle lors de cette étape ce qui permet de réduire sensiblement le temps par échantillon. Il est estimé que 20 à 25 échantillons peuvent être extraits en une journée (communication personnelle Thierry Heger, Changins). Une automatisation de la procédure est possible (voir chapitre 4.4.2)

<sup>2</sup> Temps nécessaire entre l'envoi des échantillons et l'obtention des résultats.

<sup>3</sup> Selon données fournies par illumina MiSeq, en fonction de la longueur de lecture du séquençage (nombre de paires de base) ([https://support.illumina.com/sequencing/sequencing\\_instruments/miseq/questions.html](https://support.illumina.com/sequencing/sequencing_instruments/miseq/questions.html))

#### 3.5.5.2 Matériel et coûts estimés

— *Matériel spécifique* : il concerne le matériel pour la quantification d'ADN qui nécessite principalement un spectrophotomètre (p.ex. Denovix DS-11 ou DS-11FX, prix moyen 13 000 CHF) et autre matériel pour la préparation : centrifugeuse (prix moyen 8 000 CHF), agitateur pour tubes à essai (prix moyen 350 CHF, «Vortex Shaker»), etc. Actuellement, pour le séquençage un prestataire de service externe est mandaté (voir ci-dessous). A titre indicatif, le prix moyen pour un séquenceur de type «Illumina MiSeq» est de 110 000 CHF (instrument et installation).

— *Consommables* : ils concernent principalement les produits et réactifs pour l'extraction d'ADN. Le coût du kit d'extraction ADN (FastDNA SPIN Kit for soil ; MP Biomedicals, 100 préparations) est de 420 CHF, soit

environ 4.20 CHF par échantillon (communication personnelle de Thierry Heger : 5 à 10 CHF par échantillon). A cela s'ajoute du petit matériel de laboratoire comme des tubes Falcon 50 ml, des pointes de pipettes, etc.

— *Prestation de service* : les échantillons sont donnés pour PCR et séquençage avec illumina MiSeq à un prestataire externe (Centre for Comparative Genomics and Evolutionary Bioinformatics », Integrated Microbiome Resource (IMR): <https://imr.bio/>, Halifax, Canada). Les tarifs selon offre de prestations sont d'environ 25 CHF par échantillon.

Finalement, le coût par échantillon incluant les consommables et prestation de service depuis la phase d'extraction d'ADNe jusqu'au séquençage est estimé à 45 CHF, tout comme pour les nématodes (communication personnelle Thierry Heger, Changins)

Les coûts suivants sont estimés:

<b>Protistes (analyse moléculaire – metabarcoding ADNe)</b>	<b>Prix moyen CHF</b>
Coûts d'investissement (sans séquenceur)	21500.00
Coût d'analyse (1 échantillon ; extraction -> quantification -> séquençage)	45.00

Tableau 17 : Coûts estimés pour l'investissement matériel et les consommables pour les protistes.

A noter que les coûts d'envoi des échantillons pour le séquençage au Canada est d'environ 250 CHF (indépendamment du nombre d'échantillons envoyés ; envoi réfrigéré).

Le détail des coûts, fournisseurs et équipement matériel se trouvent en annexe (Annexe 8.2).

## 3.6 Méthodes fonctionnelles

Divers groupes de microorganismes ainsi que de nombreux invertébrés comme les vers de terre, les enchytréides, les collemboles ou les nématodes contribuent de manière considérable au maintien des fonctions biologiques du sol. Ils existent seulement quelques méthodes qui abordent directement le fonctionnement des sols et les services écosystémiques et qui permettent d'évaluer ces contributions. La plupart de ces indicateurs fonctionnels se concentrent sur les activités microbiennes. Les indicateurs directement liés aux activités des invertébrés du sol sont en revanche moins nombreux (Römbke, 2014). En fait, trois méthodes fonctionnelles sont disponibles (Figure 17), elles sont utiles pour évaluer quantitativement l'activité des organismes du sol, en particulier les invertébrés. Les trois sont liées à la décomposition de la matière organique et donc au cycle des nutriments :

- *Le test du sac à litière ou Litter Bag* : il est utilisé pour mesurer la perte de masse de matière organique dans le sol minéral (principalement les sites de culture et les prairies) ou dans la couche de litière (principalement les forêts) (Römbke, 2014). Le test consiste en un sac en matériel synthétique de maille variable généralement rempli de résidus de paille. Le sac est enterré dans le sol pour

plusieurs semaines. A la fin de la période d'exposition, le Litter Bag est déterré et la quantité de paille consommée par les organismes du sol est évaluée (perte de masse de la matière organique). Ce test long de plusieurs mois à plusieurs années est assez élaboré et ne fait pas la différence entre la contribution des microorganismes et des invertébrés (Römbke, 2014).

- *Le test de la bande d'appâts ou Bait Lamina* : Le test consiste en des bâtonnets de PVC de 120 mm de long par 6 mm de large (ISO 18311, 2016) perforés de 16 trous. Les trous sont remplis d'un substrat organique fait d'un mélange de cellulose, son de blé et charbon actif. Les bâtonnets sont insérés verticalement dans le sol pour quelques jours puis retirés. Le nombre d'appâts organiques ayant été consommés par les organismes du sol est ensuite évalué. Il permet de mesurer l'activité alimentaire globale et le profil de l'activité verticale des invertébrés du sol in situ, en particulier la macrofaune, comme les vers de terre, mais aussi la mésofaune, en particulier les enchytréides ou les microarthropodes comme les collemboles (Römbke, 2014). Le test Bait Lamina est considéré comme une mesure indirecte de la dégradation de la



Figure 17 : De gauche à droite : Litter Bag (Photo : Nicole Scheunemann), Tea Bag (Photo : Simon Tresch, FiBL), et Bait Lamina (Photo: S. Campiche).

matière organique, le paramètre mesuré en fin de test étant l'activité alimentaire des organismes du sol (OECD, 2006).

— *Le test du sachet de thé ou Tea Bag test* fournit des informations sur la capacité du sol et de ses organismes vivants à transformer les résidus organiques en nutriments disponibles pour les plantes et à contribuer à l'accumulation d'humus dans le sol. Le test consiste à enterrer des sachets de thé de types différents : un sachet avec du thé vert considéré comme ayant une dégradation rapide et un sachet avec du rooibos, plus complexe à dégrader. Après environ 3 mois d'exposition dans le sol, le degré de décomposition et le facteur de stabilisation de la matière organique par les organismes du sol est évalué en comparant la vitesse de dégradation des deux types de thé (Keuskamp et al., 2013 ; Tresch et Fliessbach, 2017). Avec ces données, Keuskamp et al. (2013) propose le calcul d'un indice (Tea Bag Index ; voir la publication pour les détails du calcul). Sur le principe, le Tea Bag test s'apparente au Litter Bag.

Les méthodes fonctionnelles restent encore peu employées en comparaison de celles se basant sur l'observation des communautés d'organismes. Elles sont employées dans seulement deux programmes de surveillance et de recherche internationaux cités au chapitre 3.1 ainsi que dans certains des programmes de recherche suisse.

### 3.6.1 Méthodes répertoriées

Dans les programmes de surveillance et de recherche cités au chapitre 3.1, le Litter Bag est considéré dans le programme ENVASSO et employé dans le programme AgrINNOV. Le test Bait Lamina est considéré dans le programme ENVASSO et recommandé comme méthode fonctionnelle par le projet EcoFINDERS. Il est également utilisé actuellement dans plusieurs petits programmes de recherche en Suisse. Le test du sachet de thé a, entre autres, été employé dans le cadre des recherches du FiBL (Andreas Fliessbach) en lien avec le programme FertilCrop 2015-2017 (Fertility Building Management Measures in Organic Cropping Systems) (Tableau 18).

Il est à noter que le Litter Bag est utilisé dans le contexte de l'évaluation des produits phytosanitaires (mise sur le marché). Dans ce cadre, un document d'orientation OECD n°56 (OECD, 2006) sur la dégradation de la matière organique dans les sacs à litières est disponible. Il n'est cependant pas cité par le programme AgrINNOV, qui décrit sa propre méthodologie. Le document OECD étant souvent cité en référence dans les publications discutant les méthodes pour l'étude de la dégradation de la matière organique (Römbke, 2014, par exemple), la procédure méthodologique OECD n°56 sera également considérée dans le comparatif des méthodes ci-dessous (chapitre 3.6.3).

Méthodes répertoriées	Programmes de surveillance ou de recherche
Litter Bag <sup>1</sup>	AgrINNOV
Bait Lamina <sup>2</sup>	EcoFINDERS, recherche suisse
Tea Bag <sup>3</sup>	Recherche suisse (FiBL: FertilCrop)

Tableau 18: Méthodes répertoriées pour les méthodes fonctionnelles et programmes de surveillance et de recherche les utilisant.

#### Références :

<sup>1</sup> Ranjard, 2011 ; OECD n°56- ENV/JM/MONO(2006)23 (OECD, 2006) – voir remarque ci-dessous.

<sup>2</sup> ISO 18311:2016. Soil quality – Method for testing effects of soil contaminants on the feeding activity of soil dwelling organisms – Bait-lamina test.

<sup>3</sup> Keuskamp et al., 2013, Tresch & Fliessbach, 2017 ; le Tea bag index est un projet de science participative (chercheurs et citoyens scientifiques), qui vise à collecter des données sur le taux de dégradation des sachets de thé dans les sols du monde entier et à établir une carte mondiale avec ces données. La page <http://www.teatime4science.org/> n'était plus accessible le 17.10.2022.





Figure 18 : Principe méthodologique de base pour les méthodes fonctionnelles.

### 3.6.2 Principe méthodologique de base

Les méthodes fonctionnelles Litter Bag, Bait Lamina et Tea Bag permettent l'évaluation quantitative de l'activité des organismes du sol. Elles sont liées à la décomposition de la matière organique. Le principe de base est le même pour les trois méthodes : la matière organique enfermée ou insérée dans un support est mise à disposition des organismes du sol. La consommation de matière organique par les organismes est évaluée après un certain temps.

Le principe méthodologique pour les méthodes fonctionnelles consiste en 3 phases principales (Figure 18):

1. Les Litter Bag, Bait Lamina ou Tea Bag avec leur contenu spécifique en matière organique sont enfouis dans le sol et laissés

en place pendant plusieurs jours voire plusieurs mois à disposition des organismes du sol selon le test choisi (voir chapitre 3.6.3 pour les détails)

2. Les supports de test sont déterrés et collectés.
3. Les supports de tests sont nettoyés des particules de terre ou des racines. La quantité de matière organique consommée par les organismes du sol est évaluée (perte de masse pour les Litter Bag et Tea Bag ou nombre d'appâts consommés pour les Bait Lamina).

### 3.6.3 Différences méthodologiques

Les principales différences méthodologiques pour les méthodes fonctionnelles sont listées dans le tableau ci-dessous (Tableau 19):

Méthode	Support	Matière organique utilisée	Durée d'exposition <sup>1</sup>	Organismes cibles	Evaluation	Nombre de réplicats
<b>Litter Bag</b>						
AgrINNOV	Sac en matière synthétique, 15 cm x 20 cm, maille 1 mm	Résidus de paille (5 g)	4 mois	Micro-organismes et mésofaune	Perte de masse (matière organique)	4
OECD n°56	Sac en matière synthétique, 10 cm x 20 cm, maille 5 à 10 mm	Paille de blé (4 g)	6 à 12 mois, ou plus	Micro-organismes, méso- et macrofaune	Perte de masse (matière organique)	8 <sup>2</sup>
<b>Bait Lamina</b>	Bâtonnet en PVC, 120 x 6 mm, avec 16 perforations	Cellulose, son de blé, charbon actif (70 : 25 : 5)	10 à 20 jours	Principalement méso- et macrofaune (rôle négligeable des micro-organismes)	Nombre d'appâts consommés	3 à 5
<b>Tea Bag</b>	Sachet de thé en nylon (Lipton), maille 0.25 mm	Thé vert et rooibos	3 mois	Micro-organismes et mésofaune	Perte de masse (matière organique)	5 par type de thé

Tableau 19 : Principales différences méthodologiques répertoriées pour les méthodes fonctionnelles.

<sup>1</sup> Durée d'exposition pour les régions tempérées (le temps d'exposition est plus court en zone tropicale par exemple).

<sup>2</sup> Contexte d'application : évaluation de l'effet des produits phytosanitaires

---

### 3.6.4 Points à considérer

- *Maillage* : la méthode Litter Bag présente l'avantage de pouvoir sélectionner la taille de mailles du tissu synthétique utilisé pour le sac à litière. Cela permet ainsi de cibler la pédofaune d'intérêt dans l'étude de la consommation de la matière organique. Par exemple, la macrofaune peut être exclue de l'étude en choisissant un maillage fin l'empêchant de pénétrer dans le Litter Bag.
- *Choix de la matière organique* : un certain type de matière organique est proposé par chacune des méthodes tel que la paille pour les Litter Bag ou la cellulose et son de blé pour les Bait Lamina. Il est cependant possible d'utiliser un autre type de matériel organique (feuilles par exemple) en fonction du contexte de l'étude, du type de sol et type d'utilisation du sol.
- *Durée d'exposition* : la durée d'exposition dépend de la région géographique concernée et des conditions environnementales (température, humidité du sol). Pour les Bait Lamina, la durée d'exposition n'est pas fixe et varie entre 10 à 20 jours si les conditions environnementales sont réunies. Il est parfois recommandé de conduire un test préalable pour définir la durée de test. On considère que le test Bait Lamina peut être arrêté quand au moins 30 % mais pas la totalité des appâts sont consommés (selon la norme ISO 18311:2016 ; observer en préférence avec plusieurs battons de contrôle mais on peut également contrôler les battons et les remettre dans la terre).
- *Tea Bag* : la méthode du Tea Bag est intéressante, car outre les indications fournies sur les taux de décomposition de la matière organique, elle renseigne également sur les facteurs de stabilisation de celle-ci en comparant la vitesse de dégradation de deux types de matière organique (feuille de thé vert et rooibos).
- *Bait Lamina* : les bâtonnets du test Bait Lamina peuvent être nettoyés et remplis pour une nouvelle utilisation.

---

### 3.6.5 Variables mesurées

Après le retrait des tests fonctionnels du sol, les variables suivantes sont mesurées :

- *Litter Bag* : dégradation de la matière organique (perte de masse en %)
- *Bait Lamina* : activité alimentaire globale pour le site (nombre total d'appâts consommés ; % d'activité alimentaire) et distribution verticale de l'activité dans le sol (nombre d'appâts consommés en fonction de la profondeur)
- *Tea Bag* : taux de dégradation et facteur de stabilisation de la matière organique (comparaison de la perte de masse du thé vert et thé rooibos)

---

### 3.6.6 Contraintes d'utilisation

- *Saisonnalité* : pour les Bait Lamina, le printemps et l'automne sont les périodes les plus favorables pour évaluer l'activité alimentaire des organismes du sol. Les autres tests comme le Litter Bag se déroulant sur une plus longue période d'exposition (plusieurs mois à plus d'une année), l'influence de la saisonnalité est de moindre importance.
- *Conditions climatiques* : les conditions climatiques (humidité, température) ont une forte influence sur le taux de dégradation de la matière organique et donc influencent fortement les résultats des tests fonctionnels. Il est recommandé que les températures du sol soient comprises entre 5° et 15°C et que le contenu en eau du sol soit de plus de 20 % pour assurer une activité des organismes (ISO 18311, 2016). La dégradation de la matière organique sera généralement plus rapide dans ces conditions. La pose de Bait Lamina devrait être évitée en conditions extrêmes (fortes températures et sécheresse).
- *Phase d'exposition* : les méthodes fonctionnelles nécessitent une durée d'exposition sur le terrain allant d'environ 2 semaines (Bait Lamina) à plusieurs mois (Litter Bag et Tea Bag). Cela implique au moins deux allers-retours sur sites pour placer et enlever les tests ce qui peut s'avérer contraignant. De plus, cela implique que les sites ne soient

pas soumis à perturbation pendant toute la durée d'exposition, ce qui peut s'avérer compliqué pour les terres agricoles (travaux aux champs).

### 3.6.7 Ressources nécessaires

#### 3.6.7.1 Ressource temporelle et expertise requise

La ressource temporelle et l'expertise nécessaires sont estimées ci-dessous (Tableau 20). La ressource temporelle considère le temps requis par 1 personne pour effectuer le travail pour 1 réplicat. Les temps de trajet pour se rendre sur le terrain, la préparation et mise en place du matériel ne sont pas pris en compte ici.

#### 3.6.7.2 Matériel et coûts estimés

– *Matériel spécifique* : le matériel spécifique requis pour les méthodes fonctionnelles comprend une étuve de séchage (prix moyen 4500 CHF), un four à moufle (prix moyen 6500 CHF) et une balance de précision (0.0001g ; prix moyen 300 CHF) pour le Litter

Bag et le Tea Bag. Pour les Bait Lamina, aucun matériel spécifique n'est requis, excepté les bâtonnets qui sont considérés dans les consommables.

– *Consommables* : les consommables comprennent principalement la paille et toile synthétique pour réaliser les sacs à litière pour le test Litter Bag et les sachets de thé pour le test du Tea Bag. Pour les Bait Lamina, ils comprennent les bâtonnets. Ceux-ci peuvent être achetés déjà remplis avec le mélange d'appât ou alors vides et dans ce cas ils devront être remplis par les soins de l'expérimentateur (Bait Lamina pleins : prix moyen 4.00 CHF par bâtonnet, Bait Lamina vides : prix moyen 3.40 CHF par bâtonnet ; disponibles chez [www.envibiosoil.ch](http://www.envibiosoil.ch) ou [www.terra-protecta.de](http://www.terra-protecta.de), note : le site de terra-protecta n'était plus accessible le 17.10.2022).

Ils peuvent être remplis à nouveau et réutilisés plusieurs fois. Le mélange d'appâts contient de la cellulose, du son de blé et du charbon actif. Son prix brut de revient est d'environ 0.25 CHF pour un réplicat (8 bâtonnets).

Procédure pour 1 réplicat	Durée totale	Durée effective	Expertise
<b>Phase 1 – Pose du test</b>			
<i>Litter Bag</i>	4 à 12 mois	5 minutes	+
<i>Bait Lamina</i>	10 à 20 jours	10 minutes	+
<i>Tea Bag (1x thé vert, 1x roiboos)</i>	3 mois	5 minutes	+
<b>Phase 2 – Récupération du test</b>			
<i>Litter Bag</i>	5 minutes	5 minutes	+
<i>Bait Lamina (16 bâtonnets)</i>	5 minutes	5 minutes	+
<i>Tea Bag (1x thé vert, 1x roibos)</i>	5 minutes	5 minutes	+
<b>Phase 3 – Préparation et Analyse</b>			
<i>Litter Bag – préparation</i>	13 heures	30 minutes	+
<i>Litter Bag – analyse</i>	5 minutes	5 minutes	+
<i>Bait Lamina – préparation</i>	5 minutes	5 minutes	+
<i>Bait Lamina – analyse</i>	15 minutes	15 minutes	+
<i>Tea Bag – préparation</i>	48 heures	5 minutes	+
<i>Tea Bag – analyse</i>	5 minutes	5 minutes	+
<b>TOTAL selon méthode</b>			
<i>Litter Bag</i>	4 à 12 mois	~ 45 minutes	
<i>Bait Lamina</i>	10 à 20 jours	~ 30 minutes	
<i>Tea Bag</i>	3 mois	~ 20 minutes	

Tableau 20 : Ressource temporelle et expertise requise pour les méthodes fonctionnelles (tâche effectuée par 1 personne pour 1 réplicat).

+ = *compétences de base*

1 réplicat = 1 Litter Bag ; ou 16 (ou 8) Bait Lamina ; ou 1 sachet de thé vert + 1 sachet roiboos.

