

Ecologie chimique du milieu édaphique: interactions entre deux moisissures *Mucor* sp. et *Geotrichum candidum* et le ver rouge *Eisenia fetida* (Oligochaeta, Lumbricidae)

Lara Zirbes

1. Résumé du projet FRIA

Ce projet sera réalisé dans le but de comprendre les interactions existant entre les moisissures *Mucor* sp. et *Geotrichum candidum* d'une part et le ver rouge *Eisenia fetida* d'autre part. En effet, la réalisation de mon travail de fin d'études a permis de mettre en évidence que le filtrat de culture de ces moisissures était significativement (p-value inférieure à 0,001) attractif pour *E. fetida*. La compréhension de cette attraction permettrait d'optimiser l'utilisation d' *E. fetida* dans les domaines de la lombriculture et de la bioremédiation.

La première étape sera de mettre au point deux olfactomètres, un olfactomètre à 4 voies et un olfactomètre compartimenté (Figure 1) et de les valider afin de déterminer leur efficacité à étudier le comportement d' *E. fetida* vis-à-vis des filtrats de culture de moisissures.



Figure 1: Olfactomètres à 4 voies (à gauche) et compartimenté (à droite)

La deuxième étape consistera à rechercher la molécule synthétisée par les moisissures qui est responsable de l'attraction d' *E. fetida*. Dans cette optique, trois pistes seront investiguées: celle des molécules organiques volatiles, celle des protéines, et celle des autres métabolites secondaires.

La troisième étape sera l'étude de la phylogénie de *Mucor* sp. et de *G. candidum* afin d'établir un arbre phylogénique des organismes qui produisent la même molécule attractive que les moisissures d'intérêt. Les microorganismes les plus apparentés seront testés en olfactométrie sur le comportement d' *E. fetida*.

L'étape suivante consistera à optimiser la production du métabolite d'intérêt.

Enfin, deux applications industrielles seront envisagées: la mise au point d'un système d'extraction d' *E. fetida* dans le cadre du lombricompostage, et d'un système de bioremédiation d'un sol contaminé.

2. Déroulement du doctorat depuis janvier 2008

- Mise en élevage des vers

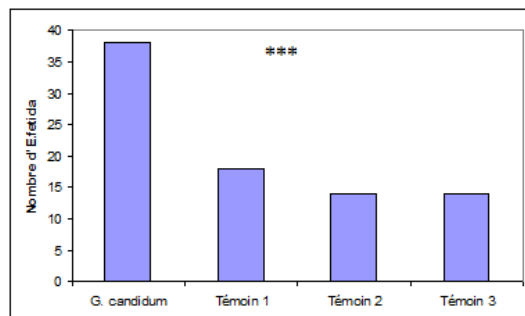
Les lombriciens utilisés pour ce projet appartiennent à l'espèce *Eisenia fetida* et proviennent de la société Ouroboros s.a.. *E. fetida* est mis en élevage dans une salle conditionnée de l'Unité d'entomologie fonctionnelle et évolutive (FUSAGx). Les lombriciens sont placés dans des bacs en plastique avec couvercle (42cm de longueur, 30cm de largeur et 10cm de hauteur)

remplis avec environ 3,6kg de terreau universel DCM. Le contenu des bacs est entièrement renouvelé tous les 2 mois.

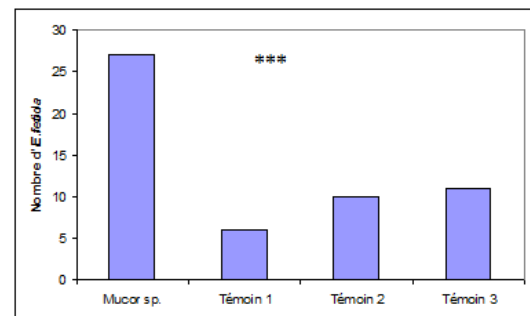
Afin de maintenir une humidité convenable pour les vers, chaque bac est arrosé une fois par semaine. Vingt trous sont percés dans chaque bac dans le but d'évacuer le trop plein d'eau qui entraînerait l'anaérobiose du milieu, et de fournir une aération suffisante au système

