

Station de Nématologie et d'Entomologie de l'État
Merelbeke, Belgique

EXTRACTION DE *LONGIDORUS* ET *XIPHINEMA* SPP. DU SOL PAR CENTRIFUGATION EN UTILISANT DU SILICE COLLOIDAL (1)

par

W. A. COOLEN et C. J. D'HERDE

La méthode de centrifugation-flottation utilisée pour extraire les nématodes d'échantillons de terre est basée sur le principe général suivant:

Un mélange de terre et d'eau est centrifugé une première fois et ainsi débarrassé de son eau. La centrifugation du sédiment dans un liquide de séparation d'une densité supérieure à celle des nématodes met ceux-ci en suspension ou les fait surnager. On peut ensuite isoler les nématodes en passant le liquide à travers un tamis. Les liquides de séparation les plus employés, en l'occurrence des solutions de saccharose, de $MgSO_4$ ou de $ZnSO_4$ d'une densité de 1,15 à 1,18, conviennent pour extraire les *Tylenchidae* d'échantillons de terre (Gooris et D'Herde, 1972; Hendrickx *et al.*, 1976).

Ces solutions et densités ne permettent cependant pas l'extraction quantitative de *Longidorus* et *Xiphinema* spp., parce que ceux-ci sont si sensibles à l'activité osmotique de ces solutions, que beaucoup d'entre eux se plasmolysent pendant la phase de séparation, vont au fond et sont ainsi perdus pour l'extraction.

On peut contourner cette difficulté de deux façons:

- en augmentant la densité des solutions de séparation à un degré tel que les nématodes plasmolysés soient mis en suspension ou surnagent;
- en employant des solutions de séparation adéquates, dont l'activité

(1) Centrifugal separation of *Longidorus* and *Xiphinema* from soil, utilizing colloidal silica.

osmotique est très faible de sorte que les nématodes ne s'y plasmo-lysent pas.

Bowen *et al.* ont publié en 1972 un article sur la centrifugation à gradient de densité, appliquée pour le triage d'organismes planctoniques. Ils ont employé à cette fin une solution de silice colloïdale, dont les caractéristiques sont: un coût relativement peu élevé, une faible viscosité et l'absence à peu près totale d'activité osmotique.

Les recherches décrites ici visent à déterminer si des solutions de ce genre sont utilisables pour extraire *Longidorus* et *Xiphinema* d'échantillons de terre.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Les solutions examinées avaient été choisies dans l'assortiment Ludox⁽²⁾. Le tableau I reproduit leurs caractéristiques principales. Les solutions de silice colloïdale ou sols de silice sont des dispersions aqueuses de particules de SiO₂. Ces dispersions ont une réaction alcaline et les particules acquièrent ainsi une charge négative, de sorte qu'elles se repoussent mutuellement et qu'il en résulte une solution stable.

Le produit 130 M fait toutefois exception: il est une solution à réaction acide de particules de silice colloïdale, auxquelles est appliqué de l'oxyde d'aluminium à charge positive; les particules ont donc acquis une charge positive et, par conséquent, se repoussent aussi mutuellement. Dans la suite de ce texte toutes ces solutions sont appelées uniformément sols de silice.

Tableau I - *Caractéristiques des silices colloïdales essayés.*

Produits	pH	Charge des particules	Viscosité (cp)	Poids spécifique
AM	9	nég.	15	1,2
AS	10	nég.	15	1,2
HS 30 %	10	nég.	5	1,2
HS 40 %	10	nég.	16	1,3
LS	8	nég.	7	1,2
SM	10	nég.	6	1,2
TM	9	nég.	45	1,4
130 M	4	pos.	5-15	1,2

(2) Ludox est la marque déposée de ces produits, fournis par Du Pont.

Il ressort du tableau I que la viscosité, exprimée en centipoises (cp), était en général suffisamment faible.

Afin de donner une idée de l'activité osmotique des autres solutions de substances organiques et minérales utilisées pour ces recherches, le tableau II indique leur valeur osmotique approximative à la densité de 1,18.

Tableau II - Valeur osmotique (S) à la densité 1,18 de solutions de séparation courantes.

