

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

Lara Zirbes

Type de thèse : essai

## 1. Déroulement du doctorat depuis mai 2010

### 1.1. Interaction vers de terre – moisissures du sol

Pour rappel, *Eisenia fetida* est attiré par le jus de culture de *G. candidum*. Le pentanoate d'éthyle et l'hexanoate d'éthyle, deux esters produits par *G. candidum*, ont été identifiés comme molécules 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 des olfactomètres à 4 voies. Le pentanoate d'éthyle et l'hexanoate d'éthyle sont déposés sur un papier filtre à l'extrémité d'un des bras. 20 vers sont déposés au centre et le nombre de vers est compté dans chaque bras après 24h. L'analyse des résultats montre qu'*E. fetida* est toujours attiré par ces 2 molécules et qu'ils perçoivent donc bien les molécules volatiles.

Ensuite, différentes quantités de ces 2 esters ont été testées dans les olfactomètres en présence des vers afin de déterminer leur seuil de détection des molécules. Le tableau 1 reprend les résultats obtenus.

**Tableau 1: Résultats de l'attraction des vers de terre pour différentes quantités d'esters. - absence d'attraction, ◇ attraction**

Molécules	Quantité	Attraction	p-valeur
	1µl	◇	0.032
Pentanoate d'éthyle	10µl	◇	0.006
	100µl	◇	< 0.001
	1000µl	◇	< 0.001
	1µl	◇	0.030
Hexanoate d'éthyle	10µl	-	0.67
	100µl	◇	< 0.001
	1000µl	◇	< 0.001

### 1.2. 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<sup>e</sup> 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<sup>er</sup> 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 2). 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.

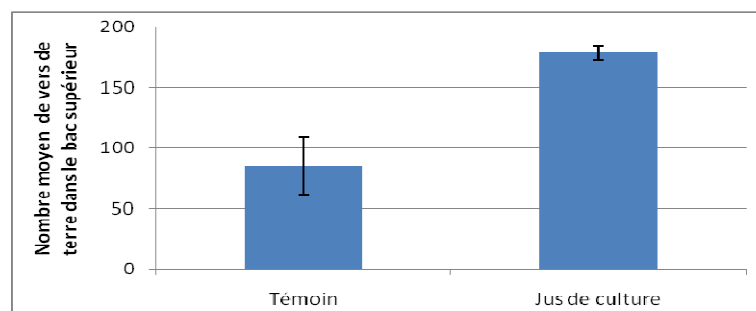


Figure 2: Nombre de vers de terre récupérés dans le bac supérieur

Un article intitulé “**Earthworms use odor cues to locate and feed on microorganisms in soil**” par Lara Zirbes, Mark Mescher, Véronique Vrancken, Jean-Paul Wathelet, François J. Verheggen, Philippe Thonart, Eric Haubruge regroupant l'ensemble de ces résultats a été soumis dans le journal Plos One en mars 2011.

### 1.3. 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*.

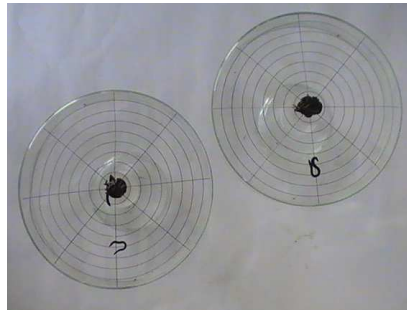
Dans les bacs d'élevage des vers de terre sont regroupés et en contact (Figure 3a) et en dehors de leur milieu naturel, les vers de terre peuvent former des boules (Figure 3b).



**Figure 3: Formation d'agrégat de vers de terre dans le milieu d'élevage (a) et en dehors du sol (b)**

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<sup>er</sup> 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<sup>er</sup> quitte le centre après 18, 92 min. Pour un groupe de 5 vers, le 1<sup>er</sup> 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<sup>e</sup> ver et 3<sup>e</sup> ver.

