

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 mai 2009

2.1. Interaction vers de terre – moisissures du sol

Pour rappel, *Eisenia fetida* est attiré par le jus de culture de *G. candidum*. Afin de comprendre cette attraction, les molécules volatiles du jus de culture de cette moisissure du sol ont été étudiées. Les molécules identifiées sont ensuite testées dans l'olfactomètre à 4 voies afin de déterminer si elles sont impliquées dans l'attraction des vers de terre. Pour ce faire, 1ml de chaque molécule est placé sur 50g de terreau DCM dans un des bras de l'olfactomètre. Les 3 autres bras sont les témoins et ne contiennent que du terreau. L'olfactomètre est ensuite entièrement rempli de terreau et 20 vers sont déposés dans la partie centrale de ce dispositif. Le nombre de vers dans chaque bras est déterminé après 24h.

Parmi les 16 molécules identifiées, 8 molécules ont été testées (10 répétitions) vis-à-vis des vers de terre (Tableau 1).

Tableau 1: Etude du comportement des vers de terre vis-à-vis de 8 molécules identifiées en GC/MS

Molécules testée	Attraction
2-méthylbutan-1-ol	x
3-méthylbutan-1-ol	x
2-méthylpropan-1-ol	x
3-octanone	x
Acétate d'éthyle	x
Propionate d'éthyle	x
Pentanoate d'éthyle	◆
Hexanoate d'éthyle	◆

x = absence d'attraction

◆ = attraction

L'analyse des résultats montre que deux molécules (le pentanoate d'éthyle et l'hexanoate d'éthyle) produites par la moisissure *G. candidum* sont attractives pour le ver de terre *E. fetida*.

Afin de s'assurer que la perception des molécules est d'ordre olfactif et non pas cutané, une grille métallique a été placée à mi distance dans chaque bras et l'expérience est répétée avec le pentanoate d'éthyle et l'hexanoate d'éthyle en déposant les molécules sur un papier filtre.

L'analyse des résultats montre qu'*E. fetida* est toujours attiré par ces 2 molécules et qu'ils perçoivent donc bien les molécules volatiles.

2.2. Application industrielle

Une des applications industrielles proposée dans la réalisation de cette thèse de doctorat est la mise au point d'un système d'extraction d' *E. fetida* dans le cadre du lombricompostage. Après avoir montré que les vers de terre sont attirés sur une distance de 1m par le jus de culture de *G. candidum* et ce quelle que soit la densité des vers (de 5 à 160 vers), des essais d'extraction de vers de terre sont réalisés en laboratoire. Cinq cm de terreau ainsi que 200 vers de terre (100 matures – 100 immatures) sont placés dans un bac en PVC (56 x 36 x 8 cm). Un 2^e bac en PVC (37 x 26 x 9 cm) comprenant 5 fentes de 30 cm de long et 0,5cm de large dans le fond est déposé à la surface du 1^{er} bac. Dans le bac du haut, 275ml de jus de culture de *G. candidum* sont versés. Après 120h, le nombre de vers de terre récupérés est compté dans le bac supérieur. L'analyse des résultats montrent que significativement plus de vers sont récupérés lorsque le jus de culture est présent (Figure 3). En effet, 89,5% des vers sont en moyenne récupérés en présence de jus de culture alors que seulement 43% le sont en absence du jus de la moisissure. Ces résultats sont particulièrement intéressants pour la mise en place du système d'extraction des vers de terre hors du lombricompost.