- Modification de l'olfactomètre à 4 voies et sa validation

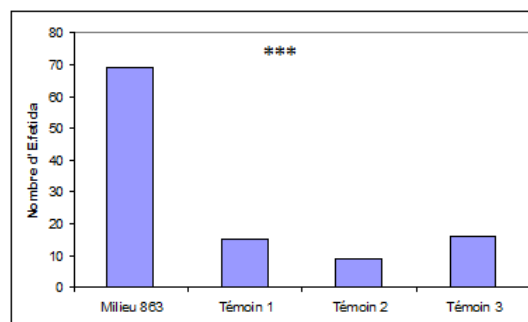
Afin d'éviter que certains vers se retrouvent piégés dans la partie inférieure centrale de l'olfactomètre à 4 voies, une plaque en plexiglas a été placée à la base des ouvertures vers les 4 voies. Une fois modifiés, les olfactomètres sont testés dans l'étude du comportement d'*E. fetida* vis-à-vis des jus de culture des moisissures et du milieu 863 (Figure 2). 20 vers ont été placés au centre de l'olfactomètre et 25 ml d'attractant dans un bras de l'olfactomètre à 4 voies rempli de terreau universel DCM (6 répétitions).



(a)



(b)



(c)

Figure 2: Comportement d'*E. fetida* vis-à-vis du jus de culture de *G. candidum* (a, $p = 0,000$), du jus de culture de *Mucor* sp. (b, $p = 0,000$) et du milieu de culture 863 (c, $p = 0,000$) après 24h dans un olfactomètre à 4 voies.

Un test χ^2 d'ajustement est réalisé afin de comparer la distribution observée à une distribution théorique, distribution observée si le choix des vers était dû au hasard c'est-à-dire que chacune des voies aurait la même probabilité d'être visitée.

Les figures 2 (a) et 2 (b) mettent en évidence que les changements apportés à l'olfactomètre à 4 voies ne modifient pas le comportement d'*E. fetida* vis-à-vis des moisissures d'intérêt.

Le milieu 863 sans microorganisme a été testé afin de voir si ce n'est pas le milieu dans lequel se trouvent les moisissures qui attirent les vers. L'analyse statistique montre que le milieu 863 attire *E. fetida* de manière très hautement significative MAIS l'expérience est biaisée car l'introduction de milieu 863 dans les olfactomètres à 4 voies remplis de terreau DCM entraîne le développement visible de microorganismes du terreau. De plus, une forte odeur d'ail (semblable à celle de l'ail des ours) est détectable à l'odorat humain. Il est donc impossible d'exclure les volatils de moisissures comme attractants.

- Essai du milieu OCDE 207

Du milieu universel OCDE 207 inerte (10% de tourbe, 70% de sable, 20% de kaolin) est préparé selon des recommandations de "OCDE Guideline for testing of chemical 207". Un test de mortalité des vers est effectué. 15 vers sont placés dans ce milieu et y sont laissés pendant 72h (4 répétitions). Le nombre de vers est évalué après ce laps de temps et les résultats montrent que 90% des vers survivent.

Des expériences sur le comportement des vers sont alors réalisées dans les olfactomètres à 4 voies remplis de milieu OCDE 207. 32 vers sont placés au centre de l'olfactomètre (3 répétitions) après avoir jeûné pendant 48h. 25 ml du filtrat de la culture de *G. candidum* sont placés dans le bras D comme attractant. Après 48h, le nombre de vers dans chaque bras est évalué (Figure 3).

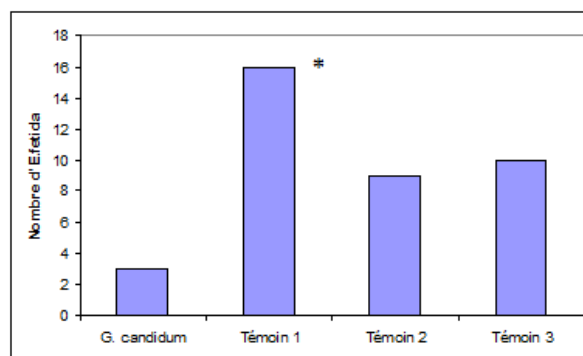


Figure 3: Comportement d'*E. fetida* vis-à-vis du filtrat de culture de *G. candidum* dans du milieu OCDE 207.

L'analyse des résultats montrent que les vers ne sont pas attirés par le jus de culture de *G. candidum*. Cette constatation est en totale contradiction avec ce qui a été observé précédemment lors de la réalisation de mon TFE et lors de la validation de l'olfactomètre à 4 voies de ce projet. De plus, des comportements inhabituels des vers ont été observés. Premièrement, le nombre de vers qui fait un choix est moins important que dans les expériences réalisées auparavant. Deuxièmement, la majorité des vers sont soit restés en contact là où ils avaient été déposés, soit collés contre les parois de manière à être un minimum en contact avec le milieu.

