

**INSTITUT FRANCAIS DE RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
POUR LE DEVELOPPEMENT EN COOPERATION**

**ORSTOM**

**Laboratoire de nématologie**

**B.P. 1386**

**Dakar**

**Sénégal**

**RAPPORT DE LA CONVENTION DE RECHERCHES PROPOSEE  
DANS LE CADRE DE L'APPEL D'OFFRE "PRODUCTIONS ALIMENTAIRES  
TROPICALES" DU MINISTERE DE LA RECHERCHE ET DE L'ENSEIGNEMENT  
SUPERIEUR ET DU MINISTERE DE LA COOPERATION**

**Etudes préliminaires des relations entre  
les nématodes bactériophages, la flore bactérienne  
et les cultures pluviales dans la zone sahélienne du Sénégal.**

**Pierre BAUJARD**

Dakar, septembre 1991

ORSTOM Fonds Documentaire

N° :

38.224 ex 1

Cote :

B

15 OCT. 1993

# SOMMAIRE

I - AVANT PROPOS

II - RAPPORT TECHNIQUE

III - RAPPORT FINANCIER

## I - AVANT PROPOS

La mise en oeuvre des recherches prévues dans ce projet est intervenue dans des circonstances particulières.

L'équipe de recherches du laboratoire comprenait trois chercheurs et un technicien de laboratoire travaillant sur deux programmes : le premier, intitulé "Les nématodes de la zone sahéenne ouest africaine" essentiellement axé sur les nématodes phytoparasites, comporte des études relatives à la systématique, la biologie, l'écologie et les techniques de lutte pour la protection des cultures pluviales sahéennes ; le second, intitulé "Morphologie et ultrastructure des nématodes phytoparasites", concerne principalement l'utilisation de la microscopie électronique à balayage et à transmission pour la mise en évidence de nouveaux critères d'identification et de classification des espèces dans le sous ordre des Tylenchina.

A la demande d'un chercheur sénégalais du Département de Biologie Végétale de la Faculté des Sciences de Dakar, un programme de recherches sur les interactions nématodes-bactéries-cultures sahéennes a été élaboré et soumis à financement auprès du Ministère de la Recherche et de la Technologie.

Au moment de la mise en place des crédits prévus dans ce projet, le chercheur sénégalais, qui devait gérer le volet microbiologie de ce projet, ne s'est plus jamais présenté au laboratoire et deux des trois chercheurs en poste ont quitté définitivement l'équipe de recherches. Tout le travail a donc échoué au chercheur restant et un VSN (élève ingénieur agronome, ni nématologiste, ni bactériologiste) a été recruté in extremis pro parte dans le cadre de ce projet.

Les résultats présentés ici sont donc naturellement très en deçà de ce qui avait été prévu dans le projet initial.

Nous avons tenté cependant de développer les recherches prévues et nous sommes entrés en relation avec le laboratoire du Professeur A. Coomans (Gand, Belgique) qui travaille, pro parte, sur la systématique des Cephalobina, sous ordre auquel appartient la plupart des espèces de nématodes bactériophages identifiés dans les sols sahéens. Cette collaboration, en cours de formalisation, a débuté par l'identification par l'équipe belge des taxons en élevage au laboratoire. Actuellement, des recherches sur l'ultrastructure du stoma de ces espèces est en cours au Département de Biologie Animale de la Faculté des Sciences de Dakar.

## II - RAPPORT TECHNIQUE

### Introduction

Les nématodes libres du sol sont très variés tant au point de vue de leur morphologie que de leur mode vie. Certains sont bactériophages, d'autres sont prédateurs. Ce sont les nématodes bactériophages qui nous intéressent ici en raison de la microflore qu'ils transportent dans le tube digestif ou sur la cuticule.

Il nous a semblé intéressant d'étudier les interactions entre les plantes cultivées dans la zone sahé-lienne sénégalaise, la microflore tellurique et les nématodes libres du sol, principalement en raison de l'importance des symbioses pour l'alimentation hydrique et la nutrition phosphatée (mycorhizes), et pour la fixation de l'azote (*Rhizobium*, *Frankia*). Quelques nématodes non phytoparasites ont parfois été rencontrés à l'intérieur des racines de certaines plantes. L'espèce la plus répandue dans les sols de la zone sahé-lienne sénégalaise (codée C1) a été utilisée pour des études préliminaires en vases de végétation visant à déterminer l'influence de la présence des nématodes et/ou de la microflore associée sur le développement de la plante. Nous avons aussi isolé quelques autres espèces que nous avons mis en élevage sur des milieux gélosés permettant un développement de la microflore associée, assurant l'alimentation des nématodes.