Les coûts suivants sont estimés:

Méthodes fonctionnelles	Prix moyen CHF
<b>Coûts d'investissement</b>	
<i>Litter Bag</i>	11 000.00
<i>Bait Lamina</i>	0.00
<i>Tea Bag</i>	11 500.00
<b>Consommables (1 réplikat)</b>	
<i>Litter Bag</i>	3.00
<i>Bait Lamina pleins (8 bâtonnets) 1</i>	32.00
<i>Alternative : Bait Lamina vides (8 bâtonnets) 1 + mix des constituants d'appâts (env. 1g) pour 8 bâtonnets</i>	27.50
<i>Tea Bag (1x sachet thé vert, 1x sachet thé rooibos)</i>	0.50

Tableau 21 : Coûts estimés pour l'investissement matériel et les consommables pour les méthodes fonctionnelles.

<sup>1</sup> Les Bait Lamina ont été considérés dans les consommables. Du fait qu'ils peuvent être remplis et réutilisés plusieurs fois, ils pourraient aussi être pris en compte dans l'investissement matériel de base (coûts d'investissement). Un set de base pour un certain nombre de sites (50 par exemple) et qui serait réutilisé pour les sites suivants devrait être considéré. Dans ce cas, il faudrait compter 6 800 CHF d'investissement pour les Bait Lamina (50 sites x 5 réplikat à 8 Bait Lamina vides).

Le détail des coûts, fournisseurs et équipement matériel se trouvent en annexe (Annexe 8.2).

## 3.7 Comparaison des paramètres biologiques

### 3.7.1 Communautés d'organismes

La Figure 19 ci-dessous compare les paramètres biologiques en termes de ressources temporelles et de coûts de matériel pour 1 réplicat réalisé par 1 personne selon les évaluations faites dans les différentes sections ci-dessus (chapitre 3).

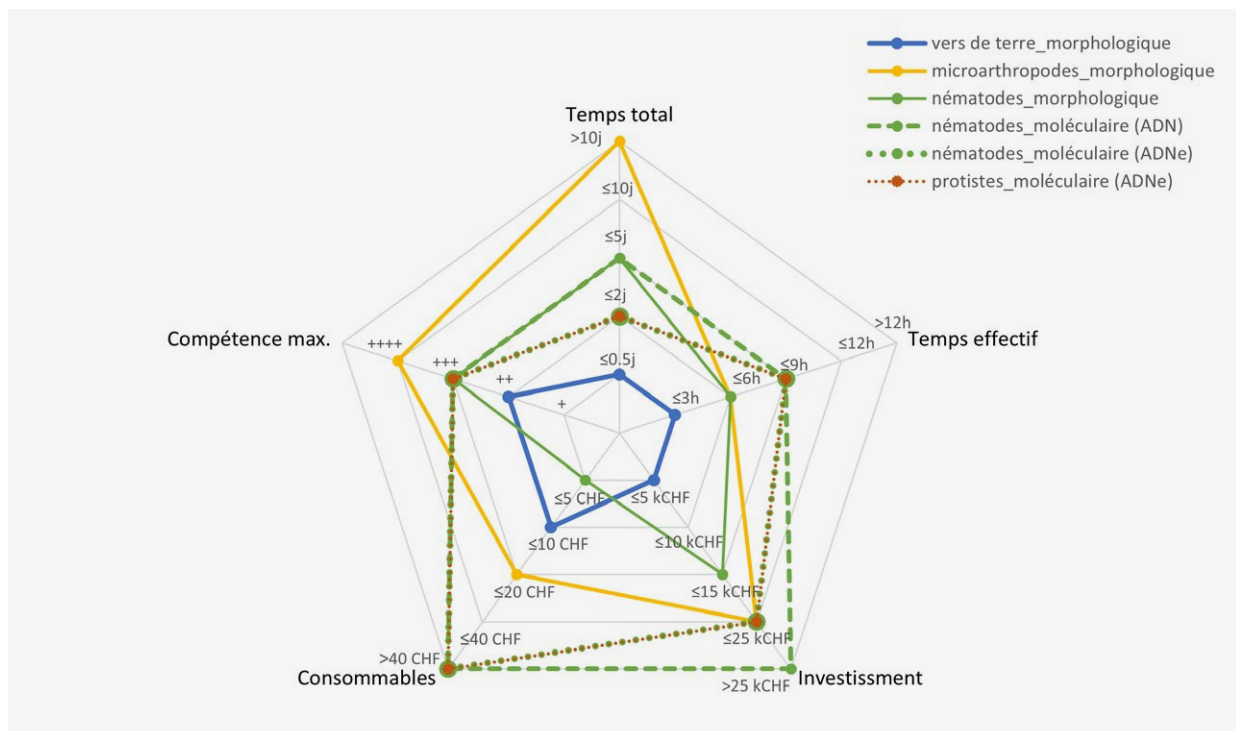


Figure 19 : Comparaison des ressources temporelles (temps total et temps effectif) pour réaliser la méthode dans son entier, des coûts de l'investissement matériel et des coûts des consommables ainsi que de la compétence maximum requise (= le plus haut degré de compétences requis en considérant l'analyse du paramètre biologique dans son entier) pour les paramètres biologiques référencés. La tâche est réalisée par 1 personne pour 1 réplicat. Microarthropodes\_morphologique: l'extraction MacFadyen a été considérée (la plus fréquemment employée et recommandée par l'ISO). Nématodes\_morphologique et nématodes\_moléculaire (ADN): l'extraction Oostenbrink a été considérée (la plus fréquemment employée et recommandée par l'ISO). Nématodes\_moléculaire (ADN), Nématodes\_moléculaire (ADNe) et Protistes\_moléculaire (ADNe): le temps effectif et le temps total pour la prestation de séquençage (service par un prestataire externe) ne sont pas pris en compte ici ; les consommables (dans ce cas, coût pour un échantillon depuis la phase d'extraction d'ADN jusqu'au séquençage) intègrent un service par un prestataire externe, ce qui n'est pas le cas pour les autres paramètres biologiques où toutes les étapes méthodologiques sont réalisées en interne. Une automatisation de la procédure d'extraction d'ADN pour les analyses moléculaires n'est pas considérée ici. Note importante : Les ressources temporelles pour l'analyse moléculaire des nématodes (ADN et ADNe) sont basées sur les ressources temporelles estimées pour les protistes (chap. 3.5.5 et chap. 4.4.2), en considérant l'état de la recherche lors de l'écriture de ce document. En réalité les ressources temporelles pour la détermination des nématodes sont aujourd'hui sensiblement moindres.

### 3.7.2 Méthodes fonctionnelles

La Figure 20 ci-dessous compare les méthodes fonctionnelles en termes de ressources temporelles et de coûts de matériel (tâche réalisée par 1 personne pour 1 réplicat) selon les évaluations faites dans les différentes sections ci-dessus (chapitre 3).

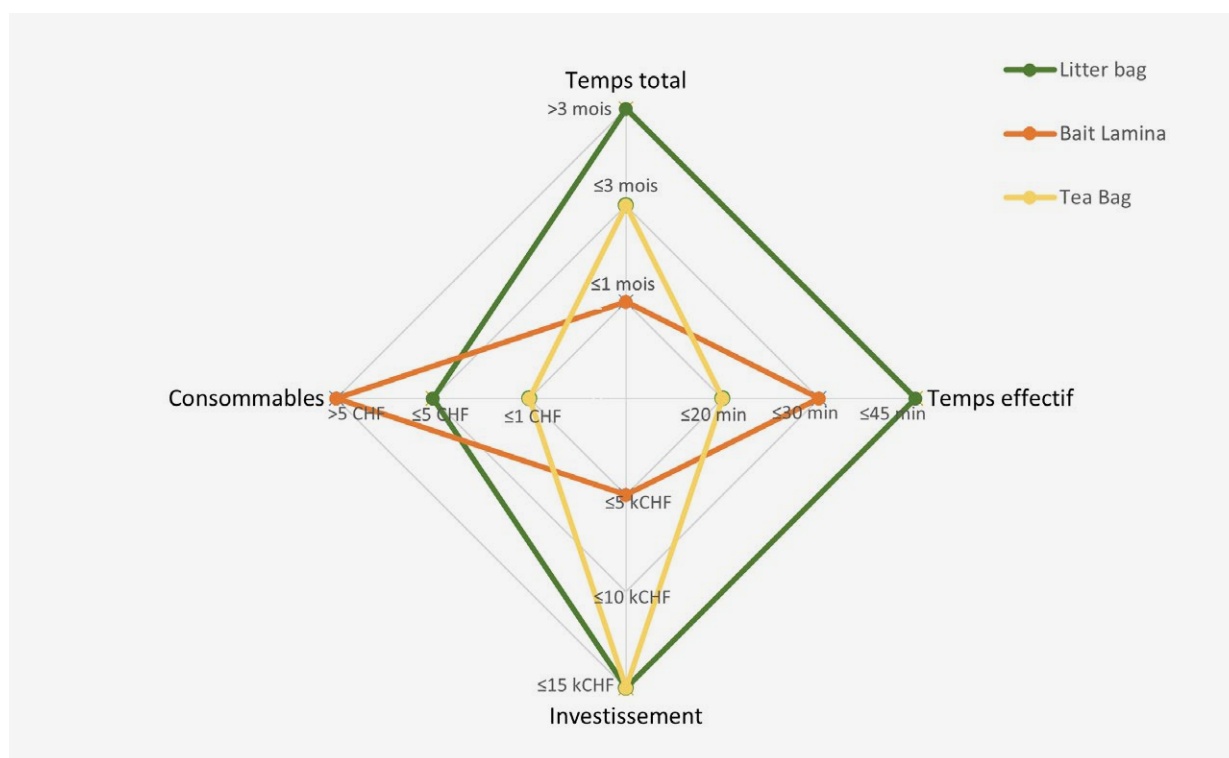


Figure 20 : Comparaison des ressources temporelles (temps total et temps effectif) pour réaliser la méthode dans son entier, des coûts de l'investissement matériel et des coûts des consommables pour 1 réplicat réalisé par 1 personne pour les méthodes fonctionnelles référencées. Les Bait Lamina (bâtonnets déjà remplis) ont été considérés dans les consommables. Etant re-remplissable et réutilisables, ils pourraient aussi être considérés comme un investissement. Le degré de compétences requises est le même pour toutes les méthodes (compétences de base) et n'est donc pas reporté sur le graphique.



## 4. Discussion et Conclusion

Les paramètres biologiques du sol sont utilisés depuis plus d'une trentaine d'années dans un nombre croissant de programmes de surveillance et d'essais sur le terrain en Suisse et en Europe. Ils restent cependant encore peu utilisés en comparaison des paramètres physico-chimiques. Dans ce chapitre, la pertinence des paramètres biologiques répertoriés est discutée en termes de faisabilité de mise en œuvre des méthodes associées pour une cartographie complète des sols de Suisse.

On discutera ici en priorité de choix du/des organismes à intégrer dans la cartographie. Si plusieurs méthodes sont disponibles pour évaluer un même organisme, des recommandations seront faites concernant celle qui semble être la plus adaptée pour la cartographie. A noter que comme montré au chapitre 3, si différentes méthodes existent pour étudier un même organisme, elles restent plutôt unitaires. En effet, le principe de base des méthodologies est en général le même pour l'organisme en question pour le même type d'analyse (morphologique ou moléculaire). La plupart du temps, un standard ISO est disponible pour chaque paramètre biologique, plus particulièrement pour l'analyse morphologique. Ce dernier propose en général une méthode de référence et liste des méthodes alternatives qui sont souvent celles utilisées par les autres programmes de recherche ou de surveillance. L'analyse moléculaire pour les organismes de la pédofaune est en plein essor et doit de ce fait être envisagée comme méthode potentielle pour l'analyse des paramètres biologiques dans la cartographie des sols. Une comparaison des deux types d'analyses (morphologique et moléculaire par metabarcoding d'ADN et d'ADNe) a été faite pour les nématodes afin de mieux cibler les avantages et inconvénients de chacune de ces techniques.

L'orientation du choix de(s) paramètre(s) biologique(s) pour la cartographie doit tenir compte des critères de pertinence et de fréquence d'utilisation des paramètres biologiques dans les programmes

de surveillance et de recherche. En effet, plus la fréquence d'utilisation d'un paramètre biologique parmi les programmes de recherche et de surveillance listés est élevée, plus le potentiel d'avoir des valeurs de comparaison ou un référentiel de base disponible pour ce paramètre biologique sera grand. Des exemples d'application, de référentiel de base ou de valeurs de comparaison établis dans différents pays sont donnés pour les vers de terre. Ils existent aussi en partie pour d'autres organismes (nématodes par exemple) mais ils ne sont pas montrés ci-dessous.

D'autre part et outre ces critères, l'orientation du choix des paramètres biologiques pour la cartographie doit aussi tenir compte des points suivants :

- \_ Ressources nécessaires (coûts et ressource en personnel) pour satisfaire au débit d'échantillons hebdomadaires selon 3 scénarios.
- \_ Combinaison possible de l'échantillonnage des paramètres biologiques entre eux ou avec les paramètres physico-chimiques.

Ces différents critères doivent aussi permettre de définir si le paramètre biologique doit être considéré comme prioritaire ou optionnel pour les 2 types de profils et les sondages mécaniques de la cartographie.

---

## 4.1 Vers de terre

Les vers de terre sont parmi les paramètres biologiques les plus fréquemment employés et remplissent une grande partie des critères de sélection demandés à un bioindicateur. Ils ont une fonction clé au sein de l'écosystème et en tant qu'indicateurs biologiques.

---

### 4.1.1 Avantages et limites du paramètre biologique

Les principaux avantages et limites des vers de terre comme paramètre biologique sont listés ci-dessous :

*Avantages :*

- Importance des vers de terre pour le fonctionnement et la structure de l'écosystème. Ils représentent la macrofaune.
- Les vers de terre représentent la demande la plus faible en coût matériel (consommables et investissement), ressource temporelle et compétence requise en comparaison des autres paramètres biologiques.
- Une grande partie des variables de mesure (réponses données par le paramètre biologique) peut être établie par des non-spécialistes, à contrario d'autres organismes de la pédofaune de plus petites tailles.
- Un référentiel de base (valeurs de référence) est déjà en partie disponible pour des types de sol, type d'utilisation du sol pour des régions de la Suisse et d'autres pays européens.

*Limites :*

- La saisonnalité doit être respectée : les prélèvements s'effectuent au printemps et/ou en automne seulement.
- L'extraction chimique n'est pas applicable à toutes les topographies : les sols avec une forte pente sont difficilement échantillonnables (ruissellement du liquide d'extraction).
- Le prélèvement des vers de terre n'est pas combinable avec l'échantillonnage prévu pour les autres paramètres biologiques.
- Le prélèvement des vers de terre n'est pas combinable avec la prise d'échantillons pour les analyses physico-chimiques.

---

### 4.1.2 Mise en œuvre selon critères établis

La mise en œuvre dans le contexte d'une cartographie des sols est discutée ci-dessous. Les ressources en personnel et les ressources financières (coût matériel des consommables pour la méthode) nécessaires sont établies pour trois scénarios différents, soit pour des débits d'échantillons hebdomadaires de 100, 500, ou 1000 échantillons par semaine (Tableau 22).

Les chiffres ci-dessous se basent sur les estimations en temps et en coût matériel établies dans la partie résultats de ce document (chapitre 3.2.7). Pour les ressources temporelles, ils tiennent compte des phases méthodologiques dans leur globalité (pas de détails donnés sur les différentes étapes constituant les phases). Le calcul considère le temps effectif nécessaire pour analyser 100, 500 ou 1000 échantillons et la ressource en personnel nécessaire pour réaliser la tâche en 1 semaine (semaine à 40 heures). Ces valeurs donnent un ordre de grandeur et permettent d'évaluer, compte tenu de l'état de la technique, les ressources nécessaires. Cependant, celles-ci ne tiennent pas compte des économies d'échelle liées à la réalisation d'un grand nombre d'échantillons. Ci-dessous, le terme «échantillon» est considéré comme l'équivalent du terme «placette de prélèvement» ou «réplicat» utilisé précédemment pour cet organisme.

Au vu des chiffres ci-dessus, le scénario le plus réaliste semble être celui considérant 100 échantillons par semaine. Les ressources en personnel sont cependant assez conséquentes.

Il faut rappeler que pour les vers de terre (et les paramètres biologiques en général), au minimum trois échantillons (réplicats) doivent être considérés par site pour assurer une représentativité des résultats qui soit acceptable. Si l'on considère le

Ressources brutes nécessaires (1 échantillon = vers de terre collectés sur 1 placette de prélèvement) <sup>1</sup>	Nombre d'échantillons hebdomadaires		
	100	500	1000
<b>RESSOURCE HUMAINE (temps effectif)</b>			
<b>Phase 1 – Prélèvement (~ 1 heure/éch.)</b>			
Equivalent plein temps	2.5	12.5	25
<b>Phase 2 – Analyses morphologiques (~ 2 heures/éch.)</b>			
Equivalent plein temps	5	25	50
<b>RESSOURCE MATÉRIELLE</b>			
Coûts des consommables CHF (7.50 CHF/éch.)	750	3750	7500

Tableau 22 : Estimation des ressources humaines brutes nécessaires en termes d'équivalent plein temps et d'investissement matériel (coûts des consommables) pour les vers de terre pour analyser 100, 500 ou 1000 échantillons par semaine (semaine à 40 heures).

<sup>1</sup> Au minimum 3 placettes de prélèvement sont conseillées pour 1 site (1 site = 3 placettes de prélèvement = 3 échantillons).

1 jour = 8h ; 1 semaine = 5 jours

scénario à 100 échantillons, cela représente donc une moyenne de 33 sites à échantillonner par semaine. Les temps de trajets pour se rendre sur site et entre les sites, de même que la phase de préparation de terrain devra être prise en compte en sus. En revanche, lors du prélèvement, il est possible de paralléliser sensiblement l'extraction chimique (2 extractions peuvent être réalisées en parallèle par exemple) ce qui permet de réduire légèrement le temps de prélèvement pour 3 réplisats situés sur le même site. Au dire d'experts, il

est envisageable d'échantillonner 4 sites à 3 réplisats sur une journée si 2 personnes effectuent le travail et que les sites sont suffisamment proches pour la procédure de prélèvement dans son entier (communication personnelle Claudia Maurer, Office de l'agriculture et de la nature du canton de Berne et Claire le Bayon, UniNE).

**100 échantillons = ~33 sites**  
(1 site = 3 placettes de prélèvement)

### 4.1.3 Recommandations d'utilisation pour la cartographie

Les vers de terre sont des indicateurs de référence largement utilisés comme paramètres biologiques pour les sols. Ils permettent la caractérisation de l'état biologique du sol et la caractérisation fonctionnelle des sites et apportent une réponse rapide en cas de modification du milieu. De plus, ils présentent de forts liens avec d'autres paramètres biologiques (p. ex. microbiologie).

Ils devraient, en conséquence, faire partie des paramètres biologiques à mesurer dans une cartographie des sols bien que la phase de prélèvement sur le terrain puisse être contraignante (méthodologie spécifique non combinable avec d'autres analyses). Il n'est cependant pas recommandable de réduire la procédure d'extraction comme l'ont fait les programmes BISQ et AgrINNOV qui n'en appliquent qu'une partie en pratiquant le test à la bêche uniquement. Cela permet en effet un gain de temps sur le terrain, mais cela conduit également à une perte d'information, les vers anéciques n'étant que peu capturés. La méthode d'extraction dans son entier (extraction chimique et manuelle)

devrait donc être réalisée. En comparaison des autres paramètres biologiques, le ver de terre reste celui le moins coûteux financièrement et en temps pour la mise en œuvre (Figure 19 dans le chapitre 3.7.1).

La méthode ISO 23611-1 utilisant l'AITC, moins toxique que le formaldéhyde, devrait être la méthode à prendre en considération, ceci afin de permettre la comparaison des données obtenues avec les référentiels existants ou à venir, et ce également au niveau international. Les recherches montrent en effet que les données obtenues avec l'extraction l'AITC sont comparables à celles obtenues avec le formaldéhyde qui était le standard à l'époque. En revanche, l'extraction chimique doit être réalisée avant le tri manuel, car cette pratique est plus adaptée aux sols tempérés (pour rappel, l'ISO préconise l'inverse). La taille du bloc de sol pour l'extraction manuelle est discutable.