En conclusion, si le milieu n'est pas mortel pour les vers, il n'est cependant pas adapté à l'étude du comportement des vers vis-à-vis d'une source de nourriture.

- Etude de l'agrégation des vers

Lors de la réalisation de mon travail de fin d'études, la formation de boule de vers de terre est observée (Figure 4). De plus, dans les bacs d'élevage, il est fréquent de retrouver les vers les uns à proximité des autres. Sur base de ces observations, l'étude d'un éventuel comportement agrégatif des vers est entreprise en collaboration avec Monsieur le Professeur Deneubourg de l'ULB.



(a)



(b)

Figure 4: Observation d'un comportement éventuellement agrégatif des vers, (a) en milieu non naturel, (b) en milieu naturel

Afin d'étudier cet éventuel comportement, 20 vers sont placés au centre d'un olfactomètre à 2 voies rempli de terreau DCM. Chaque voie contient à son extrémité la même source de nourriture, à savoir un mélange de 25ml de filtrat d'une culture de moisissures de 42h avec 50g de terreau. Après 24h, le nombre de vers dans chaque voie est évalué. La figure 5 montre l'évolution du nombre de vers dans les bras A et B de l'olfactomètre en fonction des répétitions.

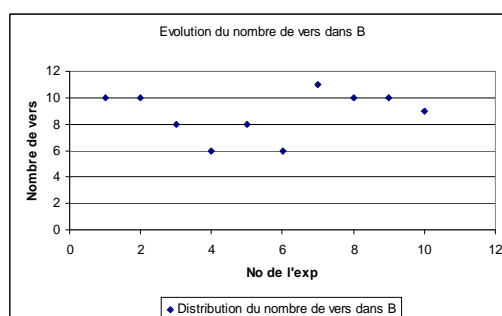
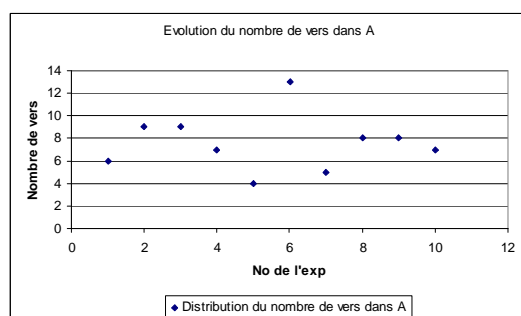


Figure 5 : Evolution du nombre de vers dans le bras A (gauche) et dans le bras B (droite)

Un test χ^2 d'ajustement met en évidence qu'il n'y pas de différence significative ($p = 0,35$) dans le choix d'une voie par les vers (Figure 6). Des essais avec des densités de vers différentes sont en cours.

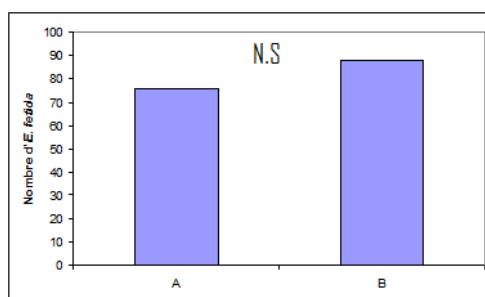


Figure 6: Comportement de *E. fetida* vis-à-vis de deux sources identiques de nourriture

- Etude des volatils de vers de terre

- SPME/GC-MS

Plusieurs catégories d'échantillons ont été testées: 2, 5, 10, 20, 50 vers vivants, 5 vers broyés, terreau et blanco. Chaque échantillon a été traité de la même façon : il est introduit dans un vial fermé hermétiquement et mis au bain-marie à 30°C pendant 10 min. La fibre de

prélèvement (CAR/PDMS) est ensuite exposée dans l'espace de tête pendant 1h avant d'être introduite dans l'injecteur du GC/MS. Les résultats obtenus sont présentés dans les tableaux 1 et 2.