Une 2<sup>e</sup> expérience est réalisée: différentes densités des vers sont déposées au centre d'une boîte de Pétri (0, 10 et 15 vers) et un ver seul placé à mi-distance entre le centre et le bord de la boîte de Pétri. Le ver isolé rencontre significativement plus souvent le centre de la boîte de Pétri lorsque 15 vers sont présents (Chi square test,  $\chi^2_2 = 17,03$ ,  $p < 0.001$ ) (Figure 4).



**Figure 4 : 15 vers au centre d'une boîte de Pétri et un ver à mi-distance entre le groupe et le bord**

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 suffisantes pour entraîner la formation d'une boule de vers de terre.

Un article intitulé “**Cluster formation in *Eisenia fetida* (Oligochaeta, Lumbricidae)**” par Lara Zirbes, Yves Brostaux, Maxime Jason, Jean-Louis Deneubourg et Eric Haubruge regroupant l'ensemble de ces résultats est en cours de rédaction.

#### *1.4. Suivi des bactéries dans le tube digestif d'*E. fetida**

L'étude de la diversité des microorganismes dans le tube digestif des vers de terre connaît un vif intérêt à l'heure actuelle. De nombreuses études s'attardent à caractériser la flore intestinale des vers de terre (Parthasarathi et al., 2007 ; Byzov et al., 2009). De plus, une publication récente montre qu'il y a une sélection des microorganismes dans le tube digestif des vers et que cette sélection est un processus naturel (Thakuria et al., 2010). Mais où se fait cette sélection ? A l'entrée du tube digestif ? Dans la partie postérieure ? Afin de répondre à cette question, deux bactéries sont sélectionnées: *B. subtilis* et *E. coli*. *B. subtilis* est une bactérie retrouvée dans les sols où vivent *E. fetida* mais sont absents du tube digestif et des excréments du ver, alors que *E. coli* est à la fois dans le tube digestif et dans les fèces d'*E. fetida* (Parthasarathi et al., 2007). De plus, ces 2 bactéries ont été modifiées génétiquement afin de fluorescer. L'objectif est donc de déterminer où ces 2 bactéries se retrouvent dans le tube digestif du ver grâce à la fluorescence.

#### Suivi des bactéries dans le terreau

Avant d'inoculer les bactéries dans le tube digestif des vers, le maintien de la fluorescence est vérifié lorsque les bactéries sont inoculées dans du terreau. Dans cette optique, une culture des bactéries est lancée séparément dans 100ml de milieu 863 pour *B. subtilis*, et dans 100ml de

milieu MSM (mineral salt medium) pour *E. coli* jusqu'à ce que la fluorescence apparaisse (à vérifier au microscope) à 37°C.

La culture est centrifugée dans 2 falcons de 50ml pendant 10 min à 10.000rpm (à 4°C). Les surnageants sont éliminés et les culots sont resuspendus dans 9ml d'eau peptonée.

Les bactéries sont stérilement versées sur 10g de terreau préalablement tamisé à 2mm et autoclavé. Le mélange est ensuite placé à 30°C.

Après 24h et après 1 semaine, 1g du mélange terreau-bactéries est prélevé dans un falcon de 15 ml et 2 ml de TTSP sont ajoutés. Le tout est vortexé pendant 1 min avec des billes en verre stériles de 3mm. 600µl du surnageant est transféré délicatement dans 300µl de Nycodenz dans un eppendorf de sorte que 2 phases soient visibles. Le tube est alors centrifugé pendant 10 min à 7500 rpm (10.000g). 600µl de la phase supérieure sont transférés dans un falcon de 15ml, et 4,4ml de TTSP sont ajoutés. Le mélange est centrifugé pendant 10 min à 1500 rpm (5000g). 4ml sont écartés et la suspension de bactéries se trouve dans le ml restant. La fluorescence est vérifiée au microscope.

Comme le montrent les figures 5a et 5b, les bactéries sont bien présentes et fluorescentes.