Solutions	S (g-mol/l)
Saccharose	1,28
MgSO ₄	1,06
ZnSO ₄	0,65

Le matériel de test utilisé pour tous les essais était constitué d'échantillons de 2 sols sablo-limoneux infestés l'un de *Longidorus caespiticola* Hooper et l'autre de *Xiphinema diversicaudatum* (Micoletzky) Thorne.

Une centrifugeuse « Christ-type Universal Junior III S » à 4 tubes de 0,5 l a été utilisée pour tous les essais. Sa force centrifuge relative est de 1950 g à une vitesse de rotation maximale de 2600 tours/minute.

Les essais ont été effectués en huit parallèles, chacun consistant en un tube centrifuger rempli de 0,5 l d'un mélange de 50 ml de terre et d'eau. Ce mélange était préparé de la manière suivante: un grand vase d'homogénéisation en forme d'entonnoir et d'une contenance de 30 l a été rempli avec un mélange de 5 litres de terre dans 25 litres d'eau. Ce mélange était homogénéisé pendant plusieurs minutes sous l'action d'air comprimé introduit par le fond du vase. Le nombre nécessaire de portions de 250 ml, contenant chacune 50 ml de terre, était prélevé de ce mélange bouillonnant. Jusqu'à 100 portions égales de terre peuvent ainsi être obtenues. Ces échantillons étaient ensuite transvasés dans les tubes centrifugeurs et allongés d'eau, jusqu'à un demi-litre.

Le processus de centrifugation se déroulait comme suit: 5 ml de kaolin étaient ajoutés dans chaque tube et mélangés intimement à son contenu au moyen d'un agitateur-vibrateur. Les tubes étaient ensuite centrifugés pendant 4 min, après lesquelles on versait l'eau

surnageante. Après mélange du sédiment avec le liquide test et homogénéisation au moyen de l'agitateur-vibrateur, on centrifugeait de nouveau pendant 4 min. Le tube était ensuite vidé sur un tamis de 5 μm et le contenu entraîné dans un godet sous l'action d'un fin jet d'eau en éventail.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les considérations concernant *l'influence de la densité des liquides de séparation osmo-actifs sur l'extraction de Longidorus et de Xiphinema* sont empruntés à des données inédites, mais communiquées au XII^{ème} Symposium International de Nématologie (Coolen et D'Herde, 1974).

Les *observations qualitatives* ont été faites sur des cellules de comptage remplies de solutions de ZnSO_4 à densités de 1,15 - 1,20 - 1,25 - 1,30 - 1,35 et 1,40. Chaque cellule recevait 12 exemplaires de *L. caespiticola*.

Les nématodes descendaient immédiatement au fond dans la solution à densité 1,15. A partir de $\delta=1,25$ ils commençaient à rester en suspension et à partir de 1,35 tous flottaient à la surface de la solution.

Ces comportements s'expliquent par le fait qu'à $\delta=1,15$ les nématodes se plasmolysent aussitôt et acquièrent une densité supérieure à 1,15. A mesure que la densité des solutions augmente, l'écart entre la densité moyenne du corps du nématode plasmolysé et celle du liquide diminue. Un équilibre est atteint aux environs de $\delta=1,25$ (suspension); à partir de $\delta=1,35$ les nématodes sont plus légers et montent à la surface.

Transvasés dans de l'eau pure, les nématodes reprennent tous leur forme normale, mais ils sont morts, noirs et difficiles à identifier selon le genre et l'espèce.

Pour les *observations quantitatives* des échantillons de 50 ml de terre ont été prélevés, de la manière déjà décrite, dans un sol infesté de *L. caespiticola* et traités par la méthode de centrifugation-flottation à des densités de 1,15 - 1,20 - 1,25 - 1,30 - 1,35 et 1,40.

Huit essais parallèles étaient effectués pour chaque densité. La figure 1 indique les nombres moyens de nématodes extraits pour chaque densité.

Il en ressort que la capture moyenne augmente jusqu'à la densité

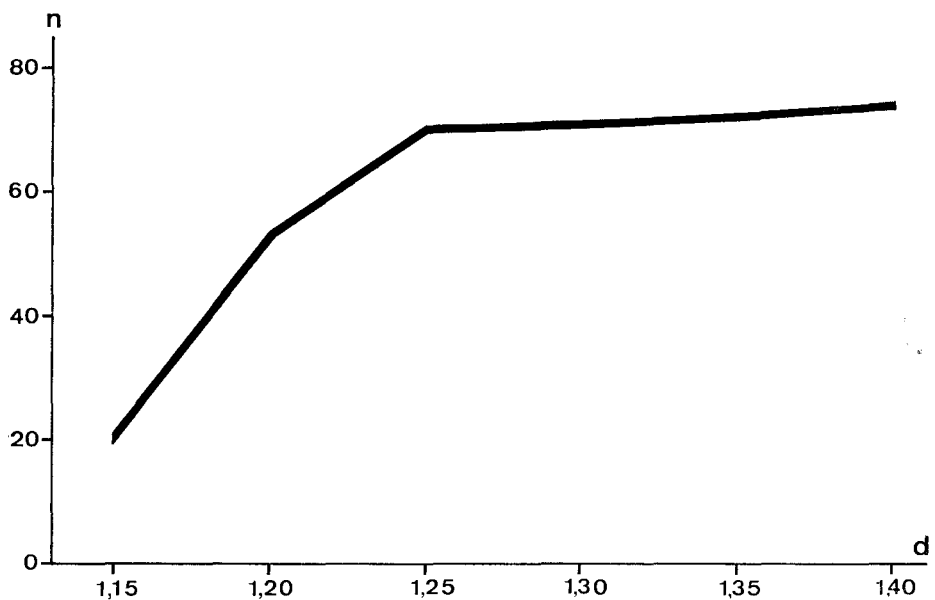
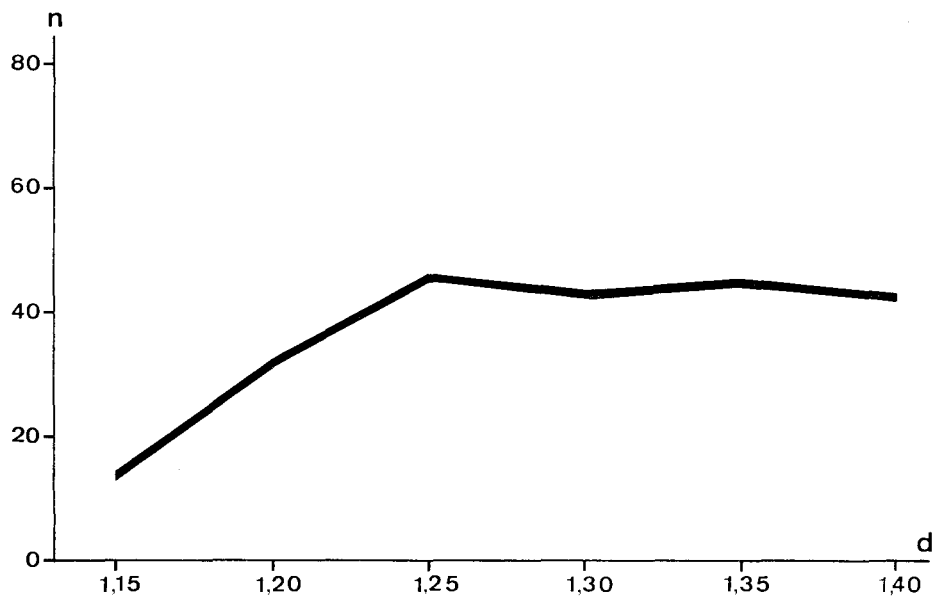


Fig. 1 - Extraction de *Longidoridae* d'échantillons de terre, au moyen de solutions de $ZnSO_4$ de différentes densités. Ci-dessus: *L. caespiticola*; ci-dessous: *X. diversicaudatum*; n = nombre de nématodes par 100 ml de terre.

1,25 et ne varie pratiquement plus au-delà. On peut admettre qu'à partir de cette densité les nématodes flottent et peuvent donc être isolés. La qualité de cette capture est comme déjà décrite.

Un essai analogue a été effectué au moyen de terre infestée de *X. diversicaudatum* (Fig. 1). La qualité de la capture et l'évolution du rendement peuvent être décrites et interprétées de la même façon que pour *L. caespiticola*.

Le test des sols de silice a eu lieu en deux phases, d'abord par l'étude de leur toxicité à l'égard des nématodes, et ensuite par la comparaison de leur pouvoir d'extraction avec celui d'autres techniques.

L'étude de la toxicité visait à déterminer jusqu'à quel point les différents sols de silice étaient nuisibles à la vitalité de *Xiphinema* et de *Longidorus*. Elle était simplement basée sur la mobilité de ces nématodes après un contact suffisamment long avec les solutions.

Les animaux d'essai étaient *X. diversicaudatum* et *L. caespiticola*. Douze spécimens bien mobiles ont été introduits dans chaque solution et leur mobilité a été relevée au bout de 15 minutes, c'est-à-dire après le laps de temps que les nématodes passent normalement dans la solution de séparation après la deuxième passe de centrifugation. Ils ont ensuite été transférés dans l'eau pure et leurs mouvements ont été observés de nouveau après respectivement un quart d'heure, une heure et quatre heures. Les résultats de ces observations sont reproduits dans le tableau III.

Tableau III - *Mobilité des animaux d'essai après séjour dans la solution et dans l'eau.*

Produits	Durée du séjour dans			
	la solution	l'eau		
	1/4 h	1/4 h	1 h	4 h
AS	a	a	a	a
LS	a	a	a	a
HS	c	c	b	b
130 M	c	c	b	b
AM	c	c	c	c
SM	c	c	c	c
TM	c	c	c	c

a = tous les nématodes restent mobiles; b = seulement une partie des nématodes restent mobiles; c = tous les nématodes sont immobiles.

Il ressort de ce tableau que les nématodes sont devenus immobiles dans trois solutions, en l'occurrence AM, SM et TM, et le sont restés dans l'eau pure. Ils ont perdu leur mobilité dans les deux solutions HS et 130 M, mais une partie d'entre eux l'a retrouvée après un séjour suffisamment long dans l'eau, et enfin ils ont gardé toute leur mobilité dans les deux solutions AS et LS.

Le pouvoir d'extraction des deux meilleurs produits, AS et LS, a été comparé avec celui de deux solutions très utilisées, la solution de saccharose et la solution de $MgSO_4$, à la densité 1,18. Deux autres méthodes, basées sur un principe différent, nommément l'élutriation, ont été incluses dans la comparaison. Ces méthodes sont celles de l'élutriation et du tamis de D'Herde et Van Den Brande (1964) et celle de l'élutriation et du filtre en cellulose d'Oostenbrink (1960) (Fig. 2). Les échantillons utilisés dans ces deux méthodes contenaient 100 ml de terre, au lieu de 50 ml. Dans le tableau IV la capture moyenne est indiquée par \bar{X} et le coefficient de variation par C.

Tableau IV - Comparaison de méthodes pour l'extraction de *Xiphinema* et de *Longidorus* spp.

Méthodes	<i>X. diversicaudatum</i>		<i>L. caespiticola</i>	
	\bar{X}	C	\bar{X}	C
Centrifugation à l'AS	277	8	30	15
Centrifugation au LS	263	8	32	19
Centrifugation au $MgSO_4$	52	24	1	53
Centrifugation au Saccharose	23	32	1	47
Méthode de l'élutriation et du filtre en cellulose	15	65	1	46
Méthode de l'élutriation et du tamis	129	8	13	17

\bar{X} : nombres moyens de nématodes exprimé par 100 ml de terre (n = 8);
C: coefficient de variation.

Les données ont été soumises à l'analyse des variances pour $P = 0,05$. Un trait vertical relie toutes les moyennes qui ne diffèrent pas significativement entre elles.