Cases vertes = présence de la molécule

Cases rouges = absence de la molécule

Tableau 1: Volatils émis par *E. fetida*

Ech.	Tps de prélèvement	Rép.	Hexanal	α -pinène	Méthylheptenone	Limonène	Longifolène
Blancos fibre	0h	5					
Témoins	1h	2					
2 vers	1h	2					
5 vers	1h	1					
10 vers	1h	1					
20 vers	1h	1					
5 vers broyés	1h	6					
Terreau	1h	1					
50 vers	3h	2					

Tableau 2: Répétabilité de la détection des molécules d'intérêt pour les échantillons d'*E. fetida*

Volatils de vers / SPME/ GC-MS					
	Hexanal	α -pinène	6-méthyl-5-hepten-2-one	Limonène	Longifolène
20 vers (1)					
50 vers (1)					
50 vers (2)					
5 vers broyés (1)					
5 vers broyés (2)					
5 vers broyés (3)					
5 vers broyés (4)					
5 vers broyés (5)					
5 vers broyés (6)					

○ Super Q/Ultrafast

Les volatils de vers de terre ont ensuite été prélevés dynamiquement et piégés sur une phase Super Q. Les cartouches de piégeage sont alors éluées avec 100 μ l de diéthyléther. 5 molécules (Hexanal, α -pinène, 6-méthyl-5-hepten-2-one, Limonène et Longifolène) sont systématiquement recherchées. Pour connaître les temps de rétention de ces molécules, des standards ont été préparés et injectés (Tableau 3).

Tableau 3: Temps de rétention des molécules d'intérêt

Molécules	Temps de rétention
Hexanal	0,506
α -pinène	0,721
6-méthyl-5-hepten-2-one	0,802
Limonène	0,877
Longifolène	1,449

Les analyses réalisées portent sur des échantillons de 15 vers coupés et 50 vers vivants. Les vers sont placés dans un flacon de 100ml et celui-ci est relié au système de prélèvement

dynamique. Le débit des pompes est fixé à 300ml/min et le temps d'analyse est de 45 min. Le tableau 4 présente les résultats obtenus.

Tableau 4: Molécules volatiles émises par *E. fetida* vivant et coupé

Volatils de vers / Super Q/ Ultrafast						
Ech.	Rép.	Hexanal	α -pinène	6-méthyl-5-hepten-2-one	Limonène	Longifolène
15 vers coupés	19					
50 vers	2					

Il est important de noter que les analyses ne sont pas répétables dans la détection des molécules. Les chromatogrammes montrent également des pics qui ne correspondent pas aux molécules recherchées. Des analyses en GC-MS sont donc entreprises.

○ Super Q/GC-MS

Les prélèvements de volatils se font dans les mêmes conditions que le point précédent. Les éluats sont analysés en GC/MS sur colonne apolaire. Les résultats sont repris dans le tableau 5.

Tableau 5: Volatils émis par *E. fetida* lorsqu'il est coupé

Volatils de vers / Super Q/ GC-MS					
	hexanal	α -pinène	6-méthyl-5-hepten-2-one	limonène	longifolène
10 vers matures coupés (1)					
10 vers matures coupés (2)					

• Etude des volatils de moisissures

○ SPME/GC-MS (test préliminaire)

Les volatils de *Mucor* sp. et de *G. candidum* ont été analysés par SPME/GC-MS. 2 ml des filtrats des cultures de moisissures de 24h ont été placés dans un vial maintenu pendant 10 min à 30°C dans un bain-marie avant que la fibre ne soit exposée dans l'espace de tête pendant 1h. Les chromatogrammes montrent que les acides sont la classe de molécules majoritaire avec également des cétones et des alcools.

Tableau 6: Molécules volatiles émises par le jus de culture de *Mucor* sp.

Volatils de <i>Mucor</i> sp./SPME/ GC-MS			
Temps de rétention	Molécule	<i>Mucor</i> sp. 1	<i>Mucor</i> sp. 2
1,34	Ethanol		
	1-propanol		
1,62	2-méthoxy-2-méthylpropane		
	Ac. acétique éthyl ester		
1,96	2-méthyl-1-propanol		
	3-méthylbutanal		
2,26	butanol		
2,87	3-hydroxy-2-butanone		
3,4	3-méthylbutan-1-ol		
5,01	Ac. butanoïque-3-méthyl ethyl ester		
6,07	2,5-diméthylpyrazine		
6,37	Molécule n.i		
11,57	Molécule n.i		