Pour les raisons évoquées et au vu des différentes considérations exposées ci-dessus pour la mise en œuvre, les recommandations pour utiliser les vers de terre comme paramètres biologiques pour les profils ou sondages à grand diamètre pour la cartographie sont les suivantes :

#### Recommandations pour l'utilisation des vers de terre dans la cartographie des sols

##### Méthode recommandée

ISO 23611-1	<ul style="list-style-type: none"> <li>– AITC</li> <li>– Extraction chimique avant extraction manuelle</li> <li>– Taille du bloc de sol pour l'extraction manuelle à discuter (minimum 25 x 25 x 20 cm)</li> <li>– 3 à 5 répliqués (placettes de prélèvement) par site au minimum</li> </ul>
-------------	--

##### Profils établis

Profils de référence :	Prioritaire
Profils guides (Allemand : «Leitprofile»):	Optionnel
Sondages mécaniques :	Non adapté

Tableau 23 : Recommandations pour la cartographie pour les vers de terre.

L'étude des vers de terre devrait se faire en priorité sur tous les profils de référence ou sur une partie d'entre eux selon les ressources à disposition. Si les ressources sont suffisantes, les profils guides devraient être considérés également. Les sondages mécaniques ne sont en revanche pas adaptés au prélèvement des vers de terre. Néanmoins, dans le futur, ils pourraient également convenir au vu des techniques d'analyse moléculaire en développement comme le metabarcoding d'ADN environnemental (ADNe).

#### 4.1.4 Exemples d'application, de valeur de comparaison et de référentiel de base

Le Réseau de Mesure de la Qualité des Sols (RMQS BioDiv) en France est un bon exemple de comment les vers de terre peuvent être utilisés comme paramètres biologiques dans une cartographie des sols. En effet, le RMQS BioDiv a établi une cartographie des paramètres lombriciens pour la région Bretagne. Un exemple d'abondance de vers de terre en nombre d'individus par surface est donné ci-dessous (Figure 21). Des cartes similaires ont également été établies pour l'abondance des vers selon les catégories écologiques, pour la biomasse, la richesse taxonomique, l'indice de diversité (Shannon) et l'équitabilité des vers de terre (Cluzeau, 2009b).

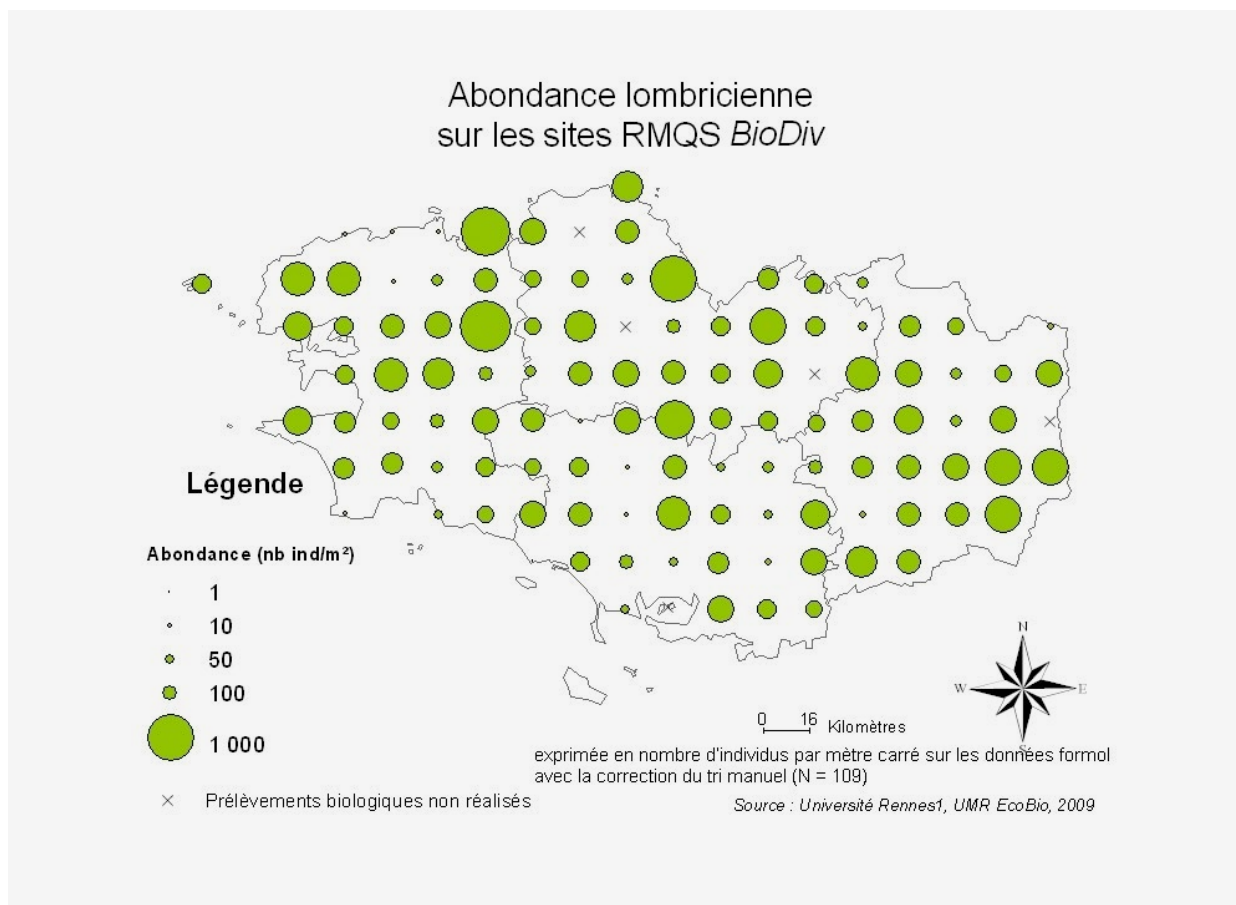


Figure 21 : Cartographie de l'abondance des vers de terre en région Bretagne établie par le programme RMQS BioDiv (<http://www.sols-de-bretagne.fr/biodiversite-des-sols/cartographie-regionale.html> ; Cluzeau, 2009b).

L'hétérogénéité de la distribution spatiale des données peut être en partie expliquée par le type d'utilisation du sol, le type de sol et les propriétés pédologiques. Les paramètres lombriciens ont été confrontés à différentes variables explicatives : paramètres physico-chimiques, occupation des sols,

pratique agricole, caractéristiques pédologiques, etc. Ci-dessous sont donnés deux exemples de relation significative, le premier entre les paramètres lombriciens et les types d'occupation du sol (Figure 22) et le second entre les paramètres lombriciens et l'hydromorphie du sol (Figure 23).

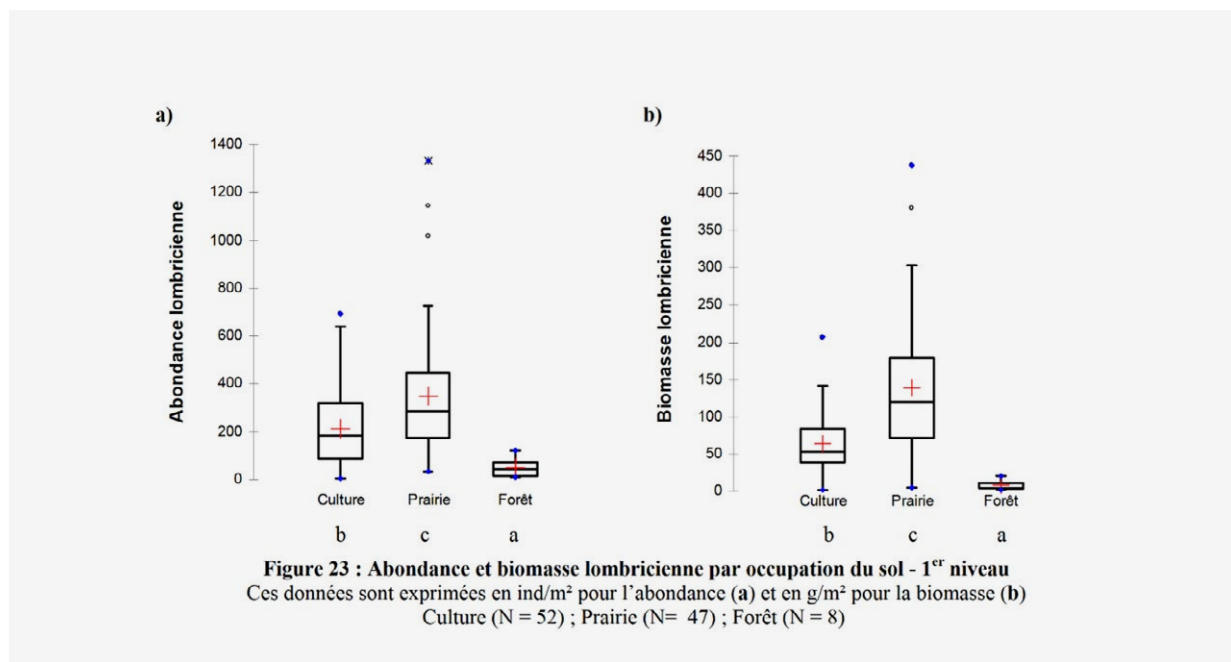


Figure 22 : L'abondance en nombre d'individus et la biomasse des vers de terre discriminent les trois systèmes d'occupation du sol (culture, prairie et forêt) avec des valeurs élevées en prairies (350 ind/m<sup>2</sup>; 138 g/m<sup>2</sup>), moyennes en cultures (215 ind/m<sup>2</sup>; 63 g/m<sup>2</sup>) et faibles en forêts (50 ind/m<sup>2</sup>; 8 g/m<sup>2</sup>), d'après les résultats du programme RMQS BioDiv. (Cluzeau, 2009b).

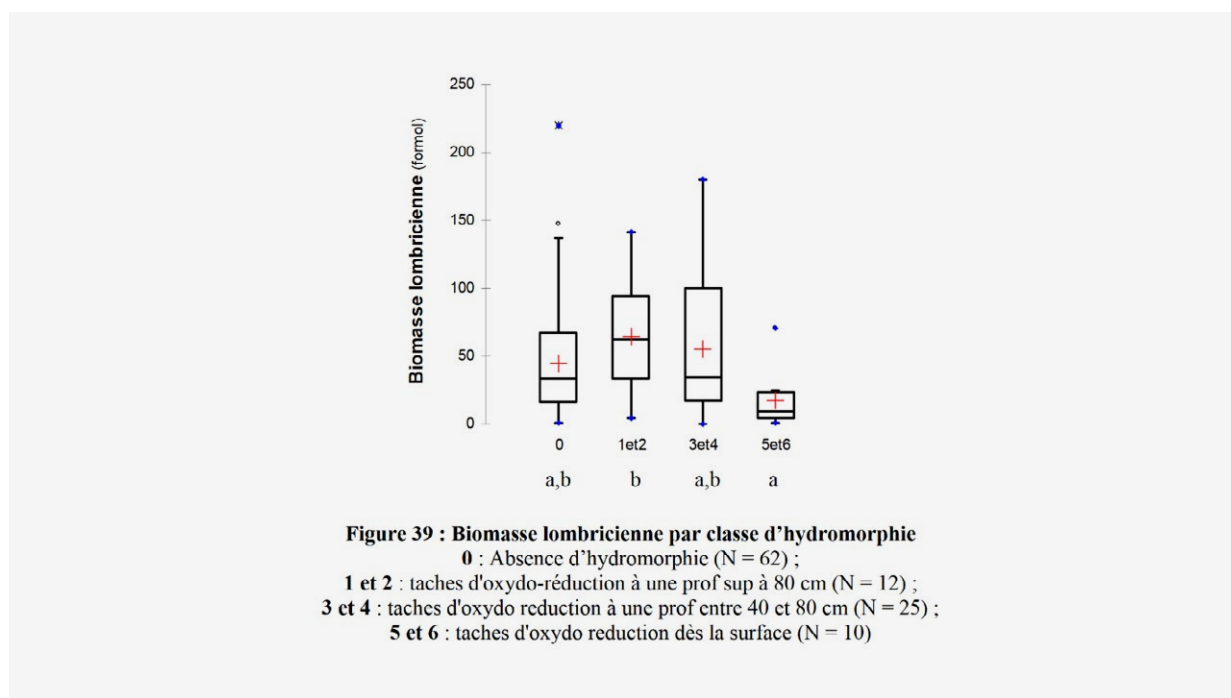


Figure 23 : Biomasse lombricienne par classe d'hydromorphie selon le programme RMQS BioDiv. (Photo: S. Campiche)



Au final, une proposition pour un référentiel de base pour l'abondance des vers de terre a été faite pour la région Bretagne par le programme RMQS BioDiv (Figure 24) (Cluzeau, 2009b).

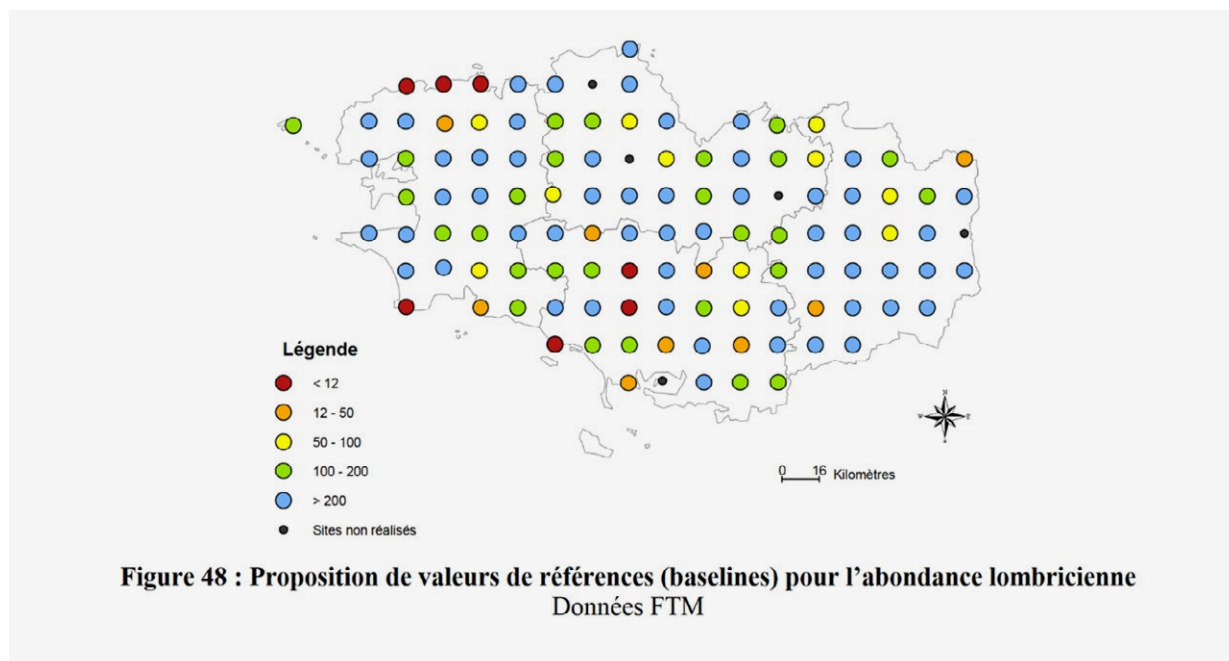


Figure 24 : Proposition d'un référentiel de base pour l'abondance des vers de terre en région Bretagne selon le programme RMQS BioDiv (Cluzeau, 2009b). Les nombres signifient des individus par m<sup>2</sup>.

La Suisse propose également des valeurs de comparaison pour l'abondance des vers de terre selon les types d'occupation du sol (Figure 25) (Pfiffner, 2013).

› Cultures extensives	120-250	vers de terre / m <sup>2</sup>
› Prairies maigres	30-40	vers de terre / m <sup>2</sup>
› Prairies permanentes	200-300	vers de terre / m <sup>2</sup>
› Pâturages extensifs	400-500	vers de terre / m <sup>2</sup>
› Forêt de feuillus	150-250	vers de terre / m <sup>2</sup>
› Forêts de sapins	10-15	vers de terre / m <sup>2</sup>

Figure 25 : Abondance des vers de terre selon le type d'utilisation du sol d'après la fiche technique du FiBL sur les vers de terre (Pfiffner, 2013)

Des valeurs de comparaisons sont aussi proposées plus spécifiquement pour la biomasse lombricienne dans les sols d'herbages par le Groupe de travail Biologie du sol – Application, sur la base des données établies par Cuendet et al. (1997) sur les peuplements lombriciens des prairies permanentes du Plateau Suisse (Figure 26). Les valeurs de comparaison sont valables pour les biomasses lombriciennes des sols aux caractéristiques suivantes : herbages (sols non labourés pendant au moins 10 ans), teneur en humus de 2 à 15%, sols situés sur le Plateau suisse (entre 400 et 800 m d'altitude, précipitations < 1200 mm) (VBB-BSA, 2009).

Une cartographie des sols suisses intégrant les vers de terre comme paramètres biologiques et complétée par les paramètres physico-chimiques de celle-ci permettrait d'établir des valeurs de références.

	Médiane	Minimum	Maximum	Quartile inférieur	Quartile supérieur
<b>Biomasse lombricienne, herbages</b>	[g m <sup>-2</sup> ]				
Toutes les espèces	301	130	515	250	400
Espèces épigées	4	1	20	1	9
Espèces endogées	61	10	171	37	92
Total des espèces anéciques	229	73	497	173	309
- Lumbricus anéciques	105	*	220	63	149
- Nicodrilus anéciques	121	*	365	75	198
<b>Biomasse lombricienne, herbages</b>	[%]				
Espèces épigées	2	1	7	1	4
Espèces endogées	22	2	50	13	30
Total des espèces anéciques	76	48	98	67	85
- Lumbricus anéciques	33	*	70	21	44
- Nicodrilus anéciques	43	*	92	27	60

*Remarque : comme les valeurs de comparaison données ici ont été déterminées à l'aide d'une méthode combinant l'extraction au formol et celle manuelle, les valeurs obtenues par d'autres méthodes ne sont que partiellement comparables.*

Figure 26 : Valeurs de comparaison pour la biomasse lombricienne dans les sols d'herbages (en g m<sup>-2</sup> et % de biomasse d'une certaine groupe écologique du total des espèces de 301 g m<sup>-2</sup>) d'après les données de Cuendet et al. (1997) et évaluées par le Groupe de travail VBBio -BioSA de la Confédération. \* absence du groupe pour des raisons zoogéographiques (VBB-BSA, 2009).

## 4.2 Microarthropodes

Bien que souvent oubliés, les microarthropodes comme les acariens et les collembolés sont pourtant d'importants acteurs des processus de décomposition au niveau des sols, agissant sur les cycles biogéochimiques et la dégradation de la matière organique. Ce sont également des régulateurs de l'activité bactérienne et fongique, dont ils sont les prédateurs. Leur grande abondance et extraordinaire richesse spécifique dans les sols (surtout pour les acariens) amènent un manque de connaissance taxonomique qui rend leur identification à l'espèce difficile, et ce d'autant plus pour un non-expert du domaine. Cela n'empêche pourtant pas que les microarthropodes soient le paramètre biologique le plus utilisé après les vers de terre dans les programmes de recherche et de surveillance.

- \_ Les microarthropodes doivent être extraits rapidement de l'échantillon de sol (au maximum après 4 jours)
- \_ L'identification des acariens par analyse morphologique est complexe et nécessite des compétences d'expert. L'analyse moléculaire pourrait solutionner cette difficulté.
- \_ C'est le paramètre biologique nécessitant le plus de temps en termes de temps total (les méthodes fonctionnelles mises à part), surtout concernant la phase d'extraction des organismes de l'échantillon de sol (10 jours). La préparation des acariens pour l'analyse morphologique prend également un certain temps.

### 4.2.1 Avantages et limites du paramètre biologique

#### Avantages:

- \_ Importance des microarthropodes pour les services rendus aux écosystèmes (cycles des nutriments et production primaire, notamment via les processus de décomposition et le contrôle des parasites, restauration des sols pollués (Cortet, 2010))
- \_ Les microarthropodes représentent la mésofaune et peuvent être différenciés en de nombreux groupes fonctionnels, avec des régimes alimentaires bien diversifiés par exemple.
- \_ Leur identification par analyse moléculaire est en train de se démocratiser (projet de Jürg Enkerli en cours de développement à l'Agroscope par exemple) ce qui permet de pallier les difficultés de l'identification taxonomique par analyse morphologique.

#### Limites:

- \_ L'échantillonnage doit être réalisé de préférence au printemps.
- \_ Le prélèvement des échantillons de sols pour les microarthropodes nécessite de prendre des carottes de sol non perturbées.

### 4.2.2 Mise en œuvre selon critères établis

Comme pour les vers de terre, la mise en œuvre dans le contexte d'une cartographie des sols est discutée ci-dessous (Tableau 24). Les mêmes considérations sont prises en compte, soit les ressources en personnel et les ressources financières nécessaires pour les trois différents scénarios (100, 500, ou 1000 échantillons par semaine).

Les chiffres ci-dessous se basent sur les estimations en temps et en coût matériel établies dans la partie résultats de ce document (chapitre 3.3.7). Pour les ressources temporelles, ils tiennent compte des phases méthodologiques dans leur globalité (aucun détail sur les différentes étapes constituant les phases). La méthode d'extraction MacFadyen et l'analyse morphologique ont été considérées ici (en raison des contraintes temporelles de la revue bibliographique, l'analyse moléculaire par metabarcoding d'ADN n'a pas pu être développée dans les détails pour les microarthropodes ; on peut se référer à l'analyse moléculaire des nématodes et des protistes pour comparaison). Le calcul considère le temps effectif nécessaire pour analyser 100, 500 ou 1000 échantillons et la ressource en personnel nécessaire pour réaliser le travail en 1 semaine (semaine à 40 heures). Ces valeurs

Ressources brutes nécessaires (1 échantillon = 1 tranche de la carotte de sol) <sup>1</sup>	Nombre d'échantillons hebdomadaires		
	100	500	1000
<b>RESSOURCE HUMAINE (temps effectif)</b>			
<b>Phase 1 – Prélèvement (~ 5 min/carotte)</b>			
Equivalent plein temps	0.2	1.0	2.1
<b>Phase 2 – Extraction MacFadyen (~ 5 min/éch.)</b>			
Equivalent plein temps	0.2	1.0	2.1
<b>Phase 3 – Analyse morphologique (4h45/éch.)</b>			
Equivalent plein temps	12	59	119
<b>RESSOURCE MATÉRIELLE</b>			
Coûts des consommables CHF (17.00 CHF/éch.)	1700	8500	17 000

Tableau 24 : Estimation des ressources brutes nécessaire en termes d'équivalent plein temps et d'investissement matériel (coûts des consommables) pour les microarthropodes pour analyser 100, 500 ou 1000 échantillons par semaine (semaine à 40h), en considérant l'extraction MacFadyen et l'analyse morphologique.

<sup>1</sup> Au minimum 3 carottes de sol non perturbées, divisées en 3 tranches, sont conseillées pour 1 site (1 site = 3 carottes de sol à 3 tranches = 9 échantillons).

1 jour = 8h ; 1 semaine = 5 jours ; 1 mois = 4 semaines

donnent un ordre de grandeur et permettent d'évaluer, compte tenu de l'état de la technique, les ressources nécessaires. Cependant, celles-ci ne tiennent pas compte des économies d'échelle liées à la réalisation d'un grand nombre d'échantillons.

Au vu des chiffres ci-dessus, le scénario à 100 échantillons par semaine paraît déjà ambitieux. Uniquement le temps effectif est représenté ici. Pour les microarthropodes, il faut noter que la procédure d'extraction demande plus d'une semaine en temps total. L'analyse morphologique est particulièrement chronophage.

Au minimum, 3 carottes de sol devraient être prélevées par site pour une bonne représentativité des résultats. L'ISO recommande de diviser la carotte en 3 tranches (1 tranche = 1 échantillon), ce qui augmente passablement le temps et les coûts de l'analyse. Un scénario à 100 échantillons représente donc un total d'environ 11 sites à échantillonner.

Pour les microarthropodes, il est possible de paralléliser sensiblement l'étape d'extraction. Un extracteur MacFadyen peut en effet extraire jusqu'à 84 échantillons en même temps (c. à d. 84 positions au total), ce qui permet donc l'extraction des échantillons de 9 sites dans le même process. A noter que le programme Bioindicateur II prélève 4 carottes, mais n'utilise que la première couche de la carotte (tranche 0–5 cm), ce qui permet de diviser par au moins deux le nombre d'échantillons à analyser par site. Il serait intéressant de discuter si et dans quelle mesure cela affecte les résultats obtenus (abondance et diversité des microarthropodes).

**100 échantillons = ~11 sites**  
(1 site = 3 carottes de sol non perturbées x 3 tranches)

### 4.2.3 Recommandations d'utilisation pour la cartographie

Les microarthropodes représentent la mésafaune. Ils viennent donc compléter les données obtenues sur la macrofaune (vers de terre) et la microfaune (nématodes et protistes) et fournissent donc des informations complémentaires dans l'optique d'une évaluation globale de l'état biologique des sols.

La phase de prélèvement sur le terrain nécessite d'échantillonner des carottes de sol non perturbées ce qui peut rendre plus difficile la combinaison avec l'échantillonnage pour d'autres analyses (physico-chimique par exemple). La méthodologie pour l'étude des microarthropodes est une procédure longue en comparaison des autres paramètres biologiques (Figure 19, chapitre 3.7.1). Un des défis sera certainement la planification des différentes étapes méthodologique du début à la fin. En effet, l'extraction des microarthropodes du sol doit se faire de préférence directement après le prélèvement (ou au maximum 4 jours après), et l'extraction MacFadyen des microarthropodes du sol nécessite à elle seule une dizaine de jours. A ce jour, il semble ne pas y avoir de solution disponible commercialement pour le traitement d'un grand volume

d'échantillons (c. à d. un extracteur MacFadyen pour de très gros volumes d'échantillon, par exemple >100 échantillons). Pour de très grands volumes d'échantillons, une optimisation et une automatisation du protocole méthodologique sont à envisager ce qui permettrait de paralléliser et d'alléger la procédure. De plus, le remplacement de l'analyse morphologique par une analyse moléculaire (comme dans le projet de Jürg Enkerli d'Agroscope en cours actuellement), faciliterait aussi l'analyse de la composition des communautés amenant un gain d'information sur la diversité (génétique) des acariens.

La méthode ISO 23611-2 devrait être la méthode à utiliser. Elle recommande l'extraction MacFadyen qui devrait être la technique d'extraction à prendre en considération ici. C'est également le type d'extraction qui a été le plus fréquemment employé dans les divers programmes de surveillance et de recherche utilisant des microarthropodes.

Au vu des différentes considérations exposées ci-dessus pour la mise en œuvre, les recommandations pour utiliser les microarthropodes comme paramètres biologiques pour les profils ou sondages à grand diamètre pour la cartographie sont les suivantes :

#### Recommandations pour l'utilisation des microarthropodes dans la cartographie des sols

##### Méthode recommandée

ISO 23611-4	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Extraction MacFadyen</li> <li>– Analyse morphologique à mettre en balance avec l'analyse moléculaire en développement (non traitée ici)</li> <li>– Minimum 3 carottes par site ; nombre de tranches de sol à discuter</li> </ul>
-------------	---

##### Profils établis

Profils de référence : Prioritaire

Profils guides : Optionnel

Sondages mécaniques : Seulement si prise d'échantillons non perturbés (carotte de sol intact)

Tableau 25 : Recommandations pour la cartographie pour les microarthropodes.

L'étude des microarthropodes devrait se faire en priorité sur tous les profils de référence ou sur une partie d'entre eux selon les ressources à disposition. Si les ressources sont suffisantes, les profils guides devraient être considérés également. Dans le cas où les sondages mécaniques permettraient le prélèvement de carottes de sol intact, l'étude des microarthropodes pourrait être envisagée pour

une partie d'entre eux. Les sondages mécaniques pourraient aussi être utilisés dans le cas où le développement des techniques de metabarcoding d'ADN ou d'ADN environnemental (ADNe) et l'interprétation des données associées pour ces organismes évoluent rapidement (p. ex. disponibilité d'une bibliothèque de référence).

## 4.3 Nématodes

Les nématodes sont essentiels à la vie du sol et jouent un rôle clé dans la chaîne trophique (régulation des microorganismes). En fonction de leur régime alimentaire, les nématodes peuvent être classés en différents groupes trophiques reflétant une des fonctionnalités du sol. Ils sont considérés comme étant de bons bioindicateurs et sont fréquemment employés dans de nombreux programmes de surveillance et de recherche.

### 4.3.1 Avantages et limites du paramètre biologique

#### Avantages:

- Importance des nématodes pour le fonctionnement du sol. Différents groupes trophiques (régimes alimentaires) reflètent les fonctionnalités du sol.
- Paramètre biologique déjà passablement utilisé et étudié pour caractériser le fonctionnement biologique des sols.
- Une seule analyse fournit un grand nombre d'informations (niveau d'activité biologique globale, disponibilité des nutriments, stabilité / niveau de perturbation du sol, etc.). Plusieurs indices peuvent être calculés pour ce bioindicateur et renseignent sur le fonctionnement biologique et l'état des sols étudiés (chapitre 3.4.5).

- Référentiel de base déjà en partie disponible, indices existants.
- L'identification par analyse moléculaire avec metabarcoding d'ADN est déjà passablement avancée et celle par metabarcoding d'ADNe est en cours de développement.
- Prise d'échantillons (échantillon composite) combinable avec celle pour les analyses physico-chimiques et autres paramètres biologiques comme les protistes ou microorganismes (bactéries et champignons) car le prélèvement d'un échantillon non perturbé n'est pas requis.
- Possibilité de congeler les échantillons de sol dans le cas d'une analyse moléculaire par metabarcoding d'ADNe.

#### Limites:

- Le prélèvement d'échantillon de sol devrait être réalisé de préférence au printemps et en automne (mais peut se faire toute l'année).
- Les nématodes doivent être extraits relativement rapidement de l'échantillon de sol (dans les 15 jours après prélèvement de l'échantillon de sol) dans le cas d'une analyse morphologique ou d'analyse moléculaire par metabarcoding d'ADN (ne pas le cas pour metabarcoding d'ADNe où le temps est moins critique).



### 4.3.2 Mise en œuvre selon critères établis

La mise en œuvre dans le contexte d'une cartographie des sols est discutée ci-dessous (Tableau 26 et Tableau 27). Elle considère les ressources en personnel et les ressources financières nécessaires pour les trois différents scénarios établis, soit 100, 500, ou 1000 échantillons par semaine.

Les chiffres ci-dessous se basent sur les estimations en temps et en coût matériel établies dans la partie résultats de ce document (chapitre 3.4.7). Pour les ressources temporelles, ils tiennent compte des

phases méthodologiques dans leur globalité (aucun détail sur les différentes étapes constituant les phases). L'analyse morphologique (élutriation Oostenbrink et tamisage/filtration) et l'analyse moléculaire (metabarcoding d'ADN et d'ADNe) sont comparées ci-dessous. Le calcul considère le temps effectif nécessaire pour analyser 100, 500 ou 1000 échantillons et la ressource en personnel nécessaire pour réaliser le travail en 1 semaine (semaine à 40 heures). Ces valeurs donnent un ordre de grandeur et permettent d'évaluer les ressources nécessaires, compte tenu des techniques les plus fréquemment employées. Cependant, celles-ci ne tiennent pas compte des économies d'échelle liées à la réalisation d'un grand nombre d'échantillons (voir plus bas).

#### Analyses morphologiques

Ressources brutes nécessaires (1 échantillon = 1 échantillon composite, 25–32 carottes de sol) <sup>1</sup>	Nombre d'échantillons hebdomadaires		
	100	500	1000
<b>RESSOURCE HUMAINE (temps effectif)</b>			
<b>Phase 1 – Prélèvement (~ 1 heure/éch.)</b>			
Equivalent plein temps	2.5	12.5	25.0
<b>Phase 2 – Extraction Oostenbrink (~15 min./éch.)</b>			
Equivalent plein temps	0.6	3.1	6.3
<b>Phase 3 – Analyse morphologique (~ 3 heures/éch.)</b>			
Equivalent plein temps	7.5	37.5	75.0
<b>RESSOURCE MATÉRIELLE</b>			
Coûts des consommables CHF (5.00 CHF/éch.)	500	2500	5000

Tableau 26 : Estimation des ressources brutes nécessaires en termes d'équivalent plein temps et d'investissement matériel (coûts des consommables) pour les nématodes pour analyser 100, 500 ou 1000 échantillons par semaine (semaine à 40h), en considérant l'analyse morphologique.

<sup>1</sup> Selon les méthodes, entre 25 et 32 carottes (ø 2.3 à 7 cm, longueur 10 à 15 cm) pour 100 m<sup>2</sup> formant un échantillon composite, sont conseillées pour 1 site. Une fraction seulement de l'échantillon composite est utilisée pour l'extraction des nématodes, en général entre 100 et 500 g de sol (1site = échantillon composite à 25-32 carottes de sol (-> prélèvement d'une fraction) = 1 échantillon)

1 jour = 8h ; 1 semaine = 5 jours ; 1 mois = 4 semaines

## Analyses moléculaires (metabarcoding d'ADN et d'ADNe)

Ressources brutes nécessaires (1 site = 1 échantillon composite à 8 carottes de sol) <sup>1</sup>	Nombre d'échantillons hebdomadaires		
	100	500	1000
<b>RESSOURCE HUMAINE (temps effectif)</b>			
<b>Phase 1 – Prélèvement (~ 10 min/éch.)</b>			
Equivalent plein temps	0.4	2.1	4.2
<b>Phase 2 – Extraction Oostenbrink (~ 15 min/éch.) <sup>2</sup></b>			
Equivalent plein temps	0.6	3.1	6.3
<b>Phase 3 – Extraction génomique (~ 2 heures/éch.)</b>			
Equivalent plein temps	5	25	50
<b>Phase 4 – Analyse moléculaire (~ 6 heures/éch.)</b>			
Equivalent plein temps	<< 15 <sup>3</sup>	<< 75 <sup>3</sup>	<< 150 <sup>3</sup>
<b>RESSOURCE MATÉRIELLE</b>			
Coûts des consommables CHF (45.00 CHF/éch.)	4 500	22 500	45 000

Tableau 27 : Estimation des ressources brutes nécessaire en termes d'équivalent plein temps et d'investissement matériel (coûts des consommables) pour les nématodes pour analyser 100, 500 ou 1000 échantillons par semaine (semaine à 40h), en considérant l'analyse moléculaire.

<sup>1</sup> Huit carottes formant un échantillon composite sont conseillées pour 1 site (1site = échantillon composite à 8 carottes de sol (-> prélèvement d'une fraction) = 1 échantillon)

<sup>2</sup> Seulement dans le cas du metabarcoding d'ADN.

<sup>3</sup> Ces données sont basées sur les ressources temporelles estimées pour les protistes (chap. 3.5.5 et chap. 4.4.2), en considérant l'état de la recherche lors de l'écriture de ce document. En réalité les ressources temporelles pour la détermination des nématodes sont aujourd'hui sensiblement moindres.

1 jour = 8h ; 1 semaine = 5 jours ; 1 mois = 4 semaines

De même que pour les autres paramètres biologiques, le scénario à 100 échantillons par semaine paraît être le plus adapté parmi les 3 scénarios envisagés.

La comparaison des deux méthodes utilisant soit l'analyse morphologique soit l'analyse moléculaire par metabarcoding d'ADN des nématodes (voir aussi Figure 19, chapitre 3.7.1) montre que la méthode par analyse morphologique n'est pas aussi chronophage qu'il n'y paraît. Pour le metabarcoding d'ADN, le fait que les nématodes doivent être extraits de l'échantillon de sol avant de procéder à l'analyse rajoute une étape supplémentaire au processus méthodologique et demande donc du temps en plus. L'analyse moléculaire par metabarcoding d'ADNe (analyse moléculaire des nématodes directement à partir de l'échantillon de sol comme pour les bactéries, champignons ou protistes) permet un

gain de temps, puisque l'étape d'extraction des nématodes du sol n'est pas nécessaire. Cette méthode est actuellement encore en développement. Si l'analyse morphologique demande plusieurs heures afin de parvenir à identifier sous le microscope les nématodes à l'espèce (de même que des compétences de spécialiste pour y parvenir), l'analyse moléculaire requiert aussi quelques heures afin d'effectuer le traitement des séquences de données ADN (vérification de la qualité, tri pour éliminer les séquences de données non utilisables) et pour l'interprétation (assignation taxonomique des séquences d'ADN identifiées, analyse de communautés et de diversité). Une fois les données de références pour les séquences de bases établies, le développement d'algorithmes de traitement de données permet de gagner en rapidité. L'analyse moléculaire permet d'avoir une vision très précise de la diversité (génétique) des nématodes.

## 100 échantillons = 100 sites (1 site = échantillon composite à 25 – 32 carottes (morphologique) ou 8 carottes (moléculaire))

Pour l'analyse morphologique et l'analyse moléculaire, 1 échantillon composite est prélevé par site. Un scénario à 100 échantillons représente donc un total d'environ 100 sites à échantillonner. Pour les deux types d'analyses, il est possible de paralléliser sensiblement l'étape d'extraction des nématodes du sol en début de procédure. En effet, l'élutriation Oostenbrink dure peu de temps et plusieurs élutriations peuvent être réalisées en parallèle selon le nombre d'élutriateurs à disposition. Par la suite, un grand nombre d'échantillons peuvent être traités en parallèle pour la phase de tamisage/filtration qui requiert plusieurs jours de temps d'attente. Pour la méthode moléculaire, il est aussi possible d'extraire l'ADN de plusieurs échantillons en parallèle lors de la phase d'extraction génomique ce qui permet de réduire sensiblement le temps par échantillon. Certains instruments de laboratoire permettent aussi l'automatisation de la procédure d'extraction d'ADN et de traiter par exemple jusqu'à 96 échantillons en parallèle.

### 4.3.3 Recommandations d'utilisation pour la cartographie

Les nématodes sont un paramètre biologique fréquemment employé pour l'étude de la qualité du sol et devraient faire partie de la cartographie des sols. Ils sont également intéressants du point de vue du prélèvement sur le terrain, car la prise de l'échantillon peut être combinée à d'autres prises d'échantillons ne nécessitant pas une carotte de sol intact (par exemple, la prise d'échantillons pour d'autres paramètres biologiques comme les profistes et les microorganismes et celle pour certaines analyses physico-chimiques).

Concernant l'extraction des nématodes du sol (analyse morphologique ou moléculaire par metabarcoding d'ADN), celle-ci devrait se faire par élutriation Oostenbrink (telle que décrite dans la

méthode ISO 23611-4 par exemple). C'est le type d'extraction qui a été le plus fréquemment employé dans les divers programmes de surveillance et de recherche utilisant des nématodes. C'est aussi la technique qui est jugée la plus efficace en termes d'efficacité et de qualité d'extraction des formes mobiles de nématodes du sol. Elle permet également de traiter les plus grands volumes d'échantillons et est donc bien adaptée pour une analyse de routine. Pour la suite de la procédure d'extraction, l'ISO recommande une étape de tamisage/filtration. Une extraction de type Baermann peut également être envisagée.

Le choix entre une analyse de type morphologique ou moléculaire peut être débattu. L'analyse morphologique demande, selon les méthodes répertoriées, le prélèvement d'un plus gros volume d'échantillon de sol (25 à 32 carottes par site) en comparaison de l'analyse moléculaire (8 carottes par site). C'est une analyse bien établie, utilisée dans de nombreux programmes de recherche. Des valeurs de comparaison sont déjà disponibles et un référentiel de base commence à émerger dans certains pays. De plus, elle permet le calcul de nombreux indices qui renseignent sur le fonctionnement biologique et l'état des sols étudiés. Cependant, tout comme pour l'analyse moléculaire par metabarcoding d'ADN, elle nécessite l'utilisation d'échantillon de sol frais et l'extraction des nématodes doit être faite dans les jours qui suivent le prélèvement pour éviter que les nématodes ne meurent.