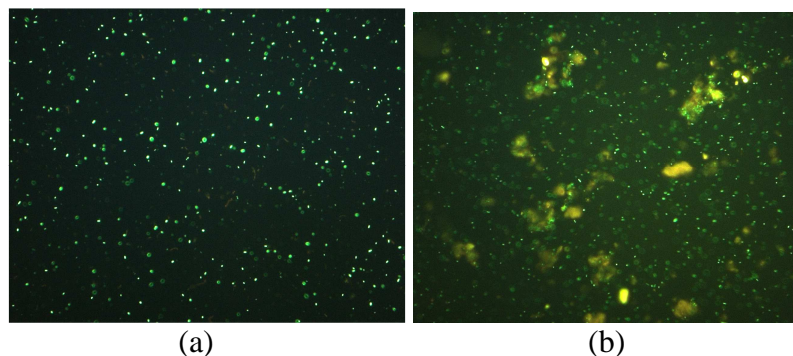


Figure 5 : Présence et fluorescence de (a) *B. subtilis* et de (b) *E. coli* après extraction du terreau

## 2. Formation doctorale complète

Formation doctorale	Crédits
<b>Formation transversale</b>	
Encadrement d'un stagiaire/mémorant Wladimir Fanali (GxABT - Septembre à décembre 2007)	5
Cours de méthodologie documentaire (GxABT - 12 et 26 février, 4, 11 et 18 mars 2008)	1
Représentation de la fonction de bioingénieur au Forum aux professions (Namur-22 janvier 2008)	1
Reviewer d'un article pour BASE (GxABT - 22-23 avril 2008)	2
Prix AIGx (GxABT - 14 février 2008)	1
Nuit des chercheurs à l'ULg (Poster et vivarium) (ULg - 26 septembre 2008)	1
Intervention dans le cours de Zoologie appliquée Zg 202 (GxABT - 25 septembre 2008)	1
Intro TP sur les Annélides + 12h de travaux pratiques (GxABT - 7, 17-19 novembre 2008)	3

Encadrement didactique de l'atelier Art et Science (GxABT - 10 décembre 2008)	1
Encadrement d'un stagiaire/mémorant Véronique Vrancken (GxABT - Février - Juin 2009)	2
Exposition "Forensic, les insectes sur le scène de crime" - Rédaction de poster + aide à la mise en place de l'exposition (GxABT - 7 au 13 mai 2009)	2
Intro TP sur les Mollusques + 12h de travaux pratiques (GxABT - 03, 09-12 novembre 2009)	3
Intro TP sur les Annélides + 12h de travaux pratiques (GxABT - 10, 16-19 novembre 2009)	3
Expo "Nourrir durablement la planète"- Poster, vivarium et présence (GxABT - 19-22 juin 2010)	1
Intro TP sur les Mollusques + 12h de travaux pratiques (GxABT - 25 octobre, 09-10 novembre 2010)	3
Intro TP sur les Annélides (GxABT - 8 novembre 2010)	1
<b>Total</b>	<b>31</b>
<b>Formation thématique</b>	
Chaire Francqui au titre belge 2007-2008, Willy Verstraete (GxABT - 6, 13 et 20 mars 2008)	2
Séminaire de Damien Charabidze (ULB - 18 février 2008)	1
Séminaire de Michel Cusson (GxABT - 24 avril 2008)	1
Séminaire sur la Spectrométrie de masse (Interscience) (LLN - 10 juin 2008)	1
Séminaire de Fiona Goggin (GxABT - 25 aout 2008)	1
Séance publique de la Classe des Sciences au Palais des Académies (Bruxelles - 13 décembre 2008)	1
Cours - Conférence du Collège de Belgique sur "l'éthique de l'ingénieur" au Palais des Académies de Bruxelles (Bxl - 26 mars 2009)	1
Chaire Francqui au titre belge 2008-2009 , Jean-Louis Deneubourg (GxABT - 11, 13 et 20 mars et 6 mai 2009)	2
Participation à un groupe de travail sur l'agrégation d'organismes pré-sociaux (ULB - 22 janvier 2009, UCL - 04 mars 2009, GxABT - 21 avril 2009, Lille - 19 juin 2009)	4
Cours - Conférence du Collège de Belgique: Les insectes, jardiniers du diable et templier de lucifers (Namur - 18 mars 2010)	1
Formation Biowin "Gestion de projet" (Liège - 25, 26 et 29 mars 2010)	3
Formation Biowin "Microbiologie et bactériologie" à l'ULg (ULg - 28 avril 2010)	1
One day Symposium on Chemical Entomology (GxABT - 5 mai 2010)	1
Workshop "Meet the expert" Patrizia d'Ettore - UCL - Ecole doctorale BEE (UCL - 20 mai 2010)	1
<b>Total</b>	<b>21</b>
<b>Production scientifique</b>	
Présentation des résultats de mon doctorat à Ouroboros (GxABT - 14 octobre 2008)	3
15e Congrès Benelux international de Zoologie - présentation orale (ULg - 30-31 octobre 2008)	5
Article (peer review) Mise en relation de la diversité des vers de terre et des caractéristiques du sol de Thua Thien Hue (Centre Vietnam) dans Tropical Conservation Science (2009)	8
Workshop de clôture d'un projet PIC au Vietnam - présentation orale (Hué, Vietnam - 8-10 avril 2009)	5
Article (peer review) Valorisation of a water hyacinth in vermicomposting using an epigeic earthworm Perionyx excavatus in Central Vietnam dans B.A.S.E (Accepté en 2010)	8

Présentation des résultats de mon doctorat à Bio-Best (GxABT - 15 septembre 2009)	3
Conférence de vulgarisation pour la Société Royale Horticole de Gembloux: L'importance des vers de terre dans le compost et le potager (GxABT - 5 décembre 2009)	3
Exposition "Art et Science" - Posters + Visite guidée + Conférence de presse (GxABT - 22 au 27 mars 2010)	3
Article (peer review) A new case of consensual decision: collective movement in earthworms dans <i>Ethology</i> (Avril 2010)	8
Article de vulgarisation "Les vers de terre: écologie et gestion des déchets" dans le <i>Canard Déchainé de Kawwberg</i>	1
Article (peer review) Interactions between earthworms and microorganisms: a real mutualism? dans <i>B.A.S.E.</i> (soumis en mars 2010)	
Participation au 9th International Symposium of Earthworm Ecology - Présentation orale (Xalapa, Mexique 5 au 10 septembre 2010)	5
Participation à la journée de la chimie verte - Poster (GxABT - 14 octobre 2010)	1
Participation au 17th Benelux Congress of Zoology - Présentation orale (Gand - 22-23 octobre 2010)	5
Article (peer review) Earthworms use odor cues to locate and feed on microorganisms in soil dans <i>Plos One</i> (soumis en mars 2011)	
<b>Total</b>	<b>58</b>
<b>Total</b>	<b>107</b>

### 3. Publications

- Zirbes, L., Collin, C., Dufey, J., Khanh Tu, P., Duyet, N., Francis, F., Lebailly, P., Haubruge, E. et Brostaux Y (2009) Mise en relation de la diversité des vers de terre et des caractéristiques du sol de Thua Thien Hue (Centre Vietnam). *Tropical Conservation Science* Vol.2 (3). 282-298. Available online: [www.tropicalconservationscience.org](http://www.tropicalconservationscience.org)
- Zirbes Lara et Haubruge Eric (2009) Les vers de terre: écologie et gestion des déchets. *Le Canard Déchainé du Kawwberg*.
- Lara Zirbes, Jean-Louis Deneubourg, Yves Brostaux and Eric Haubruge (2010) A new case of consensual decision: collective movement in earthworms. *Ethology*, 116, 546-553.
- Lara Zirbes, Quentin Renard, Joseph Dufey, Pham Khanh Tu, Hoang Nghia Duyet, Philippe Lebailly, Frédéric Francis, Eric Haubruge (2011) Valorisation of a water hyacinth in vermicomposting using an epigeic earthworm *Perionyx excavatus* in Central Vietnam. *Biotechnologie Agronomie Société et Environment*, 15, 85-93.
- Lara Zirbes, Philippe Thonart, and Eric Haubruge (2011) Interactions between earthworms and microorganisms: a real mutualism? *Biotechnologie Agronomie Société et Environment* (en soumission)

- Lara Zirbes, Mark Mescher, Véronique Vrancken, Jean-Paul Wathelet, François J. Verheggen, Philippe Thonart, and Eric Haubruge (2011) Earthworms use odor cues to locate and feed on microorganisms in soil. *Plos One* (en soumission)