Tableau 7: Molécules volatiles émises par le jus de culture de *G. candidum*

Volatils de <i>G. candidum</i>/SPME/GC-MS			
Temps de rétention	Molécules	<i>G. candidum</i> 1	<i>G. candidum</i> 2
1,33	Ethanol		
1,62	2-méthoxy-2-méthylpropane		
1,86	ethylacétate		
1,94	2-méthylpropanol ou 2-butanol		
2,15	Molécule n.i		
2,8	Ac. propanoïque éthyl ester		
3,08	3-méthylbutan-1-ol		
3,2	Molécule n.i		
3,34	Molécule n.i		
3,37	Molécule n.i		
3,49	Molécule n.i		
3,53	Ethylisobutyrate		
3,56	Molécule n.i		
3,7	Ethyl isobutyrate		
3,88	Ac. 2-méthyl-2-propanoïque ethyl ester		
4,16	Ethyl butyrate		
4,89	2 Ac. Buténoïque éthyl ester		
5,1	Ac. Butanoïque-2-méthyl éthyl ester		
5,11	Ac. Butanoïque-3-méthyl éthyl ester		
5,13	Molécule n.i		
5,3	Molécule n.i		
5,33	Molécule n.i		
5,45	Molécule n.i		
5,49	Molécule n.i		
5,86	Ethyl pentanoate		
6,09	Ac. propanoïque 2 méthyl 2 méthylpropyl ester		
6,33	2 ac. Butanoïque 3 méthyl éthyl ester		
6,62	Ethyl tiglate		
7,06	Ac. Propanoïque pentyl ester		
7,56	Ac. Hexanoïque ethyl ester		
7,68	Ac. Butanoïque 2-méthyl-2-méthylpropyl ester		
7,79	Ac. Propanoïque-2-méthyl-2-méthylbutyl ester		
7,97	Molécule n.i		
8,31	2 ac. Hexénoïque ethyl ester		
8,63	2,2,5-triméthylhexane		

Les molécules surlignées en jaunes sont celles qui ont également été identifiées lors de mon travail de fin d'études sur les moisissures en culture sur milieu solide.

○ Super Q/CPG

Les prélèvements de volatils de moisissures sont analysés par CPG afin de mettre au point les conditions de prélèvement et les conditions d'analyse chromatographique avant identification. Pour *G. candidum*, 2 pics majoritaires sont mis en évidence lorsque le filtrat est analysé tel quel et lorsqu'il est en mélange avec du terreau (même temps de rétention). Les analyses sont en cours.

3. Formation doctorale

- Encadrement d'un stage/TFE de Wladimir Fanali sur l'évaluation de la qualité du lombricompostage et la valorisation du lombricompost. 2 mois d'encadrement de ces manipulations. Environ 70h de correction du TFE écrit pour l'instant. **5 crédits**
- Présentation orale et écrite de mon travail de fin d'études lors de ma participation au Prix AIGx. Le 14 février à 20h jusqu'à 20h30. Il faut également compter 2 jours de préparation. **1 crédit**
- Cours de méthodologie documentaire avec M. Pochet. 4 séances de 2h. **1 crédit**
- Représentation de la fonction de bioingénieur-entomologiste au Forum aux professions à Namur. Le 22 mars de 12h à 17h. **1 crédit**
- Chaire Francqui au titre belge 2007-2008. Professeur Willy Verstraete. **2 crédits**
 - Leçon inaugurale: "Gestion des ressources microbiennes: vers une nouvelle biotechnologie environnementale". Le jeudi 6 mars à 16h jusqu'à 18h.
 - Leçon 1 sur la bioénergie.
 - Le 13 mars de 10h à 12h: Anaerobic digestion in the biorefinery market economy
 - Le 13 mars de 14h à 16h: Microbial fuels cells in the context of bio-energy production
 - Leçon 2 sur les microorganismes et la santé.
 - Le 20 mars de 10h à 12h: Water in short cycles
 - Le 20 mars de 14h à 16h: Gastro-intestinal microbial ecology
- Conférence de Damien Charabidze: "Forenseek: une modélisation du comportement des larves de diptères nécrophages et de leur environnement dans le cadre de l'entomologie médico-légale". Le 18 février à 11h à l'ULB jusqu'à 17h. **1 crédit**
- Conférence de Michel Cusson: "Particularités génomiques et morphologiques du polydnavirus de la guêpe *Gupta fumiferanae*: un nouveau taxon viral". Le 24 avril de 16h à 17h30. **1 crédit**
- Reviewer de l'article "Détermination des sites de production et d'accumulation des substances rhizogènes chez *Lumbricus terrestris*", pour la revue BASE. Le 25 avril. **2 crédits**