### Origine des nématodes

L'ensemble des espèces avec lesquelles nous avons travaillé provient d'un sol en jachère de la localité de Nebe, à cinq kilomètres au sud de la ville de Diourbel, sur la route Diourbel-Gossas, au centre du bassin arachidier du Sénégal.

Les prélèvements de sol ont été effectués sur une profondeur de cinquante centimètres en saison sèche et en saison des pluies.

### Les études en vases de végétation

#### \* Influence des rhabditides sur la croissance du mil et de l'arachide

L'étude a été réalisée en pots contenant de la terre stérilisée par autoclavage dans lesquels étaient introduits soit les nématodes (espèce C1) avec la microflore associée, soit la microflore associée seule obtenue par lavage (5 à 10 secondes) des nématodes sur papier filtre. Les deux inoculums ont été réalisés de manière à ce que leur turbidité soit la même par comparaison à l'oeil nu. L'étude de la croissance des plantes dans ces pots est comparée à celle obtenue en pots non inoculés. Chaque traitement a été répété sept fois.

Certains pots ont dû être éliminés de l'analyse statistique soit parce que les plantes sont mortes en cours de culture, soit parce que des nématodes ont été trouvés dans le sol alors que les pots n'avaient pas été inoculés.

Les poids frais et secs de feuilles et de racines ne présentent aucune différence significative au seuil de 5% par le test de Duncan, aussi bien dans le cas du mil (figure 1) que dans le cas de l'arachide (figure 2). L'analyse statistique des résultats des traitements "C1 xéniques", "microflore de C1" et "Témoin" a été effectuée sur trois, quatre et cinq répétitions respectivement dans le cas du mil, et sept, trois et six répétitions respectivement dans le cas de l'arachide.

Pendant, les différences observées sont suffisamment importantes pour nous permettre de pousser plus loin les investigations afin de tenter de mettre en évidence un éventuel effet des nématodes et de leur microflore dans la croissance des plantes.

\* Influence des rhabditides sur la croissance et la nodulation de l'arachide

Comme pour l'expérience précédente, nous avons utilisé des pots remplis de terre stérilisée par autoclavage. Les différents traitements appliqués aux plants d'arachide sont les suivants :

- \*\* nématodes C1 accompagnés de la microflore
- \*\* microflore de C1 recueillie par filtration
- \*\* nématodes C1 désinfectés par une solution de mercurothiolate à 0,1% puis rincés quatre fois avec de l'eau stérile
- \*\* nématodes C1 désinfectés + une suspension de Rhizobium
- \*\* suspension de Rhizobium
- \*\* témoin

Chaque traitement est répété dix fois, ce qui fait un total de 60 pots.

Après 72 jours de culture, les poids frais de feuilles et de racines ainsi que le poids sec de feuilles sont mesurés. La capacité fixatrice d'azote de chaque plante est estimée par la mesure de l'activité réductrice de l'acétylène en éthylène (A.R.A.) de chaque système racinaire, après 30 et 60 minutes.

Les résultats des pesées des plantes sont présentés en figure 3. Les traitements apparaissent comme étant favorables à la croissance de l'arachide par rapport au témoin. Pour la partie aérienne, le test de Duncan au seuil de 5% met en évidence deux groupes homogènes : les traitements sans microflore (témoin et C1 désinfectés), et les traitements avec microflore, qui favorisent significativement la croissance de l'arachide. Dans le cas de la partie souterraine, les différences sont plus difficilement interprétables. Il est évident que des études sur les rendements (nombres de gousses ou de graines par plante) seraient plus exactes. Mais la taille des pots utilisés est trop réduite pour permettre un développement correct des gousses.

Les résultats des tests A.R.A sont présentés en figure 4. L'analyse statistique a porté sur les pentes des droites obtenues entre 0 et 30 minutes puis entre 30 et 60 minutes, puisque ces pentes représentent la vitesse de réaction de la nitrogénase. Que ce soit entre 0 et 30 minutes ou entre 30 et 60 minutes, les différents traitements ne présentent aucune différence significative par le test de Duncan au seuil de risque de 5%. Il est toutefois intéressant de constater que les racines des plantes inoculées avec le Rhizobium ont une vitesse de fixation constante au cours des soixante minutes de mesures. Cette vitesse est la plus faible lors de la mesure après 30 minutes, alors qu'elle devient la plus forte après 60 minutes, toutes les autres ayant diminué, parfois fortement. Cette observation laisse supposer que les nodules des plantes inoculées avec le Rhizobium continuent à fixer l'azote alors que les nodules des autres plantes ne fixent plus ou très peu. Ce phénomène peut être expliqué par une différence d'espèce de Rhizobium, ou/et par une différence de quantité de symbiotes présents dans les racines.