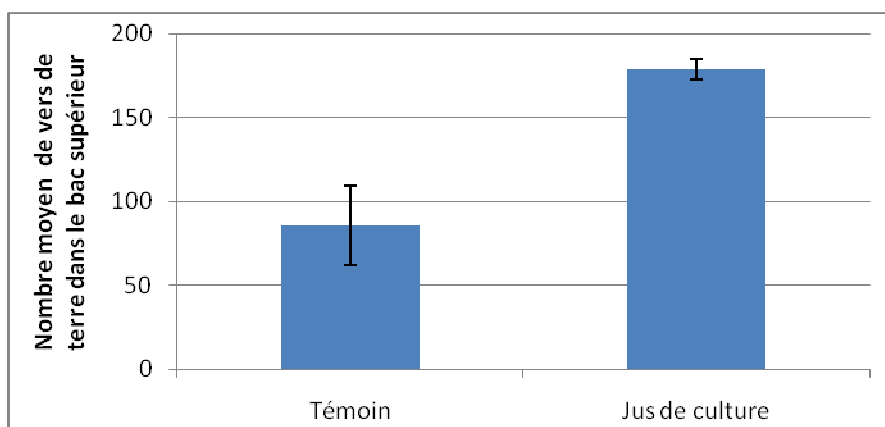


Figure 3: Nombre de vers de terre récupérés dans le bac supérieur

Suite à ces expériences, une augmentation de poids est observée. Une expérience pour étudier l'influence du jus de culture sur la croissance des vers de terre est mise en place. Six caisses sont remplies avec 1335 g de terreau et 10 vers sont placés dans chacune des boîtes. Les vers de terre utilisés lors de cette expérience ont au départ un poids moyen de 0,163g. Dans 3 des 6 caisses 275ml de jus de culture de *G. candidum* sont ajoutés, les 3 autres boîtes constituent les

témoins. Après 8 semaines, le poids des vers pour chaque traitement est mesuré et comparé. L'analyse des résultats montre que le poids des vers est significativement plus important lorsque du jus de culture est ajouté au terreau (Figure 4). Dans les 2 cas, une augmentation du poids est observée mais le gain de poids est un peu plus que doublé en présence de jus de culture.

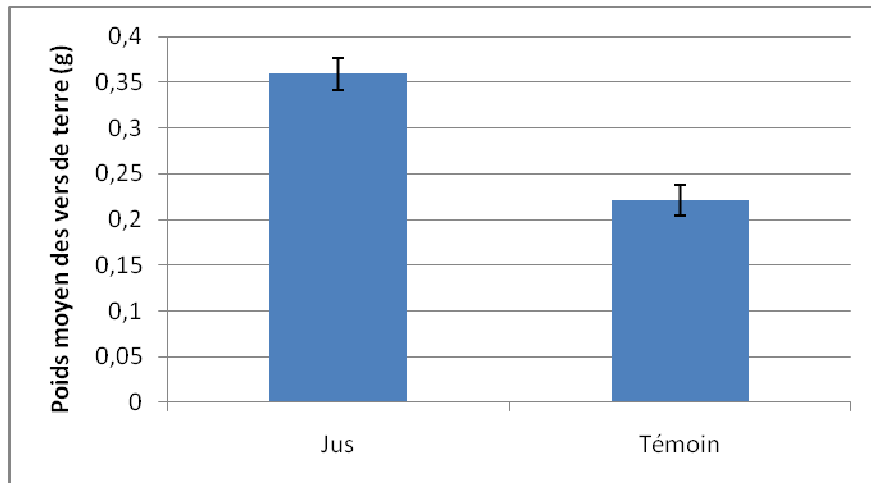


Figure 4: Résultat de la croissance d'*E. fetida* en présence et en absence de jus de culture dans le terreau

Ces résultats montrent que le jus de culture est à la fois utile dans l'extraction des vers de terre mais peut également être un stimulant de la croissance des vers de terre.

Les résultats obtenus sur la découverte de molécules émises par une moisissure attirant les vers de terre et sur la mise en place d'un système d'extraction sur base de ces résultats seront valorisés par une publication dans *Plos Biology*

2.3. Agrégation des vers de terre

Comme mentionné dans mes rapports précédents, le comportement agrégatif des vers est devenu mon deuxième axe de recherche sur *Eisenia fetida*. Dans cette optique, plusieurs expériences ont été réalisées afin de déterminer si les vers de terre *E. fetida* avaient bien un comportement grégaire et quels mécanismes (piste ou contact) pouvaient être à l'origine de ce comportement. Pour répondre à ces deux questions, des expériences ont été menées dans deux olfactomètres à deux voies.

Les résultats ont fait l'objet d'une publication "A new case of consensus decision: collective movement in soil" Lara Zirbes, Jean-Louis Deneubourg, Yves Brostaux, Eric Haubruge (2010) dans *Ethology*.

Dans les bacs d'élevage des vers de terre sont regroupés et en contact (Figure 5a) et en dehors de leur milieu naturel, les vers de terre peuvent former des boules (Figure 5b).