Le tableau autorise les conclusions suivantes:

— aussi bien pour *Xiphinema* que pour *Longidorus*, les chiffres obtenus avec AS et avec LS ne diffèrent pas significativement entre

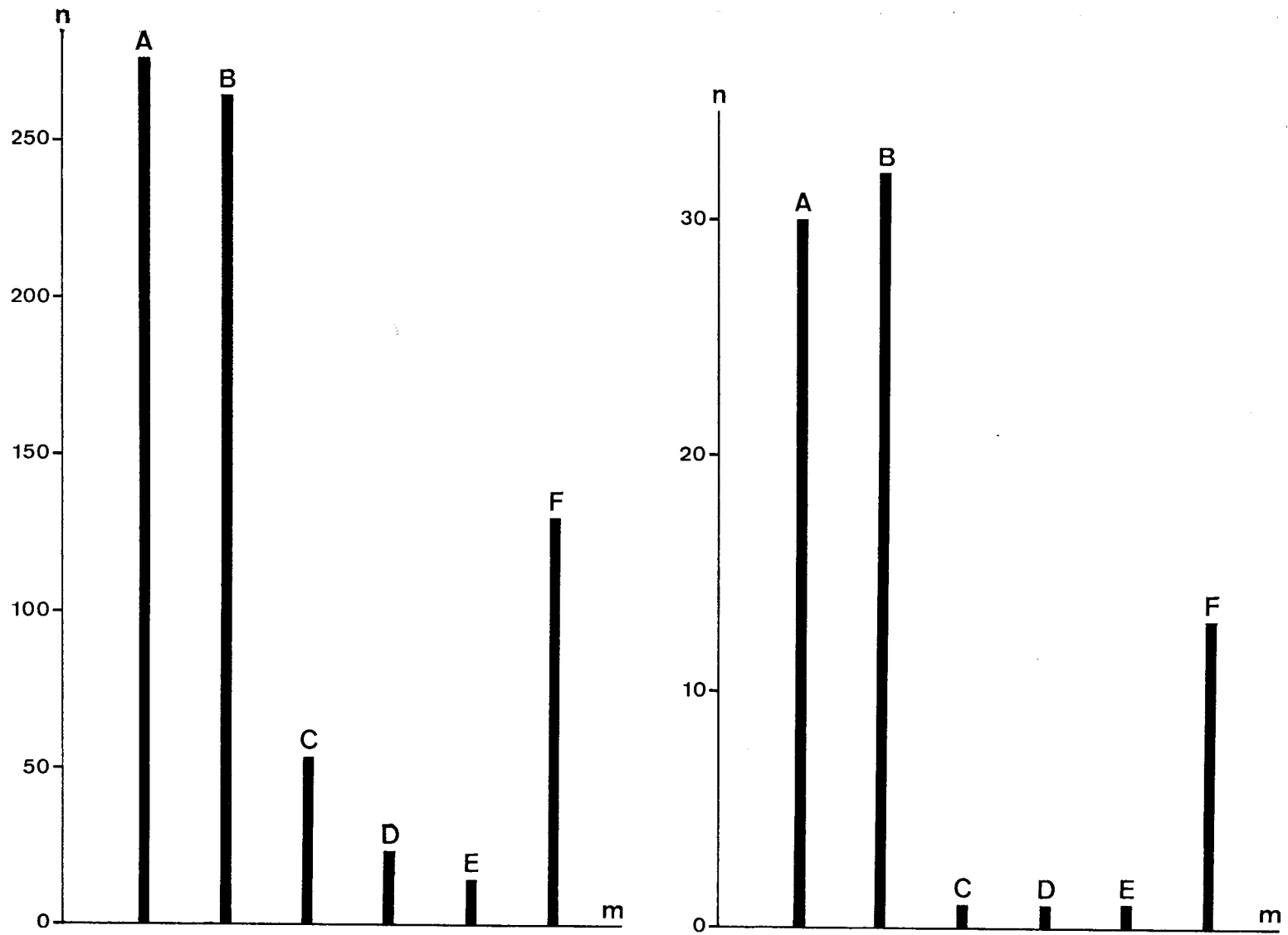


Fig. 2 - Comparaison de méthodes pour l'extraction de *Longidoridae*; gauche: *X. diversicaudatum*; droite: *L. caespiticola*; A: méthode centrifugation-flottation à l'AS; B: méthode centrifugation-flottation au LS; C: méthode centrifugation-flottation au MgSO₄; D: méthode centrifugation-flottation au saccharose; E: méthode d'élutriation et du filtre en cellulose; F: méthode d'élutriation et du tamis; m - méthode; n - nombre de nématodes par 100 ml de terre.

eux, mais différent significativement des chiffres relatifs à tous les autres traitements.