L'analyse moléculaire par metabarcoding d'ADN (en phase de développement au WSL par Beat Frey), est réalisée sur des échantillons de sol congelés, ce qui permet de stocker les échantillons après prélèvement et de différer l'analyse dans le temps. Elle a aussi comme avantage de pouvoir se passer de l'étape d'extraction des nématodes du sol (formes mobiles uniquement) en procédant à l'isolation de l'ADN directement à partir des échantillons de sol collectés. Elle permet donc aussi l'identification des stades kystiques ou immobiles

des nématodes. L'analyse moléculaire par meta-barcoding d'ADN ou d'ADNe livre des données sur la diversité génétique des nématodes et sur la structure et composition des communautés. Cependant, une analyse morphologique sous microscope est toujours nécessaire à l'heure actuelle pour évaluer l'abondance des individus (nombre d'individus) ou le calcul d'indices comme l'indice de maturité.

Au vu des différentes considérations exposées ci-dessus pour la mise en œuvre, les recommandations pour utiliser les nématodes comme paramètres biologiques pour les profils ou sondages à grand diamètre pour la cartographie sont les suivantes :

L'étude des nématodes devrait se faire sur tous les profils de référence ou sur une partie d'entre eux selon les ressources à disposition. Du fait du mode de prélèvement des échantillons de sol pour les nématodes, leur étude est également possible avec les sondages mécaniques ou en tout cas pour un certain nombre d'entre eux. Le nombre de carottes qu'il sera possible de prélever lors des sondages mécaniques pour la cartographie des sols pourrait aussi orienter le choix vers le type d'analyses réalisables, puisque 3 à 4 fois plus de prélèvements sont requis pour l'analyse morphologique comparé à une analyse moléculaire (pour un échantillon composite). Si les ressources sont suffisantes, les profils guides pourraient aussi être considérés pour l'étude des nématodes.

**Recommandations pour l'utilisation des nématodes dans la cartographie des sols**

**Méthode recommandée**

ISO – Élutriation Oostenbrink puis tamisage/filtration ou Baermann (à discuter)  
 – Analyse moléculaire ou morphologique à discuter

**Profils établis**

Profils de référence : Prioritaire

Profils guides : Optionnel

Sondages mécaniques : Prioritaire

Tableau 28: Recommandations pour la cartographie pour les nématodes.

---

## 4.4 Protistes

Avec les nématodes, les protistes sont parmi les principaux représentants de la microfaune du sol. Bien que moins étudiés que certains autres organismes de la faune du sol, les protistes jouent également un rôle fondamental dans les processus de dégradation de la matière organique et dans le cycle des nutriments par exemple.

---

### 4.4.1 Avantages et limites du paramètre biologique

*Avantages :*

- Importance des protistes pour le fonctionnement du sol. Ils peuvent être classés en 4 grands groupes écologiques fonctionnels d'importance (les phagotrophes, les symbiotiques, les saprotrophes, et les phototrophes ou mixotrophes).
- L'identification par analyse moléculaire (metabarcoding d'ADNe) s'est démocratisée ces dernières années pour les protistes et un référentiel de base sur la diversité génétique et composition des communautés est en cours de développement.
- Prise d'échantillons (échantillon composite) combinable avec celle pour les analyses physico-chimiques et autres paramètres biologiques comme les nématodes ou microorganismes (bactéries et champignons) car le prélèvement d'un échantillon non perturbé n'est pas requis.

*Limites :*

- Les prélèvements se font de préférence au printemps et en automne.
- Référentiel de base encore à compléter.
- Méthode encore non normée.

---

### 4.4.2 Mise en œuvre selon critères établis

La mise en œuvre dans le contexte d'une cartographie des sols est discutée ci-dessous (Tableau 29). Elle considère les ressources en personnel et les ressources financières nécessaires pour les trois différents scénarios établis, soit 100, 500, ou 1000 échantillons par semaine.

Les chiffres ci-dessous se basent sur les estimations en temps et en coût matériel établies dans la partie résultats de ce document (chapitre 3.5.5). Pour les ressources temporelles, ils tiennent compte des phases méthodologiques dans leur globalité (aucun détail sur les différentes étapes constituant les phases). Le calcul considère le temps effectif nécessaire pour analyser 100, 500 ou 1000 échantillons et la ressource en personnel nécessaire pour réaliser le travail en 1 semaine (semaine à 40 heures). Ces valeurs donnent un ordre de grandeur et permettent d'évaluer, compte tenu de l'état de la technique, les ressources nécessaires. Cependant, celles-ci ne tiennent pas compte des économies d'échelle liées à la réalisation d'un grand nombre d'échantillons.

Ressources brutes nécessaires (1 site = 1 échantillon composite à 3 carottes de sol) <sup>1</sup>	Nombre d'échantillons hebdomadaires		
	100	500	1000
<b>RESSOURCE HUMAINE (temps effectif)</b>			
<b>Phase 1 – Prélèvement (~ 5 min/éch.)</b>			
Equivalent plein temps	0.2	1.0	2.1
<b>Phase 2 – Extraction génomique (~ 2 heures/éch.)</b>			
Equivalent plein temps	5 <sup>2</sup>	25 <sup>2</sup>	50 <sup>2</sup>
<b>Phase 3 – Analyse moléculaire (~ 6 heures/éch.)</b>			
Equivalent plein temps	15 <sup>2</sup>	75 <sup>2</sup>	150 <sup>2</sup>
<b>RESSOURCE MATÉRIELLE</b>			
Coûts des consommables (45.00 CHF/éch.)	4500	22500	45000

Tableau 29 : Estimation des ressources brutes nécessaires en termes d'équivalent plein temps et d'investissement matériel (coûts des consommables) pour les protistes pour analyser 100, 500 ou 1000 échantillons par semaine (semaine à 40h).

<sup>1</sup> Au minimum 3 carottes de sol formant un échantillon composite sont conseillées pour 1 site (1site = échantillon composite à 3 carottes de sol = 1 échantillon).

<sup>2</sup> Information transmise par Prof. Dr. Thierry Heger en l'état actuel de la recherche documentaire. A l'avenir les ressources temporelles devraient tendre à se réduire considérablement.

1 jour = 8h ; 1 semaine = 5 jours ; 1 mois = 4 semaines

Au vu des chiffres ci-dessus, le scénario à 100 échantillons par semaine semble être le plus réaliste parmi les 3 scénarios envisagés.

Un échantillon composite à 3 carottes est prélevé par site. Un scénario à 100 échantillons représente donc un total d'environ 100 sites à échantillonner. A dire d'expert, il est possible d'extraire l'ADN de plusieurs échantillons en parallèle lors de la phase d'extraction génomique ce qui permet de réduire sensiblement le temps par échantillon. Il est estimé

que 20 à 25 échantillons peuvent être extraits en une journée (communication personnelle Thierry Heger, Changins). Comme déjà mentionné pour les nématodes (chapitre 4.3), certains instruments de laboratoire permettent maintenant l'automatisation de la procédure d'extraction d'ADN et le traitement de jusqu'à 96 échantillons en parallèle, par exemple.

**100 échantillons = ~100 sites**  
(1 site = échantillon composite à 3 carottes de sol)



### 4.4.3 Recommandations d'utilisation pour la cartographie

L'analyse des communautés de protistes du sol est un domaine en pleine expansion qu'il serait intéressant d'intégrer dans une cartographie des sols. La mise en œuvre de la méthodologie globale pour étudier les protistes reste avantageuse surtout concernant les ressources temporelles, coûts matériel et compétence requise (cas où le séquençage est réalisé par un prestataire externe). Au vu du volume d'échantillons qui devrait être analysé dans le cadre d'une cartographie des sols, il serait intéressant d'établir une projection pour la mise en œuvre incluant l'étape de séquençage de l'ADN en procédure interne. De plus, pour les protistes, la phase de prélèvement sur le terrain est aussi avantageuse, car elle requiert la prise d'un échantillon composite, ce qui peut être réalisé en combinaison

avec la prise d'échantillons pour d'autres paramètres biologiques comme les nématodes et les micro-organismes et celle pour certaines analyses physico-chimiques.

La méthode pour étudier les protistes du sol ne fait actuellement pas encore l'objet d'une norme (comme un standard ISO par exemple). Elle devrait donc être le sujet de discussions plus approfondies afin de s'accorder sur la méthodologie qui permette au mieux de s'harmoniser et de comparer les données au niveau national mais aussi international par la suite.

Au vu des différentes considérations exposées ci-dessus pour la mise en œuvre, les recommandations pour utiliser les protistes comme paramètres biologiques pour les profils ou sondages à grand diamètre pour la cartographie sont les suivantes:

#### Recommandations pour l'utilisation des protistes dans la cartographie des sols

##### Méthode recommandée

En priorité de la recherche Suisse	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Analyse moléculaire (ADN ou ADNc)</li> <li>– Pas de norme actuellement disponible ;</li> <li>– Harmonisation nécessaire : discussion d'experts pour définir dans les détails la méthodologie</li> </ul>
------------------------------------	--

##### Profils établis

Profils de référence :	Prioritaire
Profils guides :	Optionnel
Sondages mécaniques :	Prioritaire

Tableau 30 : Recommandations pour la cartographie pour les protistes.

Du fait du mode de prélèvement des échantillons de sol pour les protistes, leur étude est réalisable avec les sondages mécaniques. Ce sont, avec les nématodes, les seuls paramètres biologiques pour la pédofaune pour lesquels cela est possible. L'étude des protistes devrait donc se faire en priorité sur les sondages mécaniques ou sur une partie d'entre eux, selon les ressources à disposition. L'étude des nématodes sur les profils de référence doit également être considérée comme base de référence. Si les ressources sont suffisantes, les profils guides devraient être considérés également.

## 4.5 Méthodes fonctionnelles

Les méthodes fonctionnelles, comme leur nom l'indique, cherchent à évaluer les contributions des organismes du sol au fonctionnement des sols et services écosystémiques. Pour la pédofaune, la plupart se focalisent sur la mesure ou l'observation de la dégradation de la matière organique. En délivrant une information de type fonctionnelle, elles viennent de ce fait compléter les informations obtenues par les paramètres biologiques renseignant sur la structure et la composition des communautés de l'écosystème sol.

### 4.5.1 Avantages et limites du paramètre biologique

*Avantages:*

- \_ Fournissent des informations sur les fonctions de l'écosystème.
- \_ Des compétences basiques suffisent pour toutes les étapes de la procédure méthodologique pour la mise en œuvre. Les méthodes fonctionnelles demandent donc des compétences moins poussées que celles requises pour l'étude des communautés d'organismes par exemple.
- \_ La plupart des méthodes fonctionnelles ne nécessitent que peu de matériel et un faible coût en consommables.
- \_ La plupart des méthodes fonctionnelles décrites dans ce document sont normées (norme ISO pour le Bait Lamina et document OECD pour le Litter Bag). Pour le Tea Bag, une procédure méthodologique harmonisée, mais non normée a été établie (Tea Bag Index).
- \_ Référentiel de base en développement pour le Tea Bag.

*Limites:*

- \_ Les méthodes fonctionnelles nécessitent de rester en place sur le terrain plusieurs jours à plusieurs mois. Cela implique de s'assurer que le site ne sera pas soumis à perturbations (travaux aux champs par exemple).

- \_ Elles impliquent au moins 2 visites sur le terrain (pose et retrait du test).
- \_ Les conditions climatiques (humidité, température) ont une grande influence sur le taux de dégradation de la matière organique et donc influencent fortement les résultats des tests fonctionnels.
- \_ Peu de données de références existent à ce jour pour le Bait Lamina. Il n'y a pas de durée fixe pour l'exposition des Bait Lamina aux organismes dans le sol. L'ISO considère qu'un minimum de 30% d'activité devrait être atteint avant de pouvoir retirer les bâtonnets (soit environ 10 à 20 jours d'exposition en zone tempérée et selon les conditions climatiques).
- \_ Du fait de la nature du processus méthodologique (enfouissement de la matière organique), elles ne peuvent pas être combinées avec l'échantillonnage prévu pour les autres paramètres biologiques ou paramètres physico-chimiques.

### 4.5.2 Mise en œuvre selon critères établis

La mise en œuvre des méthodes fonctionnelles dans le contexte d'une cartographie des sols est discutée ci-dessous. Du fait du processus méthodologique particulier (exposition sur le terrain) des méthodes fonctionnelles, les scénarios à 100, 500, ou 1000 échantillons par semaine sont difficilement applicables. Cependant, une estimation peut être faite quant au nombre de sites sur lesquels les tests fonctionnels peuvent être posés par semaine. En comptant 5 réplicats par sites, il est envisageable de poser les méthodes fonctionnelles sur 6 sites en une journée (1 personne) pour autant qu'ils ne soient pas trop distants les uns des autres, ce qui amène à un total d'environ 30 sites par semaine. Les 3 méthodes nécessitent moins d'une heure de temps effectif pour la mise en œuvre dans son entier.

**~ 30 sites par semaine  
(5 réplicats par site)**

### 4.5.3 Recommandations d'utilisation pour la cartographie

Les mesures fonctionnelles amènent des informations d'importance et viennent compléter les données sur la structure et diversité de l'écosystème sol obtenues avec les autres paramètres biologiques. Elles ont donc aussi leur place dans une cartographie en tant qu'indicateur de fonctions de l'écosystème.

Trois méthodes fonctionnelles principales sont à disposition. Le Litter Bag et le Tea Bag permettent une mesure directe de la dégradation de la matière organique par les organismes du sol. La mesure est indirecte pour le Bait Lamina. En termes de durée d'exposition, le Bait Lamina est celui qui livre une réponse le plus rapidement (10 à 20 jours),

suivi du Tea Bag (90 jours ou 3 mois) et du Litter Bag (6 à 12 mois). Le Tea Bag cible plutôt l'action des microorganismes et de la mésofaune alors que le Bait Lamina cible celle de la méso- et macrofaune.

La méthode Bait Lamina est normée (Standard ISO) et un document OECD existe pour le Litter Bag. Le Tea Bag ne fait pas encore l'objet d'une norme, mais une méthode harmonisée existe, celle-ci étant partie intégrante du projet transnational FertilCrop. Un référentiel de base est en cours de constitution (Tea Bag index).

Les recommandations pour utiliser les méthodes fonctionnelles comme paramètres biologiques pour les profils ou sondages à grand diamètre pour la cartographie sont les suivantes :

#### Recommandations pour l'utilisation des méthodes fonctionnelles dans la cartographie des sols

##### Méthode recommandée

Tea Bag ou Bait Lamina	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Tea Bag: simple à mettre en œuvre, mais temps d'exposition sur le terrain relativement long, pas de norme disponible pour l'instant, mais méthode harmonisée (programme FertilCrop), référentiel de base en cours de création (Tea bag index)</li> <li>– Bait Lamina: réponse rapide, norme ISO à disposition, influence des facteurs climatiques (humidité, température) à prendre en considération, référentiel de base encore peu développé, méthode faisant partie du set de base méthodologique recommandé par le programme Eco-FINDERS.</li> </ul>
------------------------	---

##### Profils établis

Profils de référence : Prioritaire

Profils guides : Optionnel

Sondages mécaniques : Non adapté

Tableau 31 : Recommandations pour la cartographie pour les méthodes fonctionnelles.

L'utilisation des méthodes fonctionnelles pour la cartographie des sols devrait se faire en priorité sur tous les profils de référence ou sur une partie d'entre eux selon les ressources à disposition. Si les ressources sont suffisantes, les profils guides pourraient être considérés également.

## 4.6 Conclusions et recommandations générales

De nombreux groupes d'organismes du sol et divers processus biologiques ont été utilisés comme paramètres biologiques dans les programmes de recherche et de surveillance. Il y a cependant un manque de consensus sur les paramètres biologiques clés et encore trop peu de données disponibles pour définir un référentiel de base. Ce manque de données doit être complété. Une cartographie de sols intégrant les paramètres biologiques fournirait ces informations et permettrait la création de références normalisées pour définir les propriétés biologiques des sols au niveau national. Des cartes de répartition de la pédofaune pourraient aussi être créées, comme c'est le cas par exemple pour la flore (cartes floristiques de Suisse) ou pour les oiseaux, pour lesquelles des cartes de distribution à l'espèce existent. De telles cartes manquent encore actuellement pour les organismes du sol. De même, l'obtention des paramètres biologiques du sol à l'échelle du territoire suisse permettrait de définir différents types d'indicateurs pour la qualité d'un site, ou d'établir des valeurs de protection pour certaines espèces vulnérables par exemple (p. ex. concept d'espèce parapluie).

Pour la pédofaune, les vers de terre, les microarthropodes et les nématodes sont les paramètres biologiques les plus souvent utilisés dans les programmes de surveillance et de recherche nationaux et internationaux. Des normes permettant l'évaluation de ces paramètres biologiques sont la plupart du temps disponibles, surtout pour l'analyse morphologique.

L'étude des paramètres biologiques reste cependant chronophage même si le développement d'outils comme les méthodes moléculaires (metabarcoding d'ADN et d'ADNe) pour évaluer la diversité et la structure des communautés d'organismes (protistes, nématodes et microarthropodes, mais aussi vers de terre) est en plein essor.

Pour les nématodes, les microarthropodes et les vers de terre en particulier, l'analyse moléculaire par metabarcoding d'ADNe qui permet l'isolation d'ADN des organismes d'intérêt directement à partir d'un échantillon de sol, présente le grand avantage de pouvoir se passer de la phase d'extraction

des organismes de l'échantillon de sol. Elle nécessite cependant encore un certain degré de développement avant que les données générées puissent être complètement utilisables pour les organismes précités.

Pour ce qui est de la phase d'extraction des organismes du sol (analyse morphologique et analyse moléculaire par metabarcoding d'ADN classique), les solutions disponibles pour traiter en parallèle de grands volumes d'échantillons restent rares. Pour cette phase méthodologique et pour de très grands volumes d'échantillons, une optimisation et une automatisation des protocoles méthodologiques seraient à envisager, ce qui permettrait de paralléliser et d'alléger les procédures. En revanche, pour d'autres phases méthodologiques comme l'extraction de l'ADN ou le séquençage (analyse moléculaire en général), les solutions permettant de traiter de grand volume d'échantillons existent déjà.

Les organismes biologiques, comme déjà discuté, jouent un rôle essentiel dans le fonctionnement des sols et services écosystémiques rendus. Il serait donc impensable de continuer à ne pas les intégrer dans l'évaluation de la qualité des sols.

Pour une évaluation optimale, l'idéal est d'avoir des paramètres biologiques à différents niveaux trophiques et représentant le spectre des différentes fonctions écologiques. Ce serait donc le cas en intégrant les vers de terre, microarthropodes, nématodes et protistes dans la cartographie. Les méthodes fonctionnelles, renseignant sur les fonctions de l'écosystème, viendraient compléter l'information obtenue par les paramètres biologiques sur la structure et composition des communautés de l'écosystème sol.

L'utilisation de l'analyse moléculaire permettrait l'obtention d'informations additionnelles sur la diversité génétique et composition des communautés des organismes présents.

Des données sur le nombre d'individus présents ou sur le calcul d'indices comme pour les nématodes ne peuvent cependant que difficilement être obtenue par ce biais et nécessitent encore une identification sous microscope.

L'étude des protistes et nématodes peut être réalisée sur les sondages mécaniques de la cartographie, du fait du mode de prélèvement de l'échantillon de sol (échantillon composite). Le prélèvement est avantageux, car combinable avec l'échantillonnage du sol pour les autres paramètres biologiques comme les bactéries et les champignons ou certains paramètres physico-chimiques pour lequel la prise d'échantillons non perturbés n'est pas requise. Les autres paramètres biologiques (vers de terre, microarthropodes et méthodes fonctionnelles) sont réservés aux profils de référence et profils guides, les prélèvements pour ces paramètres biologiques n'étant pas adaptés aux sondages mécaniques.

Si une évaluation des paramètres biologiques n'est pas envisageable sur l'entier des profils (profils de référence ou guides) et sondages mécaniques, une sélection devra être faite, afin de garantir la mise à disposition d'un jeu de données minimal permettant d'établir un référentiel de base des paramètres biologiques pour la Suisse.

