

Laboratoire de Zoologie du Sol, I.N.R.A., Dijon

Un nouvel outil,
essentiel pour l'écophysiologie et l'écotoxicologie:
l'élevage des lombriciens en sol artificiel

G. FERRIÈRE, L. FAYOLLE et M. B. BOUCHÉ

Avec 2 figures

(Accepté: 15. 11. 80)

1. Introduction

L'importance des lombriciens dans la nature n'est plus à démontrer notamment depuis le travail de DARWIN (1881). Leur étude s'est heurtée malheureusement à de nombreuses difficultés parmi lesquelles l'absence de recherches suffisantes à peu près dans tous les domaines: taxonomique, écologique, physiologique, etc. Toutefois, peu à peu, la situation a changé; leur importance dans l'économie de la nature est reconnue par les autres disciplines et leur prise en compte, soit comme paramètre déterminant, soit comme moyen d'action, est aujourd'hui ébauchée.

Des progrès consistants sur l'écologie des lombriciens, acquis ou en cours d'acquisition, permettent de mieux poser les études analytiques par rapport aux phénomènes observés au champ. Réciproquement, ces études analytiques sont rendues nécessaires pour mieux comprendre certains mécanismes des phénomènes écologiques récemment découverts. La nécessité d'un élevage en milieu artificiel, inerte, reproductible et contrôlé est devenu indispensable pour avancer dans diverses voies. A titre d'exemple, envisageons trois préoccupations de notre laboratoire. D'abord, l'étude écotoxicologique (BOUCHÉ & FAYOLLE, sous presse) ayant pour objet de mieux définir les accumulations de contaminants au niveau de la première zoomasse des terres émergées tempérées, celle des lombriciens, est un impératif pour tous les contaminants (métaux lourds, pesticides, radionucléides, etc.); un milieu artificiel s'imposait à la fois pour obtenir un test standard «légal» et un moyen d'étude analytique de mécanismes indépendamment des conditions naturelles, toujours particulières (végétation, climat, sol, histoire, etc.; BOUCHÉ 1979).

Ensuite les recherches écophysiologiques, tendant notamment à quantifier *in situ* les flux d'éléments dans le compartiment lombricien grâce à une série de techniques, dont le marquage isotopique (FERRIÈRE & BOUCHÉ, en prép.), permettront non plus l'extrapolation sans contrôle de données paraécologiques du laboratoire au champ (BOUCHÉ 1977) mais à l'inverse, une reproduction contrôlée au laboratoire à partir de mesures écologiques.

Dernière préoccupation, la compréhension des mécanismes microbiologiques — par exemple du lien lombriciens-protéolytiques observé par ROUELLE (1977) dans la drilosphère; il pourrait s'expliquer par une production abondante de mucus dont la quantification et les mécanismes de production doivent être étudiés.

Notons que nous donnons ici un sens strict aux notions de sol artificiel et au terme expérimental; très différent en tout cas du «sol artificiel» — en fait naturel mais placé en conditions artificielles — et des conditions très partiellement contrôlées et peu reproductibles décrites par JEANSON (1968; 1972).

2. Objectifs et limites de l'élevage en sol artificiel

Nous nous sommes assignés comme objectifs de créer un milieu d'élevage reproductible, inerte chimiquement, aussi simple et économique que possible et adapté à divers lombriciens.



Un certain nombre de conditions reproductibles pré-existaient, tel le contrôle de la température qui ne pose pas de problèmes spécifiques ou l'aération des boîtes. En supposant l'air de qualité constante, nous avons utilisé la ventilation forcée d'air saturé d'eau à 100 % grâce à un dispositif décrit par l'un d'entre nous (BOUCHÉ 1972). L'air, étant constamment renouvelé, n'introduit pas d'effet en rétro-action due, par exemple, aux gaz délétères se dégageant d'un élevage recevant des matières très fermentescibles dont celles des cadavres de lombriciens. La saturation de l'air permet de maintenir constante l'humidité initialement créée dans le sol.

Un certain nombre d'autres conditions n'ont pas été fixées ici car elles constituent autant de cas particuliers propres à chaque type d'élevage: c'est notamment le cas de l'alimentation qui peut provenir de sources diverses, y compris de végétaux standards obtenus par culture hydroponique; c'est aussi le cas du contrôle des micro-organismes (élevages à microflore spontanée, élevages gnotobiotiques, pas toujours nécessaires).

En fait, la difficulté majeure résidait dans la création d'un sol artificiel chimiquement inerte où les lombriciens pouvaient être élevés. Nous dénomerons ce sol artificiel «artisol» dans la suite de cet article.

3. Elaboration du sol artificiel

3.1. Nécessité d'un squelette

De premiers essais (1965) avaient été effectués en essayant simplement des élevages en alumine calcinée: ce fut un échec car les lombriciens ne pénétraient pas le milieu. Ceci ne provenait pas d'une répulsion à l'alumine mais d'un problème physique: l'absence de porosité ou/et de structure. On observe un phénomène analogue avec des sols limoneux ou argileux totalement destructurés et tassés.

Nous avons repris récemment ces essais dans l'objectif de parvenir à un milieu artificiel pour tous lombriciens, y compris les épigés qui n'ont qu'une faible aptitude à fouir et vivent dans des milieux généralement poreux. Des élevages d'*Eisenia fetida fetida* SAV. (souche Ef P. 1756) dans du gravier naturel permirent de vérifier une survie allant jusqu'à 11 jours où les animaux épigés pénétraient et occupaient le substrat. Pour obtenir une neutralité chimique meilleure, ces élevages furent répétés sur billes de verre de diamètres 6, 8 et 10 mm. La survie fut très brève (moins de 6 jours) et la pénétration mauvaise pour les billes 6 et 8 mm, un peu meilleure (6 à 7 jours) pour les billes de 10 mm de diamètre. Afin d'adapter la méthode à une large gamme de lombriciens y compris de grosses espèces comme *L. terrestris* nous avons adopté par la suite des billes de diamètre = 20 mm. Cette solution permet une exploration de toute la boîte par les animaux grâce à la formation d'un squelette rigide, les billes se bloquant entre elles.

3.2. Nécessité d'une matrice élaborée

Les premiers essais sur billes de verre furent faits dans des boîtes d'élevage à aération passive par le haut. On pouvait soupçonner que, les boîtes fonctionnant en pièges à CO₂ (plus dense que l'air), le film d'eau au contact billes-lombriciens s'acidifierait en l'absence de tout tampon (*Eisenia fetida* est très sensible à l'acidification). L'ouverture d'un orifice vers le bas ou l'apport de CO₂Ca à 1 pour 1000 dans la solution mouillant initialement le squelette permit effectivement d'augmenter la survie de plusieurs jours.

On essaya d'élever les animaux uniquement dans les pores du squelette notamment grâce à une aération forcée mais l'absence de tout environnement tamponnant créa de multiples incidents: condensation d'eau due à de petits écarts de température, acidification locale dérivant de putréfaction, etc. Par ailleurs, les études d'écotoxicologie s'effectuent par rapport à des concentrations de contaminants dans le sol; il était donc préférable d'introduire une matrice (c'est-à-dire pores + fraction fine du sol, d'après GODRON et al., 1968) entre le squelette de l'artisol. Nos essais de réalisation de cette matrice ont porté sur deux constituants majeurs du sol, l'aluminium et le silicium, sous des formes chimiquement inertes: l'alumine et la silice.

L'alumine calcinée a d'abord été utilisée mais celle-ci adhérait très mal aux billes du squelette et plus fortement aux lombriciens littéralement «enfarinés» par cette poudre même mouillée en pâte. L'alumine activée (granulés de 2 à 5 mm) a donné quelques résultats mais a été écartée en raison de sa structure granuleuse qui interdisait, pour de futures expériences, une dispersion homogène des contaminants. Pour créer une structure convenable de la fraction fine, divers essais ont été tentés par addition à l'alumine calcinée d'un liant au silicone: le «47 V 200.000». Des survies d'un mois ont été obtenues sur l'alumine activée et celles-ci furent supérieures avec le mélange au silicone + alumine calcinée. Toutefois, l'ensemble des milieux à l'alumine semblait présenter de sérieux inconvénients en cas de mortalité; les liquides putrides se dispersant relativement largement et la reproductibilité des élevages étant assez imprévisibles.

Pour obtenir la matrice, nous avons ensuite utilisé une silice précipitée hydratée amorphe: la «lévillite». Après divers tâtonnements pour définir les conditions pratiques d'usage, les élevages dans ces conditions furent un succès.

Les propriétés de ce milieu d'élevage s'avèrent d'emblée excellentes. Au cours de l'élevage, le haut pouvoir absorbant de la lévillite évite la diffusion des liquides putrides d'une part, d'autre part l'importante quantité d'eau du milieu tamponne d'éventuelles microvariations d'humidité due à

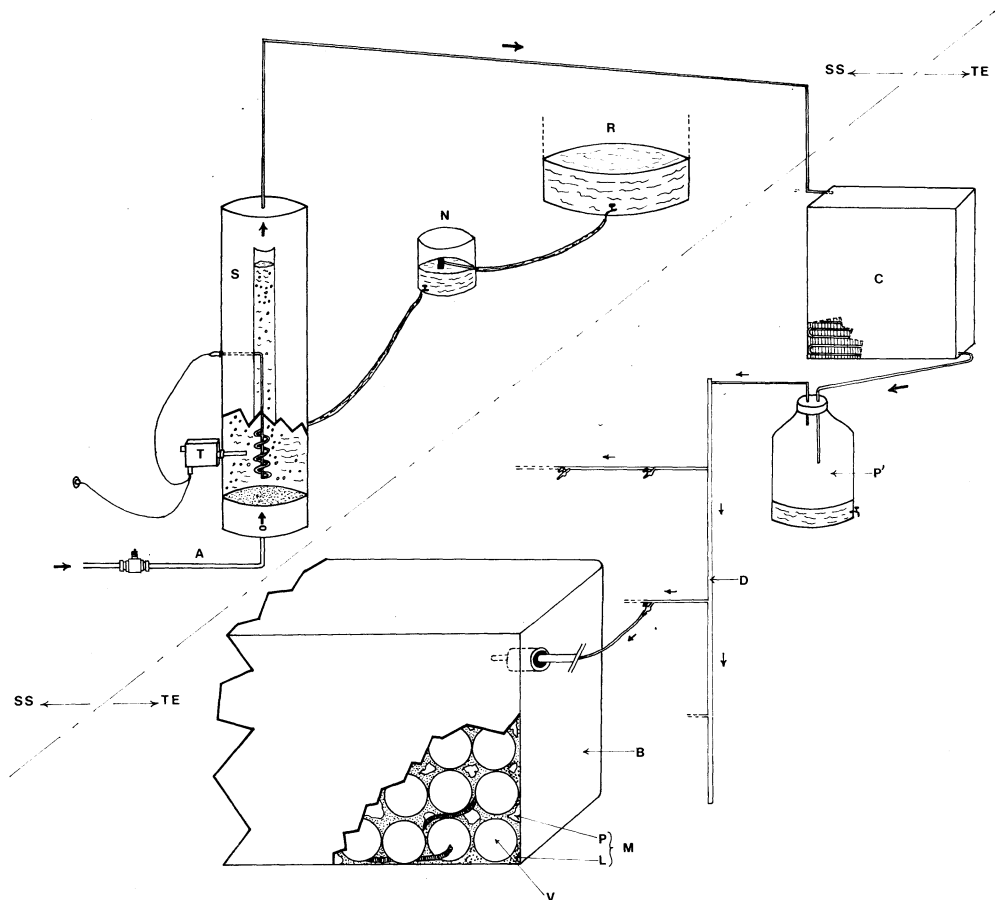


Fig. 1. Schéma du dispositif d'élevage en artisol. Un dispositif de saturation SS (A: arrivée d'air comprimé; S: saturation; T: thermocontrôle de S; N: bac à niveau; R: réserve d'eau) envoie l'air dans la salle d'élevage thermiquement contrôlée TE. Un condensateur C collecte l'excès d'eau de l'air dans un piège P'. L'eau est ensuite distribuée dans les boîtes d'élevage. Une boîte (agrandie) B montre en éclaté le squelette V et la matrice M avec sa silice L et ses pores P.

de faibles écarts thermiques; les lombriciens se déplacent dans cette matrice sans être enrobés de la fraction «minérale» de sol, c'est-à-dire abondamment pour des espèces endogées géophages comme *Allolobophora chlorotica chlorotica* SAV., forme albinique, de façon plus modérée comme l'épi-anécique *Lumbricus terrestris* L., enfin modestement mais constamment par l'épigé *Eisenia fetida*. Hors élevage, il y a lieu de noter que la finesse de la lévilