

Station de nématologie et d'entomologie de l'état, Merelbeke, Belgique
et
Bureau de biométrie, Merelbeke, Belgique

INFLUENCE DE LA NATURE ET DE LA DENSITÉ DES LIQUIDES
DE SÉPARATION SUR LES NÉMATODES PENDANT
LE PROCESSUS DE CENTRIFUGATION-FLOTTATION (1)

par

G. J. HENDRICKX, W. A. COOLEN et R. MOERMANS

On distingue deux phases de centrifugation dans la méthode de centrifugation-flottation: la première se déroule dans de l'eau et la seconde dans un liquide de séparation dont la densité se situe normalement entre 1,15 et 1,20. Le liquide employé est généralement une solution de sucre.

Les recherches décrites ci-après ont été entreprises pour étudier l'influence d'autres solutions de séparation, utilisées dans la seconde phase de centrifugation, sur le comportement et la mobilité des nématodes. La mobilité des nématodes extraits a été définie comme suit: l'aptitude à migrer vers de l'eau pure, à travers un filtre cellulosique dans les 24 heures commençant aussitôt après l'extraction. Les résultats de la recherche ont permis de faire un choix justifié entre les produits testés pour l'extraction à une densité de 1,15. Ce choix a conduit à son tour à l'élaboration d'un système de récupération du liquide après usage.

Matériels et méthodes

Les produits choisis pour l'essai étaient le sucre, le $MgSO_4$ et le $ZnSO_4$. Le sucre faisant office de référence, les deux autres produits ont été choisis à cause de la faible valeur osmotique de leurs

(1) Effect of nature and density of separating liquids on nematodes during the process of extraction by the centrifugation-flotation method.

solutions. Pour des solutions de densité 1,15, la baisse du point de congélation est de 3,3°C pour le sucre, de 3,0°C pour le MgSO₄ et de 1,9°C pour le ZnSO₄.

Les solutions ont été essayées aux densités 1,15, 1,20, 1,25 et 1,30. La densité maximale n'est en fait que de 1,29 pour le MgSO₄: la saturation y est atteinte à la température ambiante. Ceci explique aussi le choix de la limite supérieure de la série de densités.

Des densités inférieures à 1,15 n'ont pas été essayées parce qu'elles ne permettent plus d'extraction quantitative de nématodes (Coolen et D'Herde, 1972). L'animal d'essai choisi était *Rotylenchus robustus* (de Man) Filipjev.

Les nématodes avaient préalablement été extraits d'une terre sablonneuse selon la méthode d'éluatriation d'Oostenbrink (1960). Ils ont été rassemblés sur un tamis de 200 µm, de sorte qu'il restait finalement une population homogène d'animaux adultes ou pré-adultes. Le contenu du tamis a été versé sur un filtre cellulosique posé sur un tamis dans un récipient contenant de l'eau. Seuls les nématodes qui avaient traversé le filtre au bout de 24 heures, ont servi le jour même du comptage pour les expérimentations.

Cinq ml d'une suspension-mère parfaitement homogénéisée à l'aide d'un agitateur-vibreux ont été chaque fois prélevés à la pipette et transférés dans des tubes de centrifugation de 100 ml, complétés ensuite par les solutions d'essai.

La méthode de centrifugation-flottation (Gooris et D'Herde, 1972) a été imitée, sans terre, à partir de la deuxième phase de centrifugation jusqu'à l'introduction des nématodes dans de l'eau pure. On introduisait ainsi dans l'essai aussi bien la durée du séjour dans le liquide de séparation que les influences possibles de la centrifugation. La capture était versée immédiatement sur un filtre cellulosique et on comptait après 24 heures les nématodes qui avaient traversé le filtre cellulosique et étaient parvenus dans l'eau sous ce filtre. L'essai comportait 13 combinaisons: une comparaison de 3 produits et de 4 densités et une où les nématodes étaient centrifugés dans de l'eau pure. Chaque combinaison a fait l'objet de 8 essais parallèles.

Résultats et discussion

Le tableau I reproduit les résultats. Ils ont été soumis à une analyse de variance avec, comme schéma, une épreuve de 2 facteurs

et une interaction. Les deux facteurs examinés ont été considérés comme fixes, de sorte que l'on pouvait tester sous le rapport de l'erreur. Le test s'effectuait au niveau $P < 0,05$.

Tableau I - *Nombre moyen de nématodes sous le filtre cellulosique.*

Solution	D e n s i t é				Moyenne
	1,15	1,20	1,25	1,30	
Sucrose	154	154	149	136	148
MgSO ₄	152	134	102	95	121
ZnSO ₄	145	113	69	68	99
Moyenne	150	134	107	100	123

Il apparaît ainsi qu'il existe des différences significatives entre les sortes de solutions et entre les densités, et qu'il existe une interaction significative « sorte de solution » x « densité ». Il convient donc d'examiner les effets de la « sorte de solution » à des densités constantes et vice versa. Le résultat de la comparaison des densités pour une même sorte de solution par le test de Duncan est reproduit dans le tableau I, où les moyennes qui ne diffèrent pas significativement sont reliées par un trait.

La comparaison des « sortes de solution » à la même densité donne les résultats suivants:

à $\delta = 1,15$	Sucrose = MgSO ₄ = ZnSO ₄
$\delta = 1,20$	Sucrose > MgSO ₄ > ZnSO ₄
$\delta = 1,25$	Sucrose > MgSO ₄ > ZnSO ₄
$\delta = 1,30$	Sucrose > MgSO ₄ > ZnSO ₄

Il découle de cette série d'équations que, quoique l'interaction soit significative, les inégalités dans le même sens restent maintenues. Les même ordre de succession subsiste aussi pour la densité 1,15 quoique les résultats ne diffèrent pas de façon significative.

La figure 1 qui reproduit l'évolution des nombres de nématodes récupérés sous le filtre cellulosique en fonction de la densité, montre que nous avons à faire à 3 courbes-« produits » divergentes partant d'à peu près le même point pour $\delta = 1,15$.

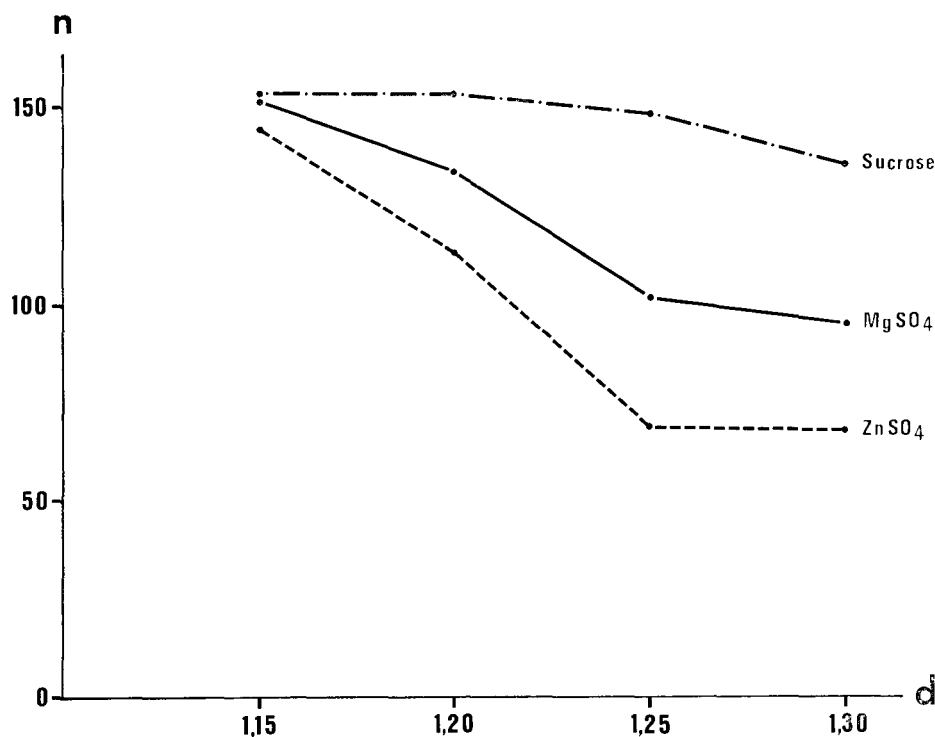


Fig. 1 - Evolution des nombres de nématodes pour le sucrose, le MgSO₄ et le ZnSO₄, pour 4 densités (d = densité; n = nombre de nématodes).

De l'examen des 3 facteurs qui peuvent entrer en ligne de comptes pour l'explication, c'est à dire la pression osmotique, le pH et la toxicité des produits en soi, il ressort:

- que la pression osmotique n'influe guère sur l'évolution puisque les résultats, pour tout le trajet de densités, sont les plus défavorables pour la solution ayant la plus basse valeur osmotique: ZnSO₄, et les plus favorables pour celle qui a la plus haute valeur osmotique: la solution de sucrose. Un argument supplémentaire est l'évolution inégale des courbes du sucrose supplémentaire est l'évolution inégale des courbes du sucrose et du MgSO₄, deux produits à valeur osmotique à peu près égale;
- que le pH ne peut pas plus expliquer l'évolution des courbes puisque celles du sucrose et du MgSO₄ reste 7 sur toute la ligne et varie que de 5,5 à 5,3 pour le ZnSO₄;

— que l'élimination ne laisse comme cause que la toxicité des produits, comme molécule ou sous forme ionisée. On peut supposer que le sucrose ne manifeste pratiquement aucune toxicité, tandis que cette dernière augmente avec la concentration des deux sels et plus fortement pour le $ZnSO_4$ que pour le $MgSO_4$.

A $\delta = 1,15$ cet effet n'exerce pas d'action significative dans les conditions de l'essai. Ceci se confirme si l'on compare les résultats de l'essai témoin, à l'eau pure, avec ceux obtenus à $\delta = 1,15$ pour les 3 produits:

Solutions	Nombres de nématodes
Eau	157
Sucrose	154
$MgSO_4$	152
$ZnSO_4$	145

L'analyse statistique ne fait apparaître aucune différence significative entre ces 4 résultats.

On peut donc conclure que les 3 solutions à $\delta = 1,15$ n'ont que peu ou pas d'influence qualitative sur *R. robustus* pendant le processus de centrifugation. Ceci signifie que l'on peut escompter aussi le même résultat quantitatif. De fait, au cours d'un essai comparatif avec une terre naturellement infestée, on a comparé, en 8 parallèles, les résultats d'une extraction à l'aide des 3 solutions à $\delta = 1,15$:

Nombres de *R. robustus* par 100 ml de terre

Solutions	Nombres de nématodes
Sucrose	920
$MgSO_4$	840
$ZnSO_4$	860

Aucune différence significative entre ces résultats n'a pas été constatée.

Sin l'on se base sur les résultats on peut, sur le plan pratique, faire à $\delta = 1,15$ un choix entre les 3 produits. Le sucrose n'est pas toxique et bon marché, mais dans un laboratoire où l'on procède à de nombreuses analyses il faut constituer une importante réserve de solution et celle-ci peut alors être facilement polluée par des micro-organismes.

Employées de façon normale, les 2 solutions de sel sont à peu près non toxiques et ne présentent pas l'inconvénient précité du sucrose. Elles ont, par contre, l'inconvénient d'être beaucoup plus coûteuses, mais il peut y être remédié si on récupère la solution après usage. Un système de récupération de ce genre est décrit plus loin.

Le $MgSO_4$ a finalement été préféré au $ZnSO_4$ à cause de sa neutralité. Des recherches ultérieures ont démontré que ce sel n'offre pas d'inconvénients pour l'étude d'autres Tylenchidae, tels que *Pratylenchus* Filipjev et *Meloidogyne* Goeldi, à $\delta = 1,15$. Il a toutefois été reconnu inutilisable, comme d'ailleurs la plupart des autres produits, pour l'extraction de Longidoridae (Thorne) Meyl (travaux encore inédits).

Récupération du liquide de séparation

Le circuit de récupération est représenté dans la figure 2. Il consiste en un réservoir A qui alimente, par une conduite B, un robinet de soutirage C, placé plus bas. Après usage, le liquide est acheminé par la conduite D à l'élément filtrant E. Le pompe dite péristaltique F ramène le liquide purifié au réservoir A.

L'élément filtrant consiste en 2 récipients (Fig. 3). Le premier récipient contient le filtre, en l'occurrence une couche épaisse de laine de verre maintenue entre 2 plaques grossièrement perforées. Le bas du récipient est relié à un mince tuyau vertical, qui débouche plus haut que la surface du filtre. Ceci constitue donc un système de vases communicants et le filtre reste constamment submergé de quelques centimètres de liquide. Cette disposition présente un double avantage:

- la nappe liquide intercepte la solution de $MgSO_4$ à son arrivée, de sorte que la filtration est ralentie et donc plus radicale;

— l'humidité permanente du filtre empêche l'agglutination des impuretés (entre autres des particules de kaolin), qui pourrait entraîner une diminution de la surface filtrante utile et même l'obstruction du filtre.

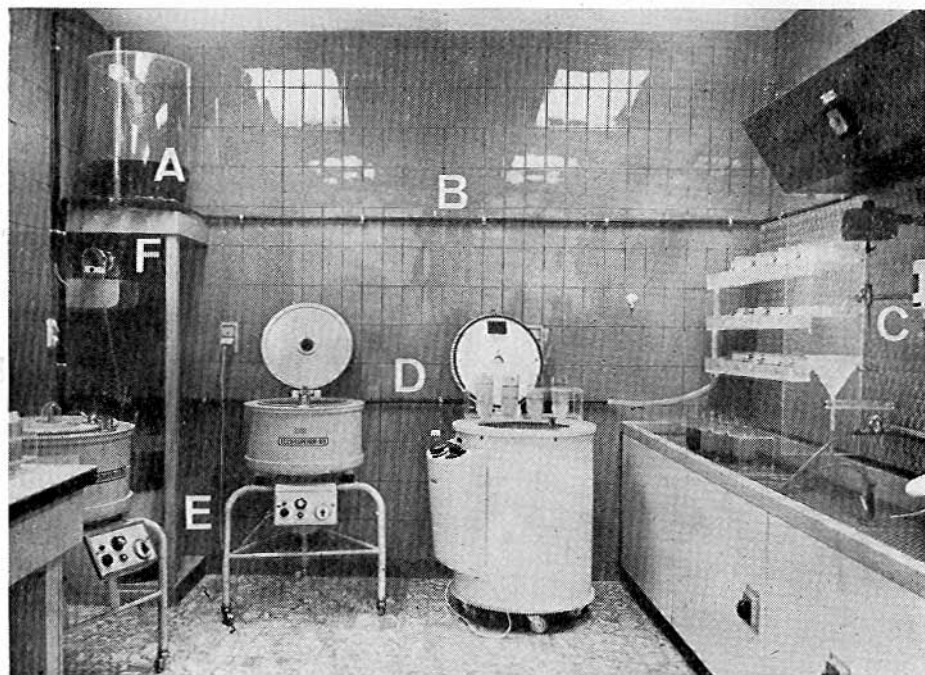


Fig. 2 - Vue général du système de récupération.