- Dans le groupe des quatre autres traitements, la méthode du tamis donne, pour les deux espèces de nématode, des résultats moyens significativement plus élevés que les autres. Dans la discussion relative à ce groupe, il n'est tenu compte que des résultats obtenus avec *Xiphinema*, les nombres de *Longidorus* étant trop peu élevés. Il apparaît ainsi que le filtre en cellulose et la centrifugation en solution de saccharose donnent le moins bon résultat. Le fait que la capture est significativement plus grande après la centrifugation en solution de $MgSO_4$ qu'après la centrifugation en solution de saccharose est imputable à la plus faible valeur osmotique de la première solution (Tableau II).
- Comparées avec les autres techniques, les centrifugations en sols de silice AS et LS et la méthode de l'élutriation et du tamisage donnent les coefficients de variation les moins élevés, ce qui indique une reproductibilité plus grande. Le fait que ces coefficients sont plus élevés pour *Longidorus* que pour *Xiphinema* est accidentel, ces derniers nématodes ayant été présents en moins grand nombre dans les échantillons.

Afin de déterminer le degré d'approche du contenu réel d'un échantillon, on a déterminé pour un des produits, le LS, le rendement de la centrifugation. Après avoir centrifugé l'échantillon de terre dans de l'eau, on a centrifugé le sédiment trois fois de suite dans la solution de LS. La somme des trois captures est considérée comme le contenu total et le rendement est la capture après la première centrifugation, exprimée en pour cent de la capture totale. Le tableau V reproduit, pour les trois centrifugations, les nombres moyens de nématodes (\bar{X}) provenant de 8 essais parallèles.

Tableau V - Rendement de la méthode de centrifugation avec le LS comme liquide de séparation.

Passe de centrifugation	<i>Xiphinema</i>		<i>Longidorus</i>	
	\bar{X}	%	\bar{X}	%
1ère	268	94	35	97
2ème	15	5	1	3
3ème	1	1	0	0
Total	284	100	36	100

\bar{X} : nombre moyen de nématodes par passe de centrifugation (n = 8).

Il ressort de ce tableau que, aussi bien pour *Xiphinema* que pour *Longidorus*, le rendement, c.à.d. la capture de la première centrifugation est très élevé et dépasse 90%.

CONCLUSION

Si l'on emploie des solutions de séparation à substances osmotiquement actives, par exemple au $ZnSO_4$, on peut effectivement augmenter les captures de *Longidorus* et de *Xiphinema* en augmentant la densité de ces solutions, mais les animaux extraits sont morts et difficiles à identifier lors de la détermination du genre et de l'espèce.

Il ressort de la comparaison de différentes techniques d'extraction que la centrifugation dans des solutions de produits sans activité osmotique donne la capture de loin la plus abondante. De plus, le contenu réel de l'échantillon est approché de très près, comme le démontre la détermination du rendement. Si l'on considère en outre la grande reproductibilité des résultats, on peut conclure à la grande précision de la technique de centrifugation en faisant emploi de solutions osmo-inactives.

Dans la pratique, on constate toutefois que la quantité de kaolin qui reste en suspension au terme de la centrifugation est plus grande quand on emploie un silice colloïdale que lorsqu'on emploie du saccharose ou le $MgSO_4$. Ceci est sans doute imputable à l'une ou l'autre interaction, encore inexplicée, de la solution colloïdale et du kaolin. C'est pourquoi l'on vide le tube centrifugeur sur un tamis libre de 10 μm , à travers lequel il est facile de faire passer le kaolin au moyen d'un peu d'eau.