L'étude de tous les paramètres biologiques précités aux mêmes sites (dans ce cas les profils de référence) permettraient de combiner un jeu maximum de données biologiques, chimiques et physiques. La pertinence et le choix des paramètres biologiques présentés et des méthodes d'analyse associées pour la cartographie de sols devra être discutée de manière plus approfondie avec un panel d'experts.

En perspective, il serait intéressant de continuer cette étude bibliographique sur les méthodologies existantes pour les autres organismes du sol moins fréquemment utilisés dans les programmes de surveillance et de recherche mentionnés dans ce rapport. Ce sont notamment les enchytréides et la macrofaune épigée et endogée du sol (à part des vers de terre). L'intérêt d'inclure dans une cartographie des sols d'autres organismes de la pédofaune comme les rotifères, les tardigrades, les isopodes, les myriapodes, les fourmis, les larves d'insectes avec stades de développement dans le sol, etc. devrait être exploré et discuté.

Dans ce rapport, les méthodes d'analyses moléculaires pour l'étude des organismes de la pédofaune ont été abordées. Cependant, il serait intéressant d'approfondir le sujet et d'explorer plus en détails les multiples possibilités de ce domaine pour l'étude des paramètres biologiques. Ceci en particulier pour les microarthropodes par exemple, pour lesquels l'analyse moléculaire n'a pas pu être traitée dans ce rapport.

Finalement, une synthèse sur les valeurs de comparaison et de référence disponibles au niveau national et international pour les paramètres biologiques (quelques exemples pour les vers de terre ont été donné, chapitre 4.1.4) et les données pédologiques qui leur sont associées pourrait être réalisée.

## 5. Liste des figures

Figure 1 : Classes d'organismes du sol (selon leur taille) considérés dans ce travail de recherche. Ils sont indiqués par les rectangles rouges et représentent la pédofaune uniquement. La microflore n'est pas prise en compte. (Origine de la figure : Walsler et al. (2021)).	10
Figure 2 : Approche utilisée pour cibler les paramètres biologiques d'intérêt dans une cartographie des sols.	10
Figure 3 : Ver(s) de terre endogés (à gauche) et anécique (à droite). Photos : L. Pfiffner, FiBL	18
Figure 4 : Principe méthodologique de base pour l'étude des vers de terre.	20
Figure 5 : Résumé des procédures méthodologiques pour les vers de terre. Le signe «stop» spécifie la durée maximum du temps de stockage possible des échantillons entre chaque phase ( $\infty$ = stockage possible pour une longue période, c. à d. plusieurs mois) (Figure de S. Campiche, présentée lors du Workshop de synthèse du CCSols sur les méthodes d'évaluation en août 2020).	26
Figure 6 : Acariens (droite) et collembole (gauche) (Photo : A. Murray, Licence: CC BY-SA 2.0)	27
Figure 7 : Principe méthodologique de base pour l'étude des microarthropodes.	28
Figure 8 : Résumé des procédures méthodologiques pour les microarthropodes. Les signes «stop» spécifient la durée maximum du temps de stockage possible des échantillons entre chaque phase ( $\infty$ = stockage possible pour une longue période, c. à d. plusieurs mois) (Figure de S. Campiche, présentée lors du Workshop de synthèse du CCSols sur les méthodes d'évaluation en août 2020).	32
Figure 9 : Nématode du sol (Photo : Cristina Menta, Licence : CC BY 3.0)	33
Figure 10 : Principe méthodologique de base pour l'étude morphologique des nématodes.	35
Figure 11: Principe méthodologique de base pour l'étude moléculaire des nématodes (metabarcoding d'ADN (ligne du haut) et metabarcoding d'ADNe (ligne du bas)).	35
Figure 12 : Coûts et bénéfices des méthodes d'extraction pour les nématodes phytopathogènes selon l'Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes (EPPO : PM 7/119 (1) Nématode extraction. 2013).	38
Figure 13 : Résumé des procédures méthodologiques pour les nématodes (analyse morphologique). Les signes «stop» spécifient la durée maximum du temps de stockage possible des échantillons entre chaque phase ( $\infty$ = stockage possible pour une longue période, c. à d. plusieurs mois) (Figure de S. Campiche, présentée lors du Workshop de synthèse du CCSols sur les méthodes d'évaluation en août 2020).	43
Figure 14 : Protistes libres du sol classés selon leur taille (longueurs), morphologie et affiliation phylogénétique (Geisen et al., 2017)	44
Figure 15 : Résumé des méthodes existantes pour étudier les protistes du sol selon Geisen et Bonkowski 2018. Les méthodes courantes pour étudier les communautés de protistes du sol sont séparées en deux approches principales, l'une utilisant des analyses microscopiques pour identifier les protistes à des résolutions différentielles, l'autre utilisant des méthodes moléculaires sur des acides nucléiques extraits (ADN ou ADNc après transcription inverse de l'ARN). Abréviations : NFPD: non-flooded petri dish method; MPN: Most probable number technique; LAM: Liquid aliquot method; qPCR: quantitative polymer chain reaction; MT: Metatranscriptomic high-throughput sequencing (HTS); AS: Amplicon HTS; MG: Metagenomic HTS.	45
Figure 16 : Principe méthodologique de base pour l'étude moléculaire des protistes	46
Figure 17 : De gauche à droite : Litter Bag (photo Nicole Scheunemann), Tea Bag (photo Simon Tresch, FiBL), et Bait Lamina (photo S. Campiche).	49
Figure 18 : Principe méthodologique de base pour les méthodes fonctionnelles.	51



Figure 19 : Comparaison des ressources temporelles (temps total et temps effectif) pour réaliser la méthode dans son entier, des coûts de l'investissement matériel et des coûts des consommables ainsi que de la compétence maximum requise (= le plus haut degré de compétences requis en considérant l'analyse du paramètre biologique dans son entier) pour les paramètres biologiques référencés. La tâche est réalisée par 1 personne pour 1 réplicat. Microarthropodes_morphologique: l'extraction MacFadyen a été considérée (la plus fréquemment employée et recommandée par l'ISO). Nématodes_morphologique et nématodes_moléculaire (ADN): l'extraction Oostenbrink a été considérée (la plus fréquemment employée et recommandée par l'ISO). Nématodes_moléculaire (ADN), Nématodes_moléculaire (ADNe) et Protistes_moléculaire (ADNe): le temps effectif et le temps total pour la prestation de séquençage (service par un prestataire externe) ne sont pas pris en compte ici ; les consommables (dans ce cas, coût pour un échantillon depuis la phase d'extraction d'ADN jusqu'au séquençage) intègrent un service par un prestataire externe, ce qui n'est pas le cas pour les autres paramètres biologiques où toutes les étapes méthodologiques sont réalisées en interne. Une automatisation de la procédure d'extraction d'ADN pour les analyses moléculaires n'est pas considérée ici. Note importante : Les ressources temporelles pour l'analyse moléculaire des nématodes (ADN et ADNe) sont basées sur les ressources temporelles estimées pour les protistes (chap. 3.5.5 et chap. 4.4.2), en considérant l'état de la recherche lors de l'écriture de ce document. En réalité les ressources temporelles pour la détermination des nématodes sont aujourd'hui sensiblement moindres.	55
Figure 20 : Comparaison des ressources temporelles (temps total et temps effectif) pour réaliser la méthode dans son entier, des coûts de l'investissement matériel et des coûts des consommables pour 1 réplicat réalisé par 1 personne pour les méthodes fonctionnelles référencées. Les Bait Lamina (bâtonnets déjà remplis) ont été considérés dans les consommables. Etant re-remplissable et réutilisables, ils pourraient aussi être considérés comme un investissement. Le degré de compétences requises est le même pour toutes les méthodes (compétences de base) et n'est donc pas reporté sur le graphique.	56
Figure 21 : Cartographie de l'abondance des vers de terre en région Bretagne établie par le programme RMQS BioDiv ( <a href="http://www.sols-de-bretagne.fr/biodiversite-des-sols/cartographie-regionale.html">http://www.sols-de-bretagne.fr/biodiversite-des-sols/cartographie-regionale.html</a> ; Cluzeau, 2009b).	61
Figure 22 : L'abondance en nombre d'individus et la biomasse des vers de terre discriminent les trois systèmes d'occupation du sol (culture, prairie et forêt) avec des valeurs élevées en prairies (350 ind/m <sup>2</sup> ; 138 g/m <sup>2</sup> ), moyennes en cultures (215 ind/m <sup>2</sup> ; 63 g/m <sup>2</sup> ) et faibles en forêts (50 ind/m <sup>2</sup> ; 8 g/m <sup>2</sup> ), d'après les résultats du programme RMQS BioDiv. (Cluzeau, 2009b).	62
Figure 23 : Biomasse lombricienne par classe d'hydromorphie selon le programme RMQS BioDiv.	62
Figure 24 : Proposition d'un référentiel de base pour l'abondance des vers de terre en région Bretagne selon le programme RMQS BioDiv (Cluzeau, 2009b). Les nombres signifient des individus par m <sup>2</sup> .	63
Figure 25 : Abondance des vers de terre selon le type d'utilisation du sol d'après la fiche technique du FiBL sur les vers de terre (Pffifner, 2013)	63
Figure 26 : Valeurs de comparaison pour la biomasse lombricienne dans les sols d'herbages (en g m <sup>-2</sup> et % de biomasse d'une certaine groupe écologique du total des espèces de 301 g m <sup>-2</sup> ) d'après les données de Cuen-det et al. (1997) et évaluées par le Groupe de travail VBBio -BioSA de la Confédération. * absence du groupe pour des raisons zoogéographiques (VBB-BSA, 2009).	64

## 6. Liste des tableaux

Tableau 1 : Principaux programmes de surveillance et de recherche utilisant des paramètres biologiques en Suisse et en Europe et organismes du sol impliqués.	17
Tableau 2 : Méthodes répertoriées pour l'évaluation des vers de terre et programmes de surveillance et de recherche les utilisant.	19
Tableau 3 : Principales divergences méthodologiques répertoriées pour les méthodes vers de terre.	21
Tableau 4 : Ressource temporelle et expertise requise pour l'étude des vers de terre (tâche effectuée par 1 personne pour 1 réplicat). Surface considérée pour l'extraction chimique : 0.25 m <sup>2</sup> , volume considéré pour le tri manuel : bloc de sol avec les dimensions 0.2 m x 0.2 m x 0.2 m.	25
Tableau 5 : Coûts estimés pour l'investissement matériel et les consommables pour les vers de terre.	26
Tableau 6: Méthodes répertoriées pour l'évaluation des collemboles et acariens (microarthropodes) et programmes de surveillance et de recherche les utilisant.	28
Tableau 7 : Principales divergences méthodologiques répertoriées pour les méthodes microarthropodes (ISO 23611-2 et Tullgren funnel).	29
Tableau 8 : Ressource temporelle et expertise requises pour l'étude des microarthropodes (tâche effectuée par 1 personne pour 1 échantillon).	31
Tableau 9 : Coûts estimés pour l'investissement matériel et les consommables pour les microarthropodes.	32
Tableau 10 : Méthodes répertoriées pour l'évaluation des nématodes et programmes de surveillance et de recherche les utilisant.	34
Tableau 11 : Principales différences méthodologiques répertoriées pour la procédure de prélèvement de sol et d'extraction des nématodes du sol.	36
Tableau 12 : Ressource temporelle et expertise requise pour l'étude des nématodes (analyses morphologiques; tâche effectuée par 1 personne pour 1 réplicat).	40
Tableau 13 : Ressource temporelle et expertise requises pour l'étude des nématodes (analyses moléculaires avec metabarcoding d'ADN et d'ADNe; tâche effectuée par 1 personne pour 1 réplicat).	41
Tableau 14 : Coûts estimés pour l'investissement matériel et les consommables pour les nématodes (morphologique).	42
Tableau 15 : Coûts estimés pour l'investissement matériel et les consommables pour les nématodes (analyse moléculaire d'ADN et d'ADNe)	42
Tableau 16 : Ressource temporelle et expertise requise pour l'étude des protistes (tâche effectuée par 1 personne pour 1 réplicat).	47
Tableau 17 : Coûts estimés pour l'investissement matériel et les consommables pour les protistes.	48
Tableau 18: Méthodes répertoriées pour les méthodes fonctionnelles et programmes de surveillance et de recherche les utilisant.	50
Tableau 19 : Principales différences méthodologiques répertoriées pour les méthodes fonctionnelles.	51
Tableau 20 : Ressource temporelle et expertise requise pour les méthodes fonctionnelles (tâche effectuée par 1 personne pour 1 réplicat).	53

Tableau 21 : Coûts estimés pour l'investissement matériel et les consommables pour les méthodes fonctionnelles.	54
Tableau 22 : Estimation des ressources humaines brutes nécessaires en termes d'équivalent plein temps et d'investissement matériel (coûts des consommables) pour les vers de terre pour analyser 100, 500 ou 1000 échantillons par semaine (semaine à 40 heures).	59
Tableau 23 : Recommandations pour la cartographie pour les vers de terre.	60
Tableau 24 : Estimation des ressources brutes nécessaire en termes d'équivalent plein temps et d'investissement matériel (coûts des consommables) pour les microarthropodes pour analyser 100, 500 ou 1000 échantillons par semaine (semaine à 40h), en considérant l'extraction MacFadyen et l'analyse morphologique.	66
Tableau 25 : Recommandations pour la cartographie pour les microarthropodes.	67
Tableau 26 : Estimation des ressources brutes nécessaires en termes d'équivalent plein temps et d'investissement matériel (coûts des consommables) pour les nématodes pour analyser 100, 500 ou 1000 échantillons par semaine (semaine à 40h), en considérant l'analyse morphologique.	69
Tableau 27 : Estimation des ressources brutes nécessaire en termes d'équivalent plein temps et d'investissement matériel (coûts des consommables) pour les nématodes pour analyser 100, 500 ou 1000 échantillons par semaine (semaine à 40h), en considérant l'analyse moléculaire.	70
Tableau 28: Recommandations pour la cartographie pour les nématodes.	72
Tableau 29 : Estimation des ressources brutes nécessaires en termes d'équivalent plein temps et d'investissement matériel (coûts des consommables) pour les protistes pour analyser 100, 500 ou 1000 échantillons par semaine (semaine à 40h).	74
Tableau 30 : Recommandations pour la cartographie pour les protistes.	75
Tableau 31 : Recommandations pour la cartographie pour les méthodes fonctionnelles.	77

## 7. Références bibliographiques

### 7.1 Liste des méthodes

- Agroscope (2015) Bodenuntersuchung zur Standort-Charakterisierung (Bodenphysikalische, -biologische und -chemische Untersuchungen). Regenwurmextraktion mittels Formalinlösung (B-RW-E), Regenwurmextraktion mittels Handauslese (B-RW-H), Bestimmung der Regenwurmpopulation (Biomasse, Abundanz) (B-RW-B). Schweizerische Referenzmethoden der Forschungsanstalten Agroscope (Band 2), Zürich.
- Bioindicateurs II. Bioindicateurs – Des outils biologiques pour des sols durables. Programme ADEME Bioindicateurs II. <https://ecobiosoil.univ-rennes1.fr/ADEME-Bioindicateur/>. EcoBioSoil, Rennes, France.
- Bouché, M. B. (1972) Lombriciens de France: Ecologie et systématique. Institut National de la Recherche Agronomique, France.
- Cluzeau D., Bellido A., Boulonne L., Cannavacciuolo M., Chaussod R., Cortet J., Fargette M., Giteau J-L., Guernion M., Jolivet C., Lavelle P., Foucaud-Lemercier B., Martin F., Mateille T., Mercier V., Péres G., Pernin C., Plantard O., Ponge J.F., Ranjard L., Rougé L., Ruiz N., Tico S., Velasquez H., Villenave C., Walter C. 2009. Rapports finaux du programme ADEME Bioindicateurs RMQS BioDiv - Tome 7 - Lombriciens; 105p.
- Donn, S., Neilson, R., Griffiths, B. S., Daniell, T. J. (2012) A novel molecular approach for rapid assessment of soil nematode assemblages – variation, validation and potential applications. *Methods in Ecology and Evolution*, 3, 12–23.
- Emmett, B.A., Reynolds, B., Chamberlain, P.M., Rowe, E., Spurgeon, D., Brittain, S.A., Frogbrook, Z., Hughes, S., Lawlor, A.J., Poskitt, J., Potter, E., Robinson, D.A., Scott, A., Wood, C., Woods, C. (2010) Countryside Survey: Soils Report from 2007. CS Technical Report No. 9/07, Countryside Survey, UK.
- Fournier, B., Samaritani, E., Frey, B., Seppey, C. V.W., Lara, E., Heger, T. J., Mitchell, E. A.D (2020a) Higher spatial than seasonal variation in floodplain soil eukaryotic microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry* 147 (2020) 107842.
- Fournier, B., Pereira Dos Santos, S., Gustavsen, J. A., Imfeld, G., Lamy, F., Mitchell, E. A. D., Moła, M., Noll, D., Planchamp, C., Heger, T. (2020b). Impact of a synthetic fungicide (fosetyl-Al and propamocarb-hydrochloride) and a biopesticide (*Clonostachys rosea*) on soil bacterial, fungal, and protist communities. *Science of the Total Environment* 738 (2020) 139635.
- Frey, B. (2020) Long-term irrigation shifts the below-ground diversity - «The Pfywald-Experiment». [https://www.wsl.ch/fileadmin/user\\_upload/WSL/Ueber\\_die\\_WSL/Versuchsanlagen\\_Labors/Flaechen\\_im\\_Wald/Pfywald/workshops/2020/Frey\\_Long-term\\_irriga-on\\_shiOs\\_the\\_below-ground\\_diversity\\_\\_The\\_Pfywald-Experiment\\_.pdf](https://www.wsl.ch/fileadmin/user_upload/WSL/Ueber_die_WSL/Versuchsanlagen_Labors/Flaechen_im_Wald/Pfywald/workshops/2020/Frey_Long-term_irriga-on_shiOs_the_below-ground_diversity__The_Pfywald-Experiment_.pdf)
- Griffiths, B. S., J. Römbke, R. M. Schmelz, A. Scheffczyk, J.H. Faber, J. Bloem, G. Pérès, D. Cluzeau, A. Chabbi, M. Suhadolc, J.P. Sousa, P. Martins da Silva, F. Carvalho, S. Mendes, P. Morais, R. Francisco h, C. Pereira, M. Bonkowski, S. Geisen, R.D. Bardgett, F.T. de Vries, T. Bolger, T. Dirilgen, O. Schmidt, A. Winding, N.B. Hendriksen, A. Johansen, L. Philippot, P. Plassart, D. Bru, B. Thomson, R.I. Griffiths, M.J. Bailey, A. Keith, M. Rutgers, C. Mulder, S.E. Hannula, R. Creamer, D. Stone (2016) Selecting cost effective and policy-relevant biological indicators for European monitoring of soil biodiversity and ecosystem function. *Ecological Indicators*, 69, 213-223.