#### Etudes en boîtes de Petri

\* Elevages sur milieux gélosés

Neuf espèces ont pu être mises en élevage permanent sur milieux gélosés en boîtes de Petri. Ces espèces ont été codées comme suit : C1, C3, C6, C8, C9, C10, C11, C14, C15.

\*\* Milieu de Nigon (Nigon, 1949) : seule l'espèce C14 ne s'y multiplie pas.

\*\* Milieu à l'extrait de sol sur lequel toutes les espèces s'y multiplient bien. (technique de préparation de la gélose à l'extrait de sol : 1- mélanger volume à volume le sol sec et l'eau ; 2 - laisser en contact pendant une dizaine de minutes tout en agitant ; 3 - laisser sédimenter pendant quelques minutes avant de filtrer le surnageant, le filtrat devant être clair et translucide ; 4 - utiliser le filtrat comme de l'eau distillée pour préparer une gélose à 1,5%.

\*\* Milieu eau-gélose 1,5% : toutes les espèces s'y multiplient, mais la microflore associée est pauvre. Ce milieu est utilisé lors de la deshydratation des nématodes parce qu'il permet l'obtention d'un film translucide permettant une bonne observation des formes anhydrobiotiques.

\*\* Milieu eau-gélose 1,5% + extrait de levure 0,5g/l : toutes les espèces s'y multiplient très bien, et le démarrage rapide de la microflore permet d'obtenir très vite une population abondante de nématodes. Il est utilisé pour les élevages de routine, pour la réhydratation, et pour les élevages monoxéniques.

\* Identification de quelques bactéries associées (Gram négatives et aérobies strictes ou facultatives)

9 espèces bactériennes ont été identifiées par les galeries API 20E et API 20NE :

- \*\* Xanthomonas maltophilia
- \*\* Pseudomonas aeruginosa
- \*\* Pseudomonas stutzeri
- \*\* Pseudomonas putida

- \*\* Comomonas acidovorans
- \*\* Alcaligenes xylooxidans xylooxidans
- \*\* Alcaligenes xylooxidans denitrificans
- \*\* Flavobacterium indologenes
- \*\* Citrobacter diversus.

Deux autre souches codées M11-1 et M14-1 n'ont pas pu être identifiées.

\* Deshydratation des nématodes en milieu gélosé

La deshydratation est faite sur des géloses pauvres : gélose à l'extrait de sol ou eau gélosée à 1,5%.

A 34°C la gélose se dessèche en environ 1 mois dans des boîtes percées d'un petit trou au centre du couvercle, et il ne reste alors dans le fond de la boîte de Petri qu'un film translucide contenant les nématodes anhydrobiotiques. Ceux-ci restent viables pendant au moins huit mois, de même que la microflore associée.

L'anhydrobiose apparait comme un passage plus ou moins obligatoire selon les espèces de nématodes pour le maintien de l'élevage. La capacité de l'espèce C9 à se reproduire s'estompe après 3 à 4 semaines en gélose fraîche. Lors de la rehydratation d'un fragment de gélose contenant des nématodes anhydrobiotiques, on observe une multiplication rapide et forte dans les deux premières semaines, puis la vitesse de multiplication diminue pour devenir quasi nulle après un mois. Ce phénomène se retrouve chez la plupart des autres espèces en élevage, mais de façon plus modérée. Dans le cas général, le taux de multiplication est le plus fort immédiatement après la rehydratation. De plus, il a été observé pour les espèces C3, C6, C8 et C10, un passage par une forme "pseudo-anhydrobiotique" durant de 2 jours à 3 semaines où les nématodes apparaissent inertes, légèrement enroulés sur eux-mêmes. L'activité normale des nématodes reprend sans stimulus apparent. Un protocole d'élevage pérenne de rhabditides en milieu gélosé est proposé en figure 5.