On constate également que, pour un même échantillon, les solutions colloïdales gardent plus de matières organiques en suspension que ne le font les solutions de saccharose ou de $MgSO_4$. Ceci est probablement dû au fait que des résidus organiques encore insuffisamment décomposés se plasmolysent et se déposent dans ces solutions, mais non dans les sols de silice. Ce genre de pollutions, très variables, de l'eau de lavage du tamis ne gêne que peu ou pas de tout le comptage de ces nématodes relativement grands.

Les auteurs remercient sincèrement ing. G. Hendrickx pour sa contribution à ces recherches. Ils remercient aussi l'ingénieur R. Moermans qui a procédé au dépouillement statistique des données. Ils expriment aussi leur gratitude au professeur Dr. L. De Coninck, de l'Université de l'Etat à Gand, qui a bien voulu leur signaler les silices colloïdales qu'ils ont utilisés.

R É S U M É

Une expérience a consisté à essayer différents sols de silice de la gamme 'Ludox' (Du Pont), à savoir AS, AM, HS, LS, SM, TM et 130 M, avec *X. diversicaudatum* et *L. caespiticola* comme animaux d'essai. Dans la première partie de l'expérience, ces sols ont été testés à la densité de 1,18 sous le rapport de leur toxicité à l'égard des nématodes précités. Ceux qui nuisaient à la vitalité des nématodes ont été éliminés. Dans la deuxième partie de l'expérience, le pouvoir d'extraction des solutions retenues a été étudié par comparaison avec celui de solutions de saccharose et de $MgSO_4$. De plus, deux autres méthodes, basées sur un autre principe, ont été introduites dans la comparaison; ce sont la « méthode de l'élu-triation et du filtre en cellulose » et la « méthode de l'élu-triation et du tamis ». Se basant sur les résultats obtenus, les auteurs décrivent une méthode qui améliore l'extraction quantitative de Longidoridae.

R I A S S U N T O

Estrazione per centrifugazione di Longidorus e Xiphinema dal terreno mediante silice colloidale.

Sono state eseguite delle prove di estrazione di *Longidorus caespiticola* Hooper e *Xiphinema diversicaudatum* (Micoletzky) Thorne dal terreno mediante silice colloidale, appartenente al tipo « Ludox » (Du Pont). È stata saggiata la tossicità di: AS, AM, HS, LS, SM, TM e 130 M a densità 1,18 nei confronti dei suddetti nematodi. L'efficienza di estrazione dei prodotti non tossici è stata poi paragonata a quella del saccarosio e dell' $MgSO_4$, ed a quello dei metodi dell'elutrazione più filtro di cellulosa e dell'elutrazione più setacci. Sulla base dei risultati ottenuti viene messo a punto un metodo migliorato per l'estrazione quantitativa di Longidoridae.

O U V R A G E S C I T É S

- BOWEN R. A., ONGE J. M. et PRICE C. A., 1972 - Density-gradient centrifugation as an aid to sorting planktonic organisms. I. Gradient materials - *Marine Biology*, 14: 242-247.
- COOLEN W. A. et D'HERDE C. J., 1974 - Influence of the separation liquid used during the centrifugal flotation process on the extraction of *Longidoridae*. Communication ou XIIème Symposium International de Nématologie, Grenade, sept, 1974 (iné-dite).

- D'HERDE C. J. et VAN DEN BRANDE J., 1964 - Distribution of *Longidorus* and *Xiphinema* spp., in strawberry fields in Belgium and a method for their quantitative extraction. *Nematologica*, 10: 454-458.
- GOORIS J. et D'HERDE C. J., 1972 - A method for the quantitative extraction of eggs and second stages juveniles of *Meloidogyne* spp. from soil. Publication de la Station de nématologie et d'entomologie, 36 pp.
- HENDRICKX G., COOLEN W. A. et MOERMANS R., 1976 - Influence de la nature et de la densité des liquides de séparation sur les nématodes pendant le processus de centrifugation-flottation. *Nematol. medit.*, 4: 31-40.
- OOSTENBRINK M., 1960 - Estimating nematode populations by some selected methods. DANS: J. N. Sasser and W. R. Jenkins: Nematology, The University of North-Carolina Press, Chapel Hill, 85-102.

Accepté pour la publication le 30 Août 1977.