- \_ ISO 18311 (2016) Soil quality - Method for testing effects of soil contaminants on the feeding activity of soil dwelling organisms - Bait-lamina test. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- \_ ISO 23611-1 (2018) Soil Quality - Sampling of soil Invertebrates - Part 1: Handsorting and extraction of earthworms. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- \_ ISO 23611-2 (2006) Soil Quality - Sampling of soil Invertebrates - Part 2: Sampling and extraction of micro-arthropods (Collembola and Acarina). International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- \_ ISO 23611-4 (2007) Soil quality - Sampling of soil invertebrates - Part 4: Sampling, extraction and identification of soil-inhabiting nematodes. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- \_ Keuskamp, J. A., Dingemans, B. J. J., Lehtinen, T., Judith M., Sarneel, J. M., Heffing, M. M. (2013) Tea Bag Index: a novel approach to collect uniform decomposition data across ecosystems. *Methods in Ecology and Evolution*. British Ecological Society.
- \_ OECD (2006) OECD Series on Testing and Assessment No. 56. Guidance document on the breakdown of organic matter in litterbags. ENV/JM/MONO 23. Organization for Economic Co-Operation and Development, Paris, France
- \_ Ranjard, L. (2011) AgrInnov - Tester les Indicateurs de l'état biologique des sols en lien avec les pratiques agricoles. Compte rendu final de projet. PROJET CASDAR 1116 2011, France.
- \_ Rutgers, M., Schouten, A. J., Bloem, J., Van Eekeren, N., De Goede, R. G. M., Jagers Op Akkerhuis, G. A. J. M., Van Der Wal, A., Mulder, C., Brussaard, L., & Breure, A. M. (2009) Biological measurements in a nationwide soil monitoring network. *European Journal of Soil Science*, 60, 820–832.
- \_ Samaritani, E., Mitchell, E. A. D., Rich, J., Shrestha, J., Fournier, B., Frey, B. (2017) Soil bacterial communities and ecosystem functioning change more strongly with season than habitat in a restored floodplain. *Applied Soil Ecology*, 112, 71–78.
- \_ Teatime 4 Science (2016) Tea Bag Index. <http://www.teatime4science.org/> .
- \_ Tresch, S., Fliessbach, A. (2017) Decomposition study using tea bags. Technical note. Forschungsinstitut für biologischen Landbau FiBL. Frick, Schweiz.
- \_ UniNE. Extraction de lombriciens. Protocole v2.0 du Laboratoire d'écologie fonctionnelle, Université de Neuchâtel

## 7.2 Liste des méthodes recommandées

- \_ Fournier, B., Samaritani, E., Frey, B., Seppey, C. V.W., Lara, E., Heger, T. J., Mitchell, E. A.D (2020a) Higher spatial than seasonal variation in floodplain soil eukaryotic microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry* 147 (2020) 107842.
- \_ Fournier, B., Pereira Dos Santos, S., Gustavsen, J. A., Imfeld, G., Lamy, F., Mitchell, E. A. D., Mota, M., Noll, D., Planchamp, C., Heger, T. (2020b). Impact of a synthetic fungicide (fosetyl-Al and propamocarb-hydrochloride) and a biopesticide (*Clonostachys rosea*) on soil bacterial, fungal, and protist communities. *Science of the Total Environment* 738 (2020) 139635.
- \_ ISO 18311 (2016) Soil quality – Method for testing effects of soil contaminants on the feeding activity of soil dwelling organisms – Bait-lamina test. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

- \_ ISO 23611-1 (2018) Soil Quality – Sampling of soil Invertebrates – Part 1: Handsorting and extraction of earthworms. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- \_ ISO 23611-2 (2006) Soil Quality – Sampling of soil Invertebrates – Part 2: Sampling and extraction of micro-arthropods (Collembola and Acarina). International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- \_ ISO 23611-4 (2007) Soil quality – Sampling of soil invertebrates – Part 4: Sampling, extraction and identification of soil-inhabiting nematodes. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- \_ Keuskamp, J. A., Dingemans, B. J. J., Lehtinen, T., Judith M., Sarneel, J. M., Heffting, M. M. (2013) Tea Bag Index: a novel approach to collect uniform decomposition data across ecosystems. *Methods in Ecology and Evolution*. British Ecological Society.
- \_ Samaritani, E., Mitchell, E. A. D., Rich, J., Shrestha, J., Fournier, B., Frey, B. (2017) Soil bacterial communities and ecosystem functioning change more strongly with season than habitat in a restored floodplain. *Applied Soil Ecology*, 112, 71–78.
- \_ Teatime 4 Science (2016) Tea Bag index. <http://www.teatime4science.org/> .
- \_ Tresch, S., Fliessbach, A. (2017) Decomposition study using tea bags. Technical note. Forschungsinstitut für biologischen Landbau FiBL. Frick, Schweiz.

### 7.3 Bibliographie globale

- \_ Agroscope (2015) Bodenuntersuchung zur Standort-Charakterisierung (Bodenphysikalische, -biologische und -chemische Untersuchungen). Regenwurmextraktion mittels Formalinlösung (B-RW-E), Regenwurmextraktion mittels Handauslese (B-RW-H), Bestimmung der Regenwurmpopulation (Biomasse, Abundanz) (B-RW-B). Schweizerische Referenzmethoden der Forschungsanstalten Agroscope (Band 2), Zürich.
- \_ Arrouays, D., Morvan, X., Saby, N.P.A., Richer de Forges, A., Le Bas, C., Bellamy, P.H., Berényi Üveges, J., Freudenschuß, A., Jones, A.R., Jones, R.J.A., Kibblewhite, M.G., Simota, C., Verdoodt, A., Verheijen, F.G.A. (eds) (2008). Environmental Assessment of Soil for Monitoring, Volume IIa: Inventory & Monitoring (ENVASSO). EUR 23490 EN/2A, Office for the Official Publications of the European Communities, Luxembourg, 188pp.
- \_ Balkenhol, B., Russell, D. J. (2007) Collembolen an Wald- Dauerbeobachtungsflächen in Baden-Württemberg. Fachdokumente U74-M326-J07. LUBW Landesanstalt für Umwelt, Messungen und Naturschutz Baden-Württemberg, Karlsruhe, Allemagne.
- \_ Bienert, F., De Danieli, S., Miquel, C., Coissac, E., Poillot, C., Brun, J.-J. Taberlet, P. (2012) Tracking earthworm communities from soil DNA. *Molecular Ecology* 21, 2017–2030.
- \_ Bioindicateurs II. Bioindicateurs – Des outils biologiques pour des sols durables. Programme ADEME Bioindicateurs II. <https://ecobiosoil.univ-rennes1.fr/ADEME-Bioindicateur/>. EcoBioSoil, Rennes, France.
- \_ Bispo, A., Grand, C., Galsomies, L. (2009) Le programme ADEME «Bioindicateurs de qualité des sols» : Vers le développement et la validation d'indicateurs biologiques pour la protection des sols. *Étude et Gestion des Sols*, Volume 16, 3/4, pages 145 à 158

- \_ Bongers, T. (1989) The maturity index: an ecological measure of environmental disturbance based on nematode species composition. *Oecologia*, 83, 14–19.
- \_ Bongers, T. (1999) The Maturity Index, the evolution of nematode life history traits, adaptive radiation and cp-scaling. *Plant and Soil* 212: 13–22.
- \_ Bouché, M. B. (1972) *Lombriciens de France: Ecologie et systématique*. Institut National de la Recherche Agronomique, France.
- \_ Briones, M. J. I. (2014) Soil fauna and soil functions: a jigsaw puzzle. *Frontiers in Environmental Science*, 2: 1–22.
- \_ Campiche, S., Grand, É., Gachet Aquillon, C., Homazava, N., Vermeirssen, E., Werner, I., Ferrari, B. J.D., Maurer, C., Chervet, A., Sturny, W.G., Schlaepfer, R. (2015). Mesure de l'activité biologique du site de suivi à long terme «Oberacker» par la méthode bait-lamina. *Bulletin BSA, Groupe de Travail: Biologie du Sol - Application* (16), 20-28
- \_ Cluzeau, D., Bellido A., Boulonne L., Cannavacciuolo M., Chaussod R., Cortet J., Fargette M., Giteau J-L., Guernion M., Jolivet C., Lavelle P., Foucaud-Lemercier B., Martin F., Mateille T., Mercier V., Péres G., Pernin C., Plantard O., Ponge J.F., Ranjard L., Rougé L., Ruiz N., Tico S., Velasquez H., Villenave C., Walter C. (2009) Tome 2 - Cahier des méthodes - Méthodes d'extraction et d'analyse des groupes biologiques étudiés durant le programme RMQS BioDiv Bretagne. RMQS BioDiv Bretagne, France.
- \_ Cluzeau, D., Bellido A., Boulonne L., Cannavacciuolo M., Chaussod R., Cortet J., Fargette M., Giteau J-L., Guernion M., Jolivet C., Lavelle P., Foucaud-Lemercier B., Martin F., Mateille T., Mercier V., Péres G., Pernin C., Plantard O., Ponge J.F., Ranjard L., Rougé L., Ruiz N., Tico S., Velasquez H., Villenave C., Walter C. (2009b). Tome 7 : Lombriciens. RMQS BioDiv Bretagne, France.
- \_ Cortet, J. (2014) Les microarthropodes du sol. Fiche outil F4. Programme ADEME Bioindicateurs II. [https://ecobiosoil.univ-rennes1.fr/ADEME-Bioindicateur/download/fiches-outil/fiche\\_outil\\_8\\_microarthropodes\\_du\\_sol.pdf](https://ecobiosoil.univ-rennes1.fr/ADEME-Bioindicateur/download/fiches-outil/fiche_outil_8_microarthropodes_du_sol.pdf)
- \_ Cortet, J (2010) Biodiversité des microarthropodes du sol en agroécosystèmes. Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme d'Habilitation à Diriger des Recherches. Institut National Polytechnique de Lorraine, Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires Laboratoire Sols et Environnement, France.
- \_ Countryside Survey. UKCEH Countryside Survey – measuring change in our countryside. <https://countryside-survey.org.uk/>
- \_ Cuendet, G., Suter, E., Stähli, R. (1997). *Peuplements lombriciens des prairies permanentes du Plateau suisse – Valeurs de comparaison pour l'interprétation des prélèvements de vers de terre. Rapport de synthèse. Cahier de l'environnement n°291/sol*. Office fédéral de l'environnement, des forêts et du paysage (OFEFP), Berne
- \_ Decaëns, T., Porco, D., Rougerie, R., Brown, G. G., James, S. W. (2013) Potential of DNA barcoding for earthworm research in taxonomy and ecology. *Applied Soil Ecology* 65, 35–42.
- \_ Donn, S., Neilson, R., Griffiths, B. S., Daniell, T. J. (2012) A novel molecular approach for rapid assessment of soil nematode assemblages – variation, validation and potential applications. *Methods in Ecology and Evolution*, 3, 12–23.
- \_ Edaphobase. <https://portal.edaphobase.org/>
- \_ EcoFINDERS. <http://www.EcoFINDERS.eu> et



- \_ EcoFINDERS. Ecological Function and Biodiversity Indicators in European Soils. <http://esdac.jrc.ec.europa.eu/projects/ecoFinders>
- \_ Emmett, B.A., Reynolds, B., Chamberlain, P.M., Rowe, E., Spurgeon, D., Brittain, S.A., Frogbrook, Z., Hughes, S., Lawlor, A.J., Poskitt, J., Potter, E., Robinson, D.A., Scott, A., Wood, C., Woods, C. (2010) Countryside Survey: Soils Report from 2007. CS Technical Report No. 9/07, Countryside Survey, UK.
- \_ EPPO (2013) European and Mediterranean Plant Protection Organization. Nematode extraction. Diagnostics. PM 7/119 (1).
- \_ ESDAC. European Soil Data Centre. <https://esdac.jrc.ec.europa.eu/>
- \_ FAO, ITPS, GSBI, CBD and EC. (2020) State of knowledge of soil biodiversity – Status, challenges and potentialities, Report 2020. Rome, FAO. <https://doi.org/10.4060/cb1928en>
- \_ Ferris, H., Bongers, T., de Goede, R.G.M (2001) A framework for soil food web diagnostics: extension of the nematode faunal analysis concept. *Applied Soil Ecology* 18, 13–29.
- \_ Ferris, H. (2010) Form and function: Metabolic footprints of nematodes in the soil food web. *European Journal of Soil Biology* 46, 97-104.
- \_ Fournier, B., Samaritani, E., Frey, B., Seppey, C. V.W., Lara, E., Heger, T. J., Mitchell, E. A.D (2020a) Higher spatial than seasonal variation in floodplain soil eukaryotic microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry* 147 (2020a) 107842.
- \_ Fournier, B., Pereira Dos Santos, S., Gustavsen, J. A., Imfeld, G., Lamy, F., Mitchell, E. A. D., Mota, M., Noll, D., Planchamp, C., Heger, T. (2020b). Impact of a synthetic fungicide (fosetyl-Al and propamocarb-hydrochloride) and a biopesticide (*Clonostachys rosea*) on soil bacterial, fungal, and protist communities. *Science of the Total Environment* 738 (2020) 139635.
- \_ Geisen, S., Mitchell, E.A.D., Wilkinson, D.M., Adl, S., Bonkowski, M., Brown, M.W., Fiore-Donno, A.M., Heger, T.J., Jassey, V.E.J., Krashevskaya, V., Lahr, D.J.G., Marcisz, K., Mulo, M., Payne, R., Singer, D., Anderson, O.R., Charman, D.J., Ekelund, F., Griffiths, B.S., Rønn, R., Smirnov, A., Bass D., Belbahri, L., Berney, C., Blandenier, Q., Chatzinotas, A., Clarholm, M., Dunthorn, M., Feest, A., Fernández, L.D., Foissner, W., Fournier, B., Gentekaki, E., Hájek M., Helder, J., Jousset, A., Koller, R., Kumar, S., La Terza, A., Lamentowicz, M., Mazei, Y., Santos, S.S., Seppey, C.V.W., Spiegel, F.W., Walochnik, J., Winding, A., Lara, E. (2017) Soil protistology rebooted: 30 fundamental questions to start with. *Soil Biology & Biochemistry* 111, 94–103.
- \_ Geisen, S., Mitchell, E. A. D., Adl, S., Bonkowski, M., Dunthorn, M., Ekelund, F., Fernandez, L. D., Jousset, A., Krashevskaya, V., Singer, D., Spiegel, F. W., Walochnik, J. Lara, E. (2018) Soil protists: a fertile frontier in soil biology research. *FEMS Microbiology Reviews*, fuy006, 42, 293–323.
- \_ Geisen, S., Bonkowski, M. (2018) Methodological advances to study the diversity of soil protists and their functioning in soil food webs. *Applied Soil Ecology* 123, 328–333.
- \_ George, P.B.L., Lallias, D., Creer, S., 1, Seaton, F.M., Kenny, J.G., Eccles, R.M.,4, Griffiths, R.I., Lebron, I., Emmett, B.A., Robinson, D.A., Jones, D.L. (2019) Divergent national-scale trends of microbial and animal biodiversity revealed across diverse temperate soil ecosystems. *Nature Communications*, 10:1107

- \_ Greiner, L., Keller, A., Grêt-Regamey, A., Papritz, A. (2017) Soil function assessment: review of methods for quantifying the contributions of soils to ecosystem services. *Land Use Policy* 69, 224–237.
- \_ Griffiths, B. S., J. Römbke, R. M. Schmelz, A. Scheffczyk, J.H. Faber, J. Bloem, G. Pérès, D. Cluzeau, A. Chabbi, M. Suhadolc, J.P. Sousa, P. Martins da Silva, F. Carvalho, S. Mendes, P. Morais, R. Francisco h, C. Pereira, M. Bonkowski, S. Geisen, R.D. Bardgett, F.T. de Vries, T. Bolger, T. Dirilgen, O. Schmidt, A. Winding, N.B. Hendriksen, A. Johansen, L. Philippot, P. Plassart, D. Bru, B. Thomson, R.I. Griffiths, M.J. Bailey, A. Keith, M. Rutgers, C. Mulder, S.E. Hannula, R. Creamer, D. Stone (2016) Selecting cost effective and policy-relevant biological indicators for European monitoring of soil biodiversity and ecosystem function. *Ecological Indicators*, 69, 213–223.
- \_ Hilton, S., Picot, E., Schreiter, S., Bass, D., Norman, K., Oliver, A.E., Moore, J.D., Mauchline, T.H., Mills, P.R., Teakle, G.R., Clark, I.M., Hirsch, P.R., van der Gast, C.J., Bending, G.D. (2021) Identification of microbial signatures linked to oilseed rape yield decline at the landscape scale. *Microbiome*, 9:19
- \_ Huber, S., Prokop, G., Arrouays, D., Banko, G., Bispo, A., Jones, R.J.A., Kibblewhite, M.G., Lexer, W., Möller, A., Rickson, R.J., Shishkov, T., Stephens, M., Toth, G. Van den Akker, J.J.H., Varallyay, G., Verheijen, F.G.A., Jones, A.R. (eds) (2008). *Environmental Assessment of Soil for Monitoring, Volume I: Indicators & Criteria (ENVASSO)*. EUR 23490 EN/1. Office for the Official Publications of the European Communities, Luxembourg, 339 pp.
- \_ IARC (2006) *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Formaldehyde, 2-Butoxyethanol and 1-tert-Butoxypropan-2-ol*. Volume 88. Lyon, France.
- \_ ISO 18311 (2016) *Soil quality – Method for testing effects of soil contaminants on the feeding activity of soil dwelling organisms – Bait-lamina test*. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- \_ ISO 23611-1 (2018) *Soil Quality – Sampling of soil Invertebrates – Part 1: Hand-sorting and extraction of earthworms*. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- \_ ISO 23611-2 (2006) *Soil Quality – Sampling of soil Invertebrates – Part 2: Sampling and extraction of micro-arthropods (Collembola and Acarina)*. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- \_ ISO 23611-4 (2007) *Soil quality – Sampling of soil invertebrates – Part 4: Sampling, extraction and identification of soil-inhabiting nematodes*. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- \_ ISO 23611-5 (2011) *Soil quality – Sampling of soil invertebrates – Part 5: Sampling and extraction of soil macro-invertebrates*. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- \_ Jeffery, S., Gardi, C., Jones, A., Montanarella, L., Marmo, L., Miko, L., Ritz, K., Peres, G., Römbke, J., and van der Putten, W. H. (eds.) (2010) *European Atlas of Soil Biodiversity*. European Commission, Publications Office of the European Union, Luxembourg.
- \_ Keller, A., Racine, S.A. (2019). *Biologische Bodeneigenschaften – Recherche Stand der Technik zu Bestimmungsmethoden und Geräten*. Pflichtenheft. Kompetenzzentrum Boden (KoBo), HAFL, Berner Fachhochschule BFH.

- \_ Keuskamp, J. A., Dingemans, B. J. J., Lehtinen, T., Judith M., Sarneel, J. M., Heffing, M. M. (2013) Tea Bag Index: a novel approach to collect uniform decomposition data across ecosystems. *Methods in Ecology and Evolution*. British Ecological Society.
- \_ Klüver, K., Elsner, D.-C., Filipinski, M., Cordsen, E., Gieske, M. (2020) Boden-Dauerbeobachtung in Schleswig-Holstein. Broschüre LLUR SH – GB 24. Landesamt für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein (LLUR), Allemagne.
- \_ MonViA. Monitoring der biologischen Vielfalt in Agrarlandschaften. [www.agrarmonitoring-monvia.de](http://www.agrarmonitoring-monvia.de).
- \_ Micheli, E., Bialousz, S., Bispo, A., Boixadera, J., Jones, A.R., Kibblewhite, M.G., Kolev, N., Kosmas, C., Lilja, H., Malucelli, F., Rubio, J.L., Stephens, M. (eds.) (2008) Environmental Assessment of Soil for Monitoring, Volume IVa: Prototype Evaluation (ENVASSO). EUR 23490 EN/4A. Office for the Official Publications of the European Communities, Luxembourg, 116 pp.
- \_ OECD (2006) OECD Series on Testing and Assessment No. 56. Guidance document on the breakdown of organic matter in litterbags. ENV/JM/MONO 23. Organization for Economic Co-Operation and Development, Paris, France.
- \_ Orgiazzi, A., Ballabio, C., Panagos, P., Jones, A., Fernández-Ugalde, O. (2018) LUCAS Soil, the largest expandable soil dataset for Europe: a review. *European Journal of Soil Sciences*, 69, 140–153.
- \_ Pansu, J., De Danieli, S., Puissant, J., Gonzalez, J.-M., Gielly, L., Cordonnier, T., Zinger, L., Brun, J.-J., Choler, P., Taberlet, P., Cecillon, L (2015). Landscape-scale distribution patterns of earthworms inferred from soil DNA. *Soil Biology & Biochemistry*, 83, 100-105.
- \_ Pelosi, C., Bertrand, M., Capowiez, Y., Boizard, H., Roger-Estrade, J. (2009) Earthworm collection from agricultural fields: Comparisons of selected expel-lants in presence/absence of hand-sorting. *European journal of soil biology* 45, 176–183.
- \_ Pfiffner, L. (2013) Vers de terre – Architectes des sols fertiles. Fiche Technique. Forschungsinstitut für biologischen Landbau FiBL. Frick, Schweiz.
- \_ Pulleman, M., Creamer, R., Hamer, U., Helder, J., Pelosi, C., Pérès, G., Rutgers, M. (2012) Soil biodiversity, biological indicators and soil ecosystem services – an overview of European approaches. *Current Opinion in Environmental Sustainability*, 4:529–538.
- \_ Ranjard, L. (2011) AgrInnov - Tester les Indicateurs de l'état biologique des sols en lien avec les pratiques agricoles. Compte rendu final de projet. PROJET CASDAR 1116 2011, France.
- \_ Resch, M. C., Schütz, M., Buchmann, N., Frey, B., Graf, U., van der Putten, W. H., ... Risch, A. C. (2021). Evaluating long-term success in grassland restoration: an ecosystem multifunctionality approach. *Ecological Applications*, 31(3)
- \_ REVA. Réseau d'expérimentation et de veille à l'innovation agricole. <https://www.ofsv.org/le-reva>
- \_ RMQS. Groupement d'intérêt scientifique SOL (GisSol) - Réseau de Mesures de la Qualité des Sols – RMQS. <https://www.gissol.fr/le-gis/programmes/rmqs-34>
- \_ RMQS. EcoBioSoil. Programme RMQS BioDiv. [https://ecobiosoil.univ-rennes1.fr/page/programme-rmqs-biodiv#Sites\\_RMQS\\_BioDiv](https://ecobiosoil.univ-rennes1.fr/page/programme-rmqs-biodiv#Sites_RMQS_BioDiv)

- \_ Römbke, J., Jänsch, S., Roß-Nickoll, M., Toschki, A., Höfer, H., Horak, F., Russell, D., Burkhardt, U., Schmitt, H. (2012) Erfassung und Analyse des Bodenzustands im Hinblick auf die Umsetzung und Weiterentwicklung der Nationalen Biodiversitätsstrategie. Umweltbundesamt, Texte 33/2012, Allemagne.
- \_ Römbke, J., (2014) The feeding activity of invertebrates as a functional indicator in soil. *Plant Soil* 383:43–46.
- \_ Rota, N., Canedoli, C., Ferrè, C., Ficetola, G.F., Guerrieri, A., Padoa-Schioppa, E. (2020) Evaluation of Soil Biodiversity in Alpine Habitats through eDNA Metabarcoding and Relationships with Environmental Features. *Forests*, 11,738.
- \_ Rutgers, M., Mulder, C., Schouten, A.J., Bloem, J., Bogte, J.J., Breure, A.M., Brussaard, L., De Goede, R.G.M., Faber, J.H., Jagers op Akkerhuis, G.A.J.M., Keidel, H., Korthals, G.W., Smeding, F.W., Ter Berg, C., Van Eekeren, N., (2008) Soil ecosystem profiling in the Netherlands with ten references for biological soil quality. RIVM Report 607604009/2008. Bilthoven, The Netherlands.
- \_ Rutgers, M., Schouten, A. J., Bloem, J., Van Eekeren, N., De Goede, R. G. M., Jagers Op Akkerhuis, G. A. J. M., Van Der Wal, A., Mulder, C., Brussaard, L., & Breure, A. M. (2009) Biological measurements in a nationwide soil monitoring network. *European Journal of Soil Science*, 60, 820–832.
- \_ Samaritani, E., Mitchell, E. A. D., Rich, J., Shrestha, J., Fournier, B., Frey, B. (2017) Soil bacterial communities and ecosystem functioning change more strongly with season than habitat in a restored floodplain. *Applied Soil Ecology*, 112, 71–78.
- \_ Scheunemann N., (2009) Methoden der Kohlenstoffmessung im Gelände und im Labor. <https://www.bodenkunde-projekte.hu-berlin.de/carlos/B01litterbag.html> (11.11.2022, 9:07)
- \_ Santos, S.S, Schöler, A., Nielsen, T.K., Hansen, L.H., Schloter, Winding, A. (2020) Land use as a driver for protist community structure in soils under agricultural use across Europe. *Science of The Total Environment*. 717, 137228.
- \_ Schleswig-Holstein Dauerbeobachtung. [www.schleswig-holstein.de/DE/Fachinhalte/B/boden/bodenDauerbeobachtung.html](http://www.schleswig-holstein.de/DE/Fachinhalte/B/boden/bodenDauerbeobachtung.html)
- \_ Singh, J., Singh, S., Vig, A. P. (2015) Extraction of earthworm from soil by different sampling methods: a review. *Environment Development and Sustainability* 18(6):1521-1539.
- \_ Singh, J., Singh, S., Bhat, S. A., Vig, A. P., Schädler, M. (2018) Eco-friendly method for the extraction of earthworms: Comparative account of formalin, AITC and Allium cepa as extractant. *Applied Soil Ecology*, 124, 141–145.
- \_ Stone, D., Ritz, K., Griffiths, B.G., Orgiazzi, A., Creamer, R. E. (2016) Selection of biological indicators appropriate for European soil monitoring. *Applied Soil Ecology* 97, 12–22.
- \_ Teatime 4 Science (2016) Tea bag index. <http://www.teatime4science.org/>
- \_ Tresch, S., Fliessbach, A. (2017) Decomposition study using tea bags. Technical note. Forschungsinstitut für biologischen Landbau FiBL. Frick, Schweiz.
- \_ UK soil observatory. <http://www.ukso.org/>
- \_ UniNE. Extraction de lombriciens. Protocole v2.0 du Laboratoire d'écologie fonctionnelle, Université de Neuchâtel.
- \_ van den Hoogen, J., Geisen, S., Routh, D., Ferris, H., Traunspurger, W., Wardle, D. A., ... Crowther, T. W. (2019). Soil nematode abundance and functional group composition at a global scale. *Nature*, 572(7768), 194-198.

- \_ VBB -BSA (2009) Aide à la mise en œuvre – Utilisation et interprétation des paramètres biologiques du sol. Groupe de travail «Biologie du sol – application» (BSA). Frick.
- \_ Villenave, C. (2014) La nématofaune. Fiche outil F3. Programme ADEME Bio-indicateurs II. [https://ecobiosoil.univ-rennes1.fr/ADEME-Bioindicateur/download/fiches-outil/fiche\\_outil\\_7\\_nematofaune.pdf](https://ecobiosoil.univ-rennes1.fr/ADEME-Bioindicateur/download/fiches-outil/fiche_outil_7_nematofaune.pdf)
- \_ Walser, M.; Schneider Mathis, D.; Köchli, R.; Stierli, B.; Maeder, M.; Brunner, I., 2021: Le sol forestier vit – diversité et fonctions des organismes vivants du sol. 2e édition révisée. Not. prat. 60. 12 p.

## 8. Annexe

---

### 8.1 Tableau de comparaison des paramètres biologiques et méthodes

En cliquant sur ce [lien](#), vous accédez au tableau de comparaison des paramètres biologiques et méthodes.

---

### 8.2 Liste du matériel et coûts

La liste du matériel et des coûts peut être consultée dans les tables ci-dessous pour les différents paramètres biologiques discutés dans ce rapport ou directement dans la table [Excel](#).

## Vers de terre

Méthode	Matériel	unité	Prix (Euro)	prix (CHF)	quantité requise (1 réplikat)	Total CHF	Moyenne CHF
Vers de terre	stéréomicroscope min 40x	1		1028	1	1028.00	
Vers de terre	stéréomicroscope min 40x	1		357	1	357.00	692.50
Vers de terre	balance précision 0.01g a 200g	1		126	1	126.00	126.00
Vers de terre	farine de moutarde	1000		10	120	1.20	1.20
Vers de terre	AITC 94-97% purity	1000		134	1	0.13	0.13
Vers de terre	formaldéhyde	10000		74.9	25	0.19	0.19
Vers de terre	formaldéhyde	10000		74.9	400	3.00	3.00
Vers de terre	ethanol 70%	5000		53	400	4.24	4.24
Vers de terre	Cisaille à gazon	1		10	1	10.00	10.00
Vers de terre	Cadre métallique 50cm x 50 cm ou 56.4 cm de diamètre	1			1	0.00	0.00
Vers de terre	masse	1		26	1	26.00	26.00
Vers de terre	Bidons ou estagnons d'eau (30-40L)	1		16	1	16.00	16.00
Vers de terre	cylindre gradué volume min 50ml ou bécher 1L	1		22	1	22.00	22.00
Vers de terre	Gants de protection	50		42	1	0.84	0.84
Vers de terre	Flacons plastiques ou en verre 250ml avec bouchons hermétiques	200		101	1	0.51	0.51
Vers de terre	Flacons plastiques ou en verre 500 ml avec bouchons hermétiques	10		29	1	2.90	2.90
Vers de terre	pincettes rondes	2		9	2	9.00	9.00
Vers de terre	bêche/pelle	1		15	1	15.00	
Vers de terre	bêche/pelle	1		70	1	70.00	42.50
Vers de terre	bâche plastiques (1m2 à 2 m2, ou env. 2m x 2m)	1		17	1	17.00	17.00
Vers de terre	Thermomètre	1		127	1	127.00	127.00
Vers de terre	grand bac plastique ou cuvette	1				0.00	0.00
Vers de terre	arrosoirs 10 a 15L	1		3	3	9.00	
Vers de terre	arrosoirs 10 a 15L	1		18	3	54.00	31.50
Vers de terre	tamis 2mm	1		135	1	135.00	135.00
<b>Vers de terre</b>						<b>Investissement</b>	<b>1267.50</b>
<b>Vers de terre</b>						<b>Consommables</b>	<b>13.00</b>
<b>Vers de terre</b>						<b>Consommables (avec AITC et fixation formaldéhyde uniquement)</b>	<b>7.38</b>



## Microarthropodes

Méthode	Matériel	unité	Prix (Euro)	prix (CHF)	quantité requise (1 réplikat)	Total CHF	Moyenne CHF
microarthropodes	split soil corer diam 5.6, 40 cm long	1		850.00	1	850.00	850.00
microarthropodes	tube plastique	1		2.50	3	7.50	7.50
microarthropodes	sachet plastiques	75		3.65	3	0.15	0.15
microarthropodes	extrateur mac fadyen (selon offre)	1	13663	14990.00	1	14990.00	14990.00
microarthropodes	Pot d'extraction 100-200cm3	264		126.60	3	1.44	1.44
microarthropodes	formaldéhyde	10000		74.90	6	0.04	0.04
microarthropodes	acide acétique	500		37.20	0.18	0.01	0.01
microarthropodes	propan2-ol	2500		93.70	0.018	0.00	0.00
microarthropodes	microscope contraste de phase	1		1988.00	1	1988.00	
microarthropodes	microscope contraste de phase	1		2296.00	1	2296.00	2142.00
microarthropodes	stéréomicroscope min 40x	1		1028.00	1	1028.00	
microarthropodes	stéréomicroscope min 40x	1		357.00	1	357.00	692.50
microarthropodes	lame alvéolée	50		133.60	10	26.72	26.72
microarthropodes	plaque chauffante	1		517.70	1	517.70	517.70
microarthropodes	petri 90mm	825		148.40	10	1.80	1.80
microarthropodes	ethanol 70%	5000		53.00	450	4.77	4.77
microarthropodes	flacon 60ml	700		109.05	15	2.34	2.34
microarthropodes	acide lactique	1		36.80	0.01	0.37	0.37
microarthropodes	hydrate de chloral	1000		253.00	80	20.24	20.24
microarthropodes	hydrogen chloride	100		39.30	5	1.97	1.97
microarthropodes	gomme arabique	500		99.30	30	5.96	5.96
microarthropodes	hydrate chloral	250		35.90	200	28.72	28.72
microarthropodes	crystal de phenol						
microarthropodes	glycerine	500		286.00	0.05	0.03	0.03
microarthropodes	pincette ressort	1		12.55	1	12.55	12.55
microarthropodes						Investissement	19306.80
microarthropodes						Consommables	16.61

## Nématodes

Méthode	Matériel	unité	Prix (Euro)	prix (CHF)	quantité requise (1 réplikat)	Total CHF	Moyenne CHF
nématodes	gouge soil auger edelmann	1		130	1	130	130
nématodes	seau plastique	1		4.5	10	45	45
nématodes	tamis 8 mm	1		155.4	1	155.4	155.4
nématodes	sachet plastiques	75		3.65	1	0.05	0.05
nématodes	elutriateur ostenbrink	1	5655	6107	1	6107.4	6107.4
nématodes	tamis 45 um diam 30cm	1		178.5	3	535.5	535.5
nématodes	tamis 250 um diam 10 cm	1		127	1	127	127
nématodes	cuvette	1		2.95	1	2.95	2.95
nématodes	tamis 100 um diam 16 cm	1		111	1	111.00	111.00
nématodes	filtre cotton hydrophile						
nématodes	petri 90mm	825		148.4	5	0.90	0.90
nématodes	recipient stockage nématodes 100ml verre	24		92.4	1	3.85	3.85
nématodes	stéréomicroscope min 40x???	1		1028	1	1028.00	
nématodes	stéréomicroscope min 40x	1		357	1	357.00	692.50
nématodes	boite comptage	1	177	191.16	2	382.32	382.32
nématodes	lame microscope	2500		98.7	2	0.08	0.08
nématodes	microscope contraste de phase???	1		1988	1	1988.00	
nématodes	microscope contraste de phase	1		2296	1	2296.00	2142.00
nématodes	formaldéhyde	10000		74.9	12	0.09	0.09
nématodes	plaque chauffante	1		517.7	1	517.70	517.70
nématodes	Agitateur vortex	1		134.65	1	134.65	
nématodes	Agitateur vortex	1		533.4	1	533.40	334.03
nématodes	centrifugeuse	1		7831.6	1	7831.60	7831.60
nématodes	spectrophotomètre (selon offre)	1		12800	1	12800.00	
nématodes	spectrophotomètre (selon offre)	1		13600	1	13600.00	13200.00
nématodes	illumina MiSeq	1		103950	1	103950.00	103950.00
nématodes	illumina MiSeq	1		8892	1	8892.00	8892.00
nématodes	coût analyse moléculaire	1		45	1	45.00	45.00
nématodes					analyse morphologique	Investissement	10948.77
nématodes					analyse morphologique	Consommables	4.97
nématodes					analyse moléculaire ADN	Investissement (sans séquenceur)	28424.48
nématodes					analyse moléculaire ADNe	Investissement (sans séquenceur)	21540.63
nématodes					ADN + ADNe	coût analyse moléculaire	45.00

## Protistes

Méthode	Matériel	unité	Prix (Euro)	prix (CHF)	quantité requise (1 réplikat)	Total CHF	Moyenne CHF
protistes	gouge soil auger edelmann	1		130	1	130.00	130.00
protistes	Fast DNASPIN kit for soil	100		420	1	4.20	4.20
protistes	Agitateur vortex	1		134.65	1	134.65	
protistes	Agitateur vortex	1		533.4	1	533.40	334.03
protistes	centrifugeuse	1		7831.6	1	7831.60	7831.60
protistes	spectrophotomètre (selon offre)	1		12800	1	12800.00	
protistes	spectrophotomètre (selon offre)	1		13600	1	13600.00	13200.00
protistes	illumina MiSeq	1		103950	1	103950.00	103950.00
protistes	illumina MiSeq	1		8892	1	8892.00	8892.00
protistes	Cutadapt software	1		0	1	0.00	0.00
protistes	Dada2 package (Bioconductor)	1		0	1	0.00	0.00
protistes	qiime2 software	1		0	1	0.00	0.00
protistes	coût analyse	1		45	1	45.00	45.00
protistes	offre de prestation	1		25	1	25.00	25.00
protistes						Investissement (sans séquenceur)	21569.83
protistes						Investissement (avec séquenceur)	134411.83
protistes						coût analyse	45.00
protistes						offre de prestation	25.00
protistes						Consommables	4.20

## Méthodes fonctionnelles

Méthode	Matériel	unité	Prix (Euro)	prix (CHF)	quantité requise (1 réplikat)	Total CHF	Moyenne CHF
Tea bag	Sachet de thé , thé vert	1	4.29	4.63	0.05	0.23	0.23
Tea bag	Sachet de thé, roiboos	1	4.29	4.63	0.05	0.23	0.23
Tea Bag	Tarrière Edlmann	1	133.68	144.37	1	144.37	144.37
Tea bag	Four a Moufle	1		5870	1	5870.00	
Tea bag	Four a Moufle	1		3615	1	3615.00	
Tea bag	Four a Moufle	1		9445	1	9445.00	
Tea bag	Four a Moufle	1		8250	1	8250.00	
Tea bag	Four a Moufle	1		4840	1	4840.00	6404.00
Tea Bag	Dessicateur/étuve	1		1425.2	1	1425.20	
Tea Bag	Dessicateur/étuve	1		7410.2	1	7410.20	4417.70
Tea Bag	Creusets en porcelaine	6		41.18	0.33	13.73	13.73
Tea Bag	Balance de précision 0.000	1		294	1	294.00	294.00
<b>Tea bag</b>						<b>Investissement</b>	<b>11274.26</b>
<b>Tea bag</b>						<b>Consommables</b>	<b>0.46</b>
Litter bag	Treillis nylon	1		30			
Litter bag	Treillis nylon	1	30	32.40			
Litter bag	Treillis nylon	1		31.20	0.1	3.12	3.12
Litter bag	Paille	100000		16	0.00005	0.00	0.00
Litter bag	bêche/pelle	1		15	1	15.00	
Litter bag	bêche/pelle	1		70	1	70.00	42.50
Litter bag	Dessicateur/étuve	1		4417.7	1	4417.70	4417.70
Litter bag	Four a Moufle	1		6404	1	6404.00	6404.00
Litter bag	Creusets en porcelaine	6		54.49	0.333333333	18.16	18.16
<b>Litter bag</b>						<b>Investissement</b>	<b>10927.98</b>
<b>Litter bag</b>						<b>Consommables</b>	<b>3.12</b>
Bait Lamina	Bait Lamina pleins	1	4.4	4.75	8	38.02	
Bait Lamina	Bait Lamina pleins	1		3.2	3.98	25.60	31.81
Bait Lamina	Bait Lamina vides	1	3.8	4.10	8	32.83	
Bait Lamina	Bait Lamina vides	1		2.7	3.40	21.60	27.22
Bait Lamina	sachet plastiques	75		3.65	1	0.05	0.05
Bait Lamina	Mix de remplissage	10		2.15	1.07	0.23	0.23
<b>Bait Lamina</b>						<b>50 sites à 5 réplikat (8 BL chaque), vides Investissement</b>	<b>6804.00</b>
<b>Bait Lamina</b>						<b>Consommables</b>	<b>0.23</b>

---

## 8.3 Interviews réalisées

Des interviews ont été menées avec les experts du domaine en Suisse pour différents paramètres biologiques, notamment :

- \_ Dr. Claire Le Bayon, Professeure titulaire au Laboratoire d'écologie fonctionnelle de l'université de Neuchâtel, pour les vers de terre. L'interview a été menée par téléphone (14.10.2020) et par échanges de courriels.
- \_ Dr. Claudia Maurer de l'Office de l'agriculture et de la nature du canton de Berne, service spécialisé Sols, pour les vers de terre. L'interview a été menée par téléphone (27.10.2020) et par échanges de courriels.
- \_ Dr. Beat Frey, Directeur de l'Unité de recherche sur les Processus rhizo-sphériques à l'Institut fédéral de recherches sur la forêt, la neige et le paysage (WSL), pour les nématodes. L'interview a été menée par échange de courriel (25.11.2020).
- \_ Le Professeur Thierry Heger du Groupe Science du sol et environnement de la Haute école de viticulture et œnologie de Changins (HES-SO Changins), pour les protistes. L'interview a été menée par téléphone (08.10.2020) et par échanges de courriels.

Les recommandations et informations fournies par ces experts ont été intégrées dans les différentes sections de ce rapport sous la mention «communication personnelle».

**Centre de compétences sur les sols**  
BFH-HAFL  
Länggasse 85 \_ 3052 Zollikofen  
info@ccsols.ch \_ ccsols.ch