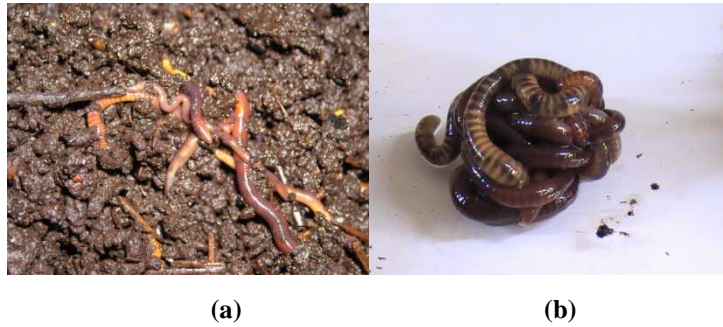


Figure 5: Formation d'agrégat de vers de terre dans le milieu d'élevage (a) et en dehors du sol (b)

E. fetida est donc capable de former un agrégat compact de vers de terre lorsque ceux-ci sont exposés à l'air. Deux paramètres pourraient être à l'origine de cette agrégation: l'humidité et la nature du milieu. Tout d'abord, 15 vers de terre sont placés aléatoirement et sans contact entre eux dans une boîte de Pétri de 19cm de diamètre dans un dessiccateur et soumis à différentes humidités relatives (55%, 85%, et 100%). Après une heure, le nombre d'agrégats, le nombre de vers par agrégat, la position des agrégats et la distance entre agrégats sont déterminés afin de mettre en évidence l'impact de l'humidité relative sur le comportement agrégatif de *E. fetida*. Les résultats montrent que l'humidité influence le comportement agrégatif des vers de terre mais n'en est pas la cause car dans une atmosphère saturée, les vers de terre continuent à former des agrégats (Analyse plus approfondie des résultats en cours).

Ensuite, 15 vers de terre sont placés aléatoirement et sans contact entre eux dans une boîte de Pétri de 19cm de diamètre avec différents milieux (air, billes de verres de 3mm de diamètre, billes de 7mm). Après une heure, le nombre d'agrégats, le nombre de vers par agrégat, la position des agrégats et la distance entre agrégats sont déterminés afin de mettre en évidence l'impact de la nature du milieu sur le comportement agrégatif de *E. fetida* (Expériences en cours).

Le mécanisme de formation d'une boule de vers de terre est étudié. Pour ce faire, différentes densités de vers de terre (1, 2, 5 et 10 vers) sont placés au centre d'une boîte de Pétri de 19cm de diamètre. Par l'intermédiaire d'une caméra, le nombre de vers de terre qui quittent le centre de la boîte ainsi que le temps mis pour le faire sont déterminés sur une période de 1h30. L'analyse des résultats montre que le temps pour que le 1^{er} ver quitte le centre de la boîte de Pétri est significativement différent en fonction de la densité de départ (One way ANOVA, $p < 0,001$). En effet en moyenne, un ver tout seul quitte le centre de la boîte après une durée de 6,39 min, pour un groupe de 2 vers, le 1^{er} quitte le centre après 18, 92 min. Pour un groupe de

5 vers, le 1^{er} ver quitte le centre après 61, 82 min alors que cette durée est de 76,07 min pour un nombre de 10 vers de terre au départ. Cette expérience montre que la rétention physique entre individus joue un rôle important dans la formation d'un agrégat statique de vers de terre. Cette expérience met aussi en évidence que lorsque qu'un ver quitte un groupe il favorise le départ des autres vers de terre du groupe. Cependant, ce phénomène est fortement minimisé pour des groupes de 10 vers où le départ du premier n'influence que très rarement le départ des autres vers. En effet, sur 30 répétitions, seules 3 montrent le départ d'un 2^e ver et 3^e ver.

Une 2^e expérience montre que si des vers sont déposés au centre d'une boîte de Pétri (10 et 15 vers), un ver seul placé à mi distance entre le centre et le bord de la boîte de Pétri rencontre significativement plus souvent le centre de la boîte de Pétri en comparaison avec l'absence de vers de terre au centre de la boîte (Chi square test, $\chi^2_2 = 17,03$, $p < 0.001$). Cette expérience met en évidence que l'attraction joue aussi un rôle dans la formation d'un agrégat de vers. Un modèle mathématique va être réalisé par M. Deneubourg (ULB) afin de montrer que la rétention et l'attraction sont deux conditions qui entraînent la formation d'une boule de vers de terre.

3. Formation doctorale

Voir en annexe le récapitulatif B.