

OBJECTIF

Extraire et déterminer le nombre de nématodes libres dans un échantillon de sol grâce à une méthode simple.

PRINCIPE

La quantification des nématodes est réalisée par un tamisage, élutriation et piégeage actif avant de faire un comptage de ceux-ci à la loupe binoculaire

AVANTAGES

- + Facile à réaliser
- + Rapide
- + Peu coûteux (pas ou peu de consommables)

INCONVENIENTS

- Nécessite une loupe binoculaire
- Nécessite un ajustement du temps d'extraction en fonction du type de sol
- Difficulté pour identifier les nématodes

MATERIEL

- Tarière
- Bassine
- Balance
- Sachet plastique
- Glacière
- Eau distillée
- Bouteille de 1 L
- Bocal de 500 mL
- Béchers
- Tamis de mailles de 2 mm et 50 µm
- Papiers absorbants
- Balance
- Pissette
- Assiettes en plastique
- Chronomètre
- Loupe Binoculaire
- Compteur et lame de comptage
- Flacons en verre de 50 ml
- Coupelles
- Solutions de formols diluées à 5%
- Masque
- Pipettes de 5 ml et 1 ml
- Bouilloire
- Flacons plastiques de 15 ml

Photo : Cécile Villenave





PROTOCOLE : Cette méthode dite des bouteilles (ou « The Erlenmeyer, or (milk) bottle method ») est une méthode simplifiée d'extraction des nématodes du sol

1^{ère} étape

Prélever une dizaine de carottes d'une profondeur de 10 cm environ avec un cylindre ou une tarière

2^{ème} étape

Placer les carottes dans des bassines étiquetées

3^{ème} étape

Homogénéiser le contenu des bassines, retirer les grosses racines et les éléments grossiers



Les échantillons doivent être conservés à l'abri de la chaleur (dans une glacière sans glace par exemple) puis ramenés au laboratoire. L'extraction des nématodes doit avoir lieu moins d'une semaine après le prélèvement.

4^{ème} étape

Au laboratoire, le sol est bien homogénéisé. On pèse avec précision une quantité de 250 g d'échantillon

5^{ème} étape

Mélanger cet échantillon avec 200 ml d'eau distillée dans une cuvette

6^{ème} étape

Verser toute la suspension et le sol dans une bouteille de 1 L en utilisant un entonnoir et une pissette d'eau. On remplira la bouteille à ras bord. Bien mélanger, par retournement, la bouteille fermée.

7^{ème} étape

Placer la bouteille sur un bocal rempli d'eau (500 ml) en retournant la bouteille de manière à ce que le niveau de l'eau dans le bocal soit juste au-dessus du goulot de la bouteille retournée.

8^{ème} étape

Dévisser le bouchon de la bouteille et lancer le chronomètre. Le sol s'écoule dans le bocal à une vitesse plus ou moins rapide selon sa granulométrie



9^{ème} étape

Après 4-5 minutes pour les sols sableux et 7-8 minutes pour les sols argileux, retirer la bouteille en bouchant le goulot avec les doigts et sans appuyer sur la bouteille afin d'éviter tout rejet d'eau dans le bocal.

Nématofaune

10^{ème} étape

Verser délicatement le contenu de la bouteille dans une colonne de 3 tamis (de maille 50 µm) préalablement humidifiés



Pour les derniers 200 ml de solution, bien agiter la bouteille avant de verser sur les tamis afin de récupérer les particules collées à la bouteille

11^{ème} étape

Récupérer les refus des 3 tamis dans un bécher de 200 ml

12^{ème} étape

Verser les premiers 500 ml du contenu du bocal dans la colonne de 3 tamis et répéter l'étape deux fois, ensuite verser le sol et l'eau restant du bocal dans la bouteille vide. Avec une pissette, on éliminera les particules collées au fond du bocal.



Ne pas dépasser 1 L d'eau

13^{ème} étape

Répéter l'étape de sédimentation avec les bouteilles (élutriation)

14^{ème} étape

Découper des morceaux de papier absorbant et les placer dans un tamis de 2 mm de manière à favoriser le contact avec l'intégralité de la surface du tamis. Humidifier avec la pissette.

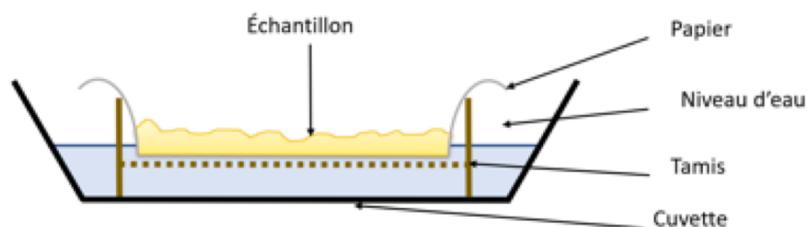
15^{ème} étape

Verser lentement le contenu du bécher dans le tamis. Réaliser l'opération dans l'évier pour laisser couler l'excès d'eau.

16^{ème} étape

Mettre le tamis dans une coupelle et verser de l'eau au fond jusqu'à ce que l'eau arrive au niveau du papier absorbant

48 heures



48h : période de repos pendant lesquelles les nématodes actifs et vivants vont migrer dans l'eau de la coupelle sous le papier absorbant

Nématofaune

17^{ème} étape

Récupérer l'eau limpide de la coupelle contenant les nématodes dans un bécher taré de 100 mL

18^{ème} étape

Mesurer le volume total de l'eau de récupération par pesée puis compter sous binoculaire les nématodes dans un aliquote de 5 mL.

19^{ème} étape

Fixation des nématodes pour la détermination des taxons. Verser l'eau contenant les nématodes dans des flacons en verre de 50 mL en laissant décanter pendant 24h. Récupérer le fond pour les faire concentrer dans des coupelles.

48 heures



Le tout sera conservé au froid pendant 48h

20^{ème} étape

Récupérer le fond concentré des nématodes. Mettre environ 500 µL de concentré de nématodes dans un flacon en plastique de 15 mL. Sous hotte et avec un masque, ajouter 5mL de formol chauffé puis 5mL de formol froid dilué à 5%

Dernière étape

Observer sur une grande lame au microscope les nématodes pour la détermination des taxons.



Cette opération nécessite une expertise réelle.

ANALYSE ET INTERPRETATION DES RESULTATS

Le comptage se fait grâce à la lame de comptage qui permet la détermination du nombre de nématodes dans un volume précis (5 mL). Ce résultat sera exprimé en nombre de nématodes/mL.

Le nombre obtenu sera extrapolé au volume total pour estimer la concentration totale/kg de sol.

Le comptage se fera électroniquement ou manuellement à l'aide d'une loupe binoculaire.

La lame est observée sous le microscope. On compte au moins 4 ou 5 carrés du quadrillage.

Calcul pour obtenir la densité des nématodes :

Densité (*nombre de nématodes total pour 250 g de sol frais*) = (Quantité de nématodes x Volume total) / 5.

Il faut ensuite diviser ce nombre par 250 pour avoir la densité par gramme de sol frais. Une analyse complémentaire de l'humidité des sols est nécessaire pour exprimer les résultats en nombre d'individus par gramme de sol sec.

CONCLUSION

Cette méthode permet de déterminer le nombre de nématodes dans le sol. Cela permettra de faire une comparaison entre différentes zones d'étude et également d'avoir une idée du seuil de fréquence et de nuisibilité des nématodes.

Différences et complémentarités par rapport à d'autres méthodes d'extraction

Il existe un grand nombre de méthodes d'extraction des nématodes selon le matériel à partir duquel les nématodes sont extraits, mais également en fonction des espèces de nématodes. Extraire les nématodes à partir de matières organiques peut être réalisé avec les méthodes suivantes : « l'entonnoir de Baermann », la méthode « Funnel spray » ou les méthodes dites « Blender filter ou centrifugal flotation ». A partir du sol, les nématodes peuvent être extraits avec la méthode « cotton wool filter method », la Méthode « decanting and sieving de Cobb » ou en utilisant « l'élutriation d'Oostenbrink ».

Pour les nématodes à kystes, les méthodes suivantes peuvent être utilisées : « Baunacke », « Fenwick can », « Kort's cyst extraction elutriator » ou la plus courante « Seinhorst cyst extraction elutriator ».

Nématofaune

POUR EN SAVOIR PLUS :

Sources bibliographiques :

Coleman D.C., Crossley Jr. A.D. & Hendrix P.F. (2004) Fundamentals of Soil Ecology 2e. Burlington, MA. Elsevier Academic Press.

Mahesh Kumar R., Catherine S., Cotillas & Raveendra H.R. (2012) Comparative efficiency in different methods of extracting nematode from soil and plant material. International Journal of Advanced Biological Research 2: 143-145.

Römbke J., Sousa J.P., Schouten T. & Riepert F. (2006) Monitoring of soil organisms: a set of standardized field methods proposed by ISO. European Journal of Soil Biology 42: S61-S64.

Villenave C., Saj S., Pablo A.L., Sall S., Djigal D., Chotte J.L. & Bonzi M. (2010) Influence of long-term organic and mineral fertilization on soil nematofauna when growing Sorghum bicolor in Burkina Faso. Biology and Fertility of Soils 46: 659-670.

Villenave C., Rabary B., Chotte J.L., Blanchart E. & Djigal D. (2009) Impact of direct seeding mulch-based cropping systems on soil nematodes in a long-term experiment in Madagascar. Pesquisa Agropecuaria Brasileira 44: 949-953.

Whitehead A.G. & Hemming J.R. (1965) A comparison of some quantitative methods of extracting small vermiform nematodes from soil. Annals of Applied Biology.

Sources Internet :

<http://nemaplex.ucdavis.edu/Methods/extrmeth.htm>

**Lien vers la vidéo
(non disponible)**