\* Tentative de réalisation d'élevages monoxéniques

\*\* Tentative de mise au point d'une technique simple de désinfection des rhabditides

Pour réaliser des élevages monoxéniques, il a fallu mettre au point une technique de désinfection des nématodes. Cette mise au point a pris environ quatre mois puisqu'il a fallu tester une gamme étendue de produits proposés dans la littérature (Composés à base de mercure, Hypochlorite de sodium et de calcium, peroxyde d'hydrogène,...). Il a fallu déterminer la dose et le temps de contact optimaux permettant une survie suffisante tout en assurant une bonne désinfection. Cependant, en raison de leur mode de vie, les rhabditides ne peuvent être désinfectés efficacement que par des produits puissants ne laissant pas les nématodes indemnes. De plus, les bactéries bien à l'abri dans le tube digestif peuvent ne pas être atteintes. La présence de germes sporulés complique encore les choses puisque les contaminants peuvent apparaître longtemps après le traitement, alors que l'on pensait avoir réussi à mettre en place un élevage monoxénique. La solution de mercurothiolate à 0,1% est apparue la plus efficace, assurant un bon compromis entre un temps de contact long (2h permettant aux nématodes de sédimenter dans le fond du tube à essai) et une survie acceptable des nématodes (50%)

\*\* Essais de mise en place des élevages monoxéniques

La surface d'une boîte de Petri contenant des nématodes est lavée avec une solution de mercurothiolate à 0,1%, et le tout est recueilli dans un tube à essai. Après deux heures, le surnageant est éliminé par pompage en surface, et une goutte du culot est déposée au centre d'une boîte de Petri contenant une culture pure de bactéries. Les nématodes désinfectés quittent la goutte toxique pour se nourrir aux dépens des colonies bactériennes. La diffusion dans la gélose permet une dilution suffisante de la solution antiseptique pour que les nématodes puissent se reproduire normalement après un temps de latence variant de 1 à 5 jours selon les espèces. Ce procédé a été tenté avec les espèces C1, C3, C10 et C15, mais au bout de deux ou trois repiquages, on constate que la méthode de désinfection n'est pas efficace à 100% puisque des bactéries contaminantes apparaissent. Ces contaminants peuvent provenir soit de spores résistant au mercurothiolate, soit de formes végétatives protégées dans le tube digestif des nématodes. Le problème pourrait être résolu par deux ou trois traitements successifs à deux ou trois jours d'intervalle, mais la mortalité des nématodes est trop importante (50%) au cours du traitement, et les survivants sont probablement trop affaiblis pour supporter un autre passage dans la solution de mercurothiolate. Cela n'a pas été essayé.

En milieu stérile, les nématodes survivent pendant une dizaine de jours, mais ne se multiplient pratiquement pas.

## Discussion

La partie microbiologique de ce travail aurait du être réalisée avec l'aide du laboratoire de microbiologie de la faculté des sciences de Dakar ; cela n'a pas été le cas. C'est pour cette raison principale que très peu de souches bactériennes ont été isolées et identifiées. Aucune souche d'actinomyètes ou de champignons n'a pu être isolée puisque nous n'avons, au laboratoire de nématologie, aucun milieu de culture sélectif pour y arriver.

A plusieurs reprises au début de ce travail, nous avons manqué perdre les élevages de routine puisque les nématodes ne se reproduisaient pratiquement plus. Ce n'est qu'alors que nous avons compris la nécessité d'une "pause" obligatoire dans la reproduction, au bout d'un certain nombre de générations avant la poursuite normale du cycle. Il ne s'agit pas du cycle de vie d'un nématode isolé, mais de la population toute entière au cours de plusieurs générations.

Ce travail n'a pas donné de résultats quantitatifs publiables, mais constitue un ensemble d'observations qualitatives permettant de mettre en place des expérimentations afin de préciser certains phénomènes observés ou de répondre aux questions posées :

Les nématodes libres du sol peuvent-ils être utilisés comme des vecteurs de bactéries symbiotiques (Rhizobium, Frankia) ou de champignons mycorrhiziens?

Pourquoi l'espèce C14 ne se reproduit-elle pas sur le milieu de Nigon?

Quelle est la nature exacte du déterminisme de la "pause" (diapause?) observée dans la reproduction des nématodes? Pourquoi certaines générations la subissent-elles, et d'autres non?

### III - RAPPORT FINANCIER

#### DEVIS PREVISIONNEL

##### 1- Dépenses sur justifications

deux loupes binoculaires	58 500
--------------------------	--------

##### 2- Dépenses forfaitaires

###### frais de laboratoire :

verrerie et petit matériel	20 000
produits chimiques pour milieux bactériens	23 000
frais de microscopie électronique à balayage	20 000
main d'oeuvre occasionnelle	20 000

###### missions (transport et per diem)

locales	18 000
à l'étranger	20 000

3- Divers et imprévus	20 000
-----------------------	--------

TOTAL GENERAL	199 500 FF
---------------	------------

#### DEPENSES EFFECTUEES

deux loupes binoculaires	60 579
deux balances électroniques	15 647
petit matériel et produits chimiques	23 822
frais de transit	9 533
main d'oeuvre occasionnelle	47 200
frais d'entretien matériel de laboratoire	2 400
produits divers (papeterie, disquette ordinateur, ...)	20 388
carburant	10 000
divers	4 000