L'autre récipient recueille le liquide purifié à mesure qu'il déborde. Ce liquide peut dès lors être pompé vers le réservoir. Les récipients sont couverts pour éviter l'évaporation de leur contenu. Au laboratoire, le récipient à filtre est placé dans le second récipient pour rendre l'installation plus compacte. L'exécution entièrement en plastique des récipients et conduites, ainsi que de la pompe de type spécial, exclut toute corrosion par la solution saline.

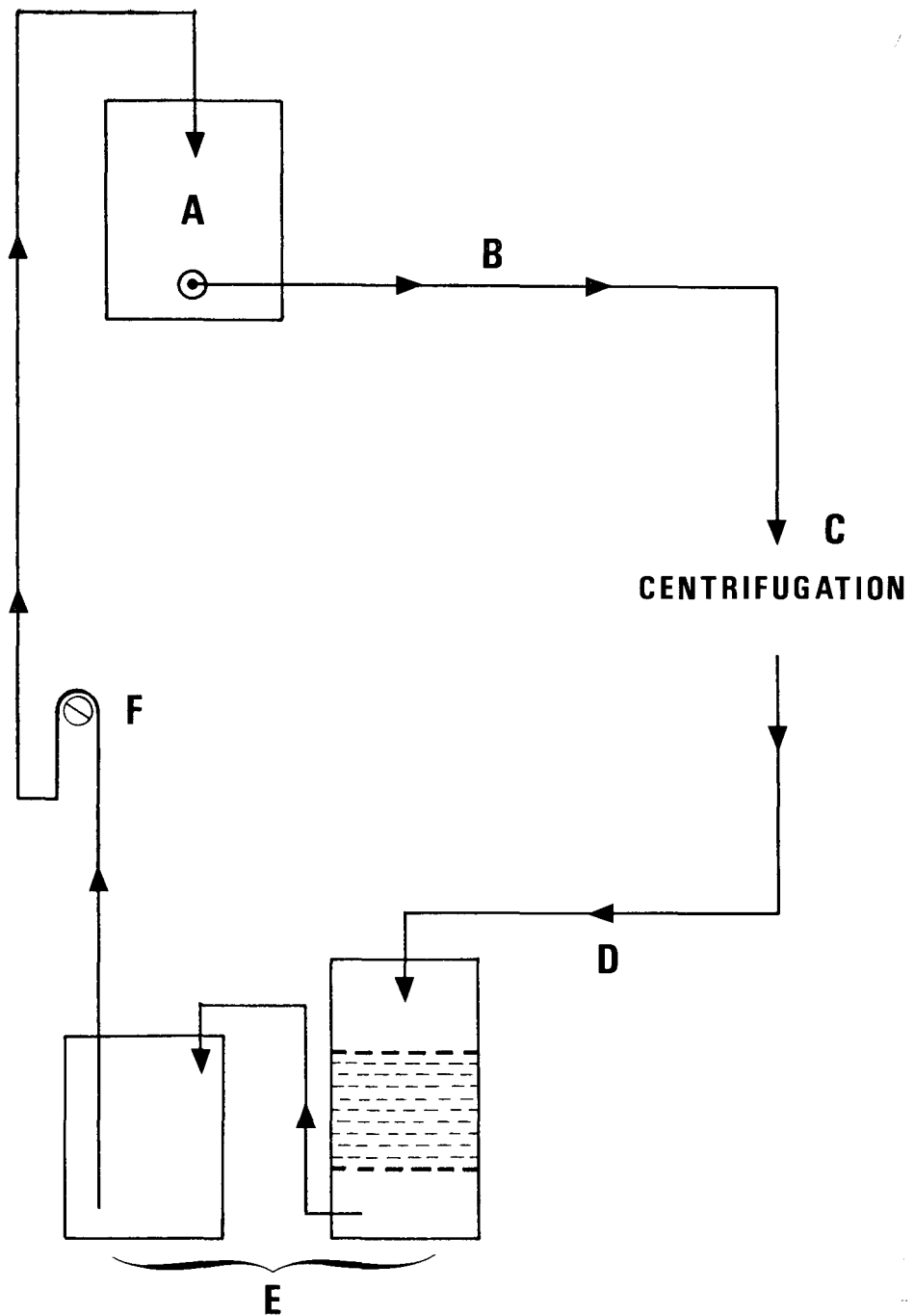


Fig. 3 - Schéma du principe du système de récupération.

Conclusion

Des recherches sur l'influence du processus de centrifugation-flottation sur la qualité de *R. robustus*, entreprises avec 3 solutions de séparation différentes à 4 densités différentes, ont permis de tracer des courbes divergentes partant d'un point à peu près identique pour $\delta = 1,15$.

Des facteurs entrant en ligne de compte pour l'explication, à savoir la pression osmotique, le pH et la toxicité des produits, le dernier a pu être reconnu prépondérant. Ce facteur n'a toutefois pas d'effet significatif à la concentration correspondant à la densité 1,15. Une solution de $MgSO_4$ a été préférée, principalement pour des raisons d'ordre pratique. Un système spécialement conçu permet de réutiliser ce produit relativement coûteux.

R É S U M É

Dans l'expérience décrite ici, les auteurs ont étudié la tolérance de *Rotylenchus robustus* (de Man) Filipjev à l'égard de solutions de différents produits, en concentrations ou densités croissantes, utilisées comme liquides d'extraction dans la méthode de centrifugation-flottation. Les résultats indiquent, entre autre, que pour $\delta = 1,15$ la tolérance était presque égale envers les trois solutions. L'utilisation d'une solution de $MgSO_4$ offre des avantages pratiques par rapport au succrose ou $ZnSO_4$. Un système de récupération après usage de la solution de ce produit relativement coûteux, a été élaboré.

R I A S S U N T O

Influenza della natura e della densità di liquidi di separazione sui nematodi durante il processo di estrazione per centrifugazione-flottazione.

È stata studiata la tolleranza di *Rotylenchus robustus* (de Man) Filipjev a soluzioni di vari prodotti, in concentrazioni e densità crescenti, utilizzati come liquidi d'estrazione nel metodo di centrifugazione e flottazione. I risultati indicano che per $\delta = 1,15$ la tolleranza è stata quasi uguale per le tre soluzioni saggiate. L'utilizzazione di una soluzione di $MgSO_4$ offre, però, vantaggi pratici nei confronti di saccarosio o $ZnSO_4$. È descritto anche un metodo di recupero della suddetta soluzione.

S U M M A R Y

Effect of nature and density of separating liquids on nematodes during the process of extraction by the centrifugation-flotation method.

An experiment was carried out to determine the tolerance of *Rotylenchus robustus* (de Man) Filipjev towards solutions of different products at increasing

concentrations and densities used as extraction liquid in the centrifugal-flotation method. The results indicate that the tolerance was almost identical at $\delta = 1.15$ for the three solutions tested. The $MgSO_4$ solution, however, offers practical advantages with respect to sucrose and $ZnSO_4$. A system to recuperate this solution was devised.

O U V R A G E S C I T É S

- COOLEN W.A. and D'HERDE C.J., 1972 - A method for the quantitative extraction of nematode from plant tissue. Publication de la Station de nématologie et d'entomologie de l'état, Merelbeke, 77 pp.
- GOORIS J. and D'HERDE C.J., 1972 - A method for quantitative extraction of eggs and second stage juveniles of *Meloidogyne* spp. from soil. Publication de la Station de nématologie et d'entomologie de l'état, Merelbeke, 36 pp.
- OOSTENBRINK M., 1960 - Estimating nematode population by some selected methods. In: « Nematology » (éd. J.N. Sasser et W.R. Jenkins). The University of North Carolina Press, Chapel Hill, 85-102.

Accepté pour la publication le 20 Septembre 1975.