TOTAL GENERAL	193 569 FF
---------------	------------



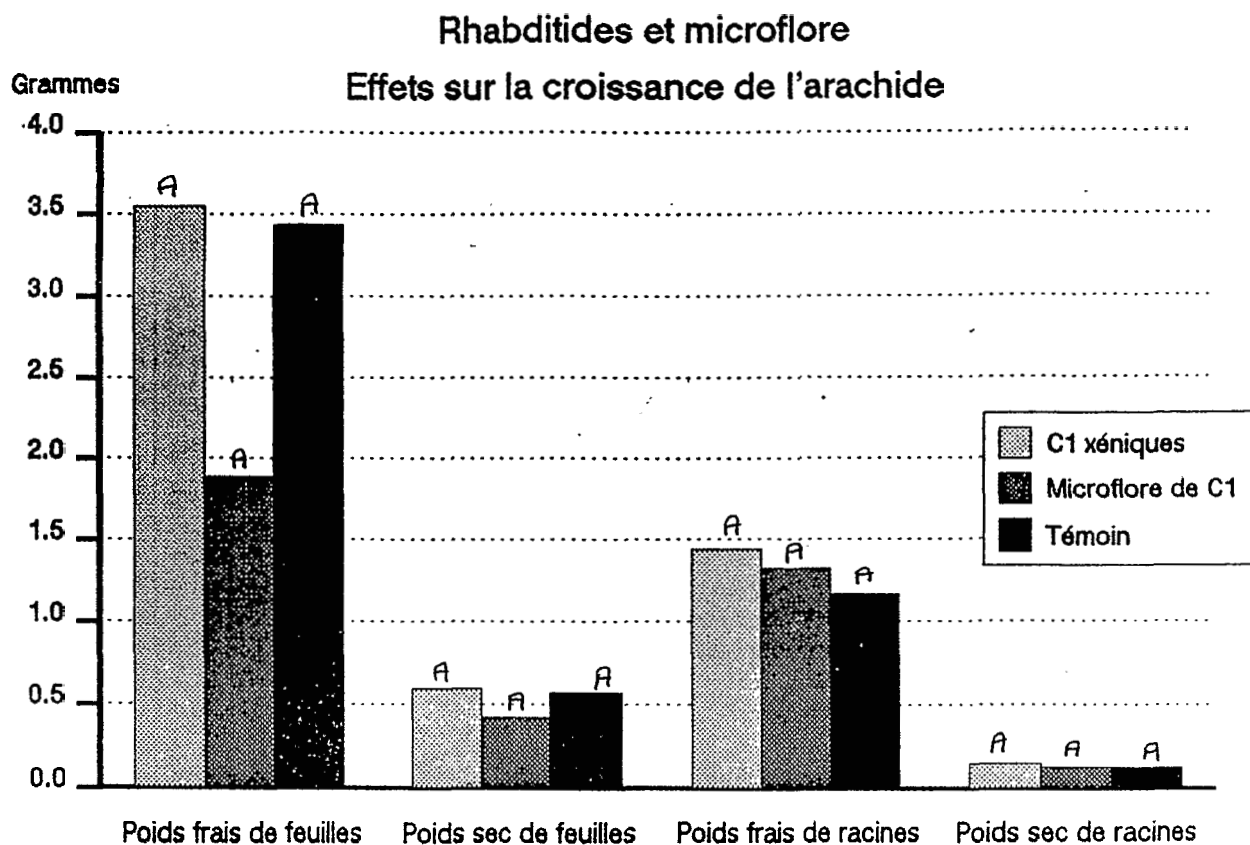


Figure 1

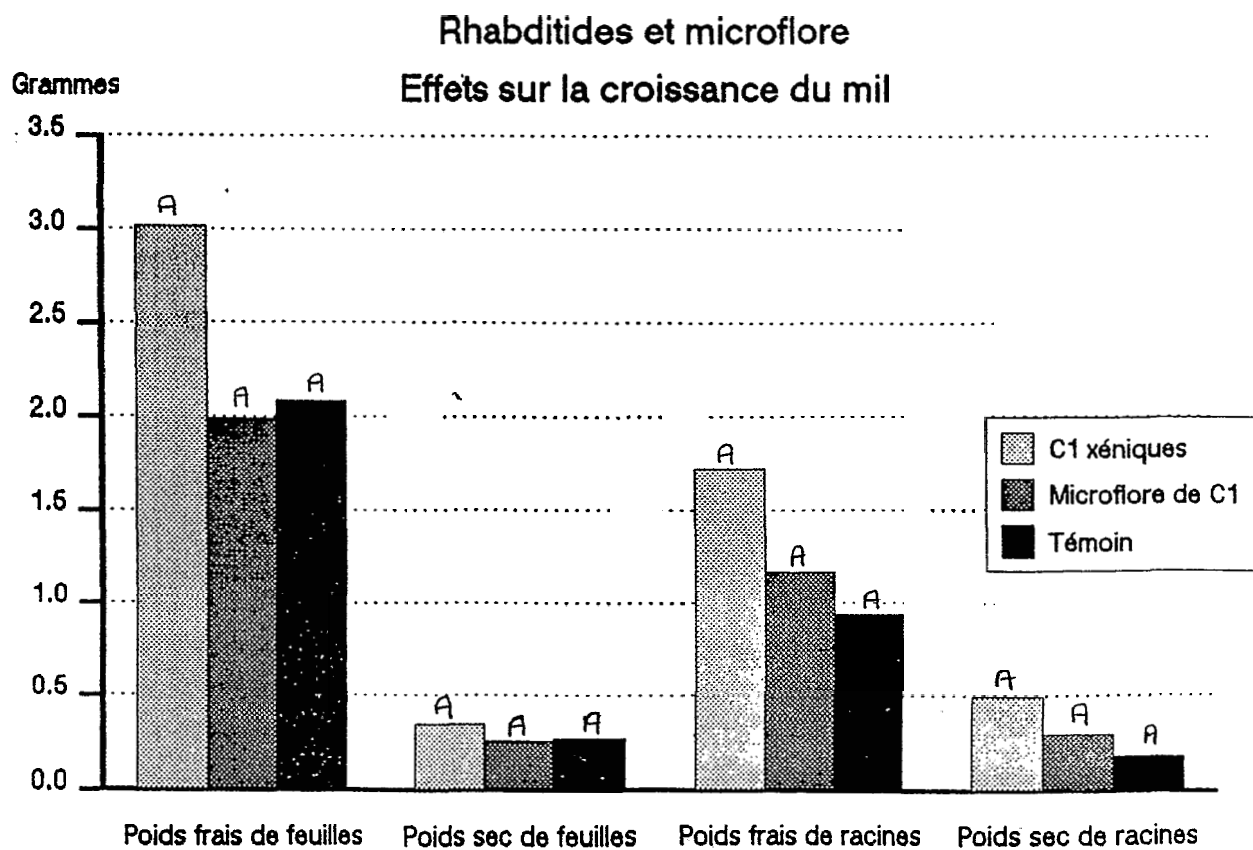


Figure 2

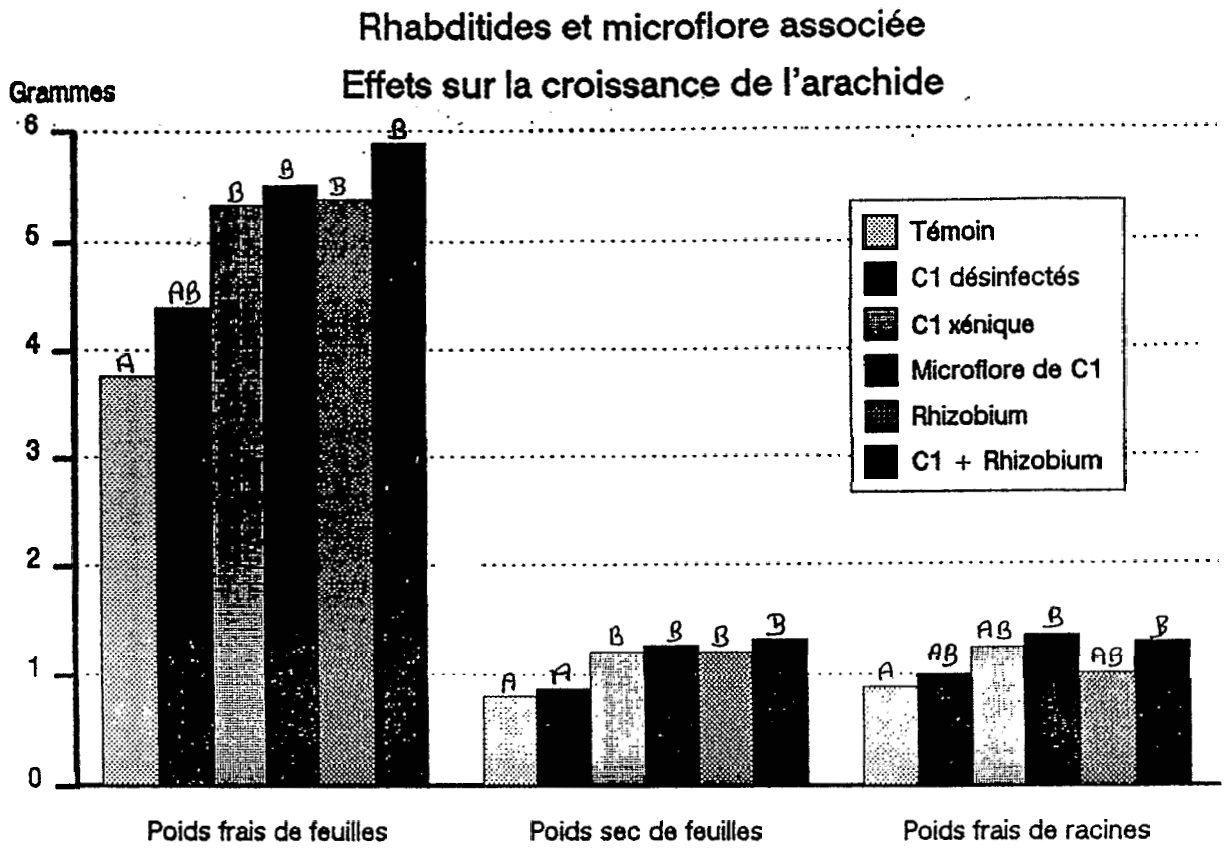


Figure 3

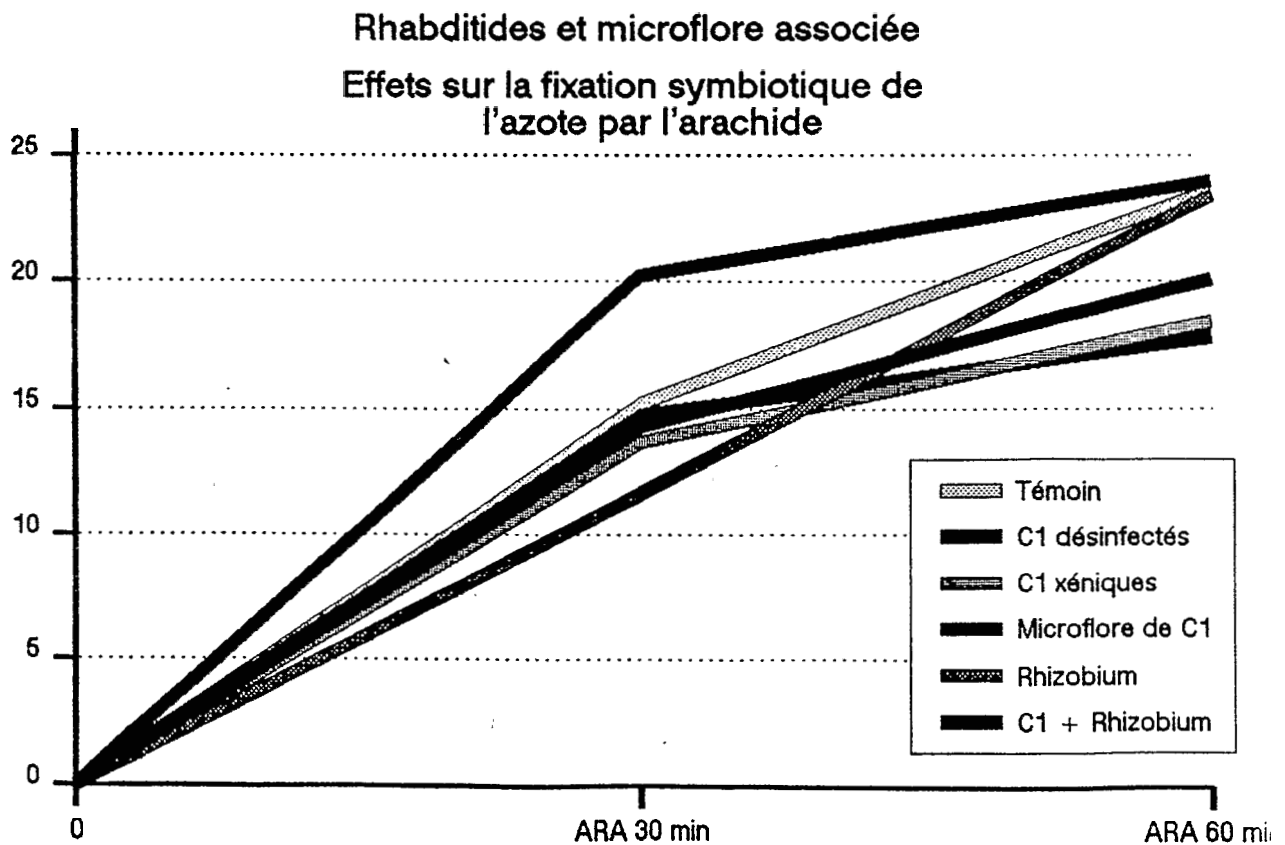


Figure 4

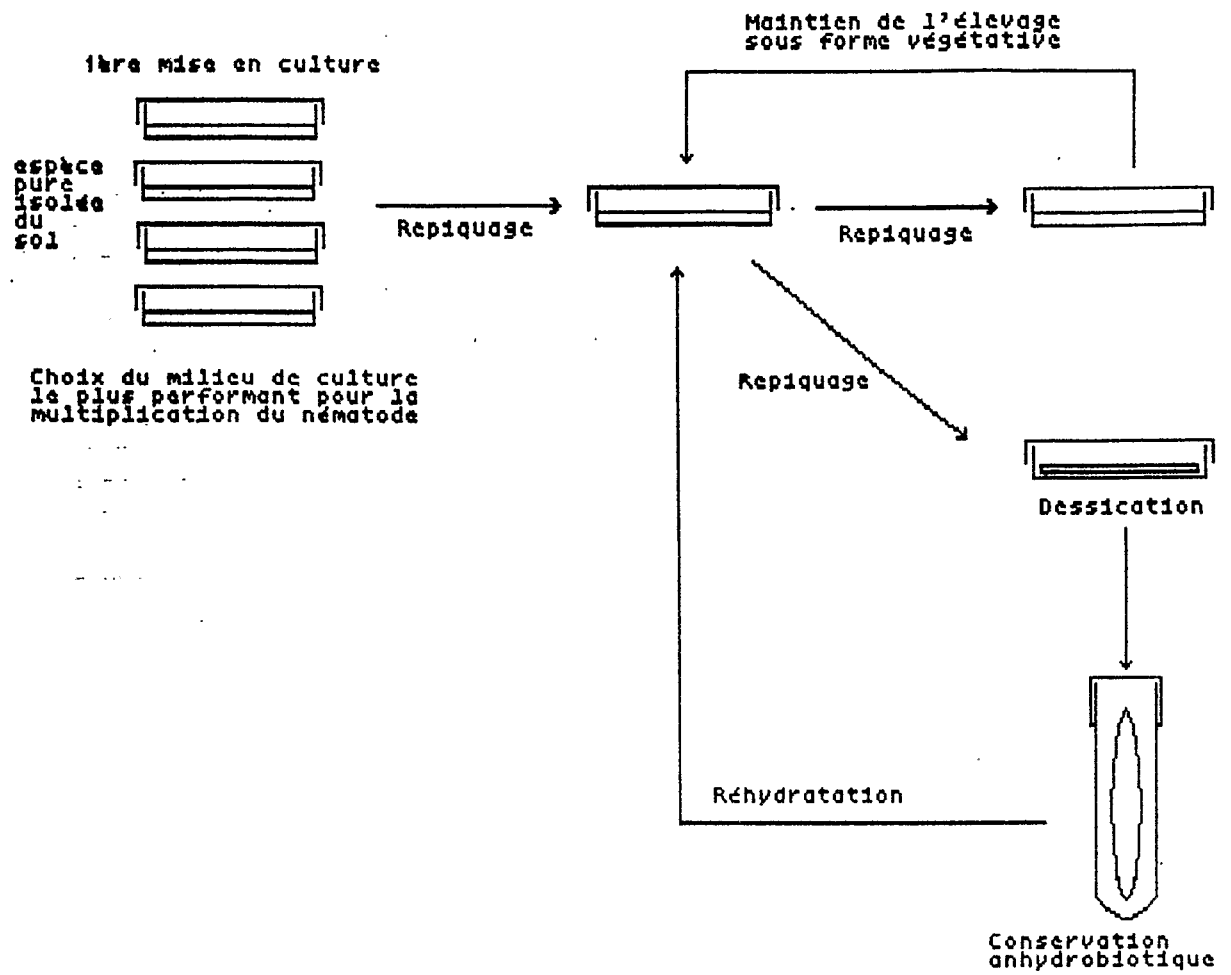


Figure 5 :  
Schéma d'élevage perenne de nématodes libres du sol sur milieu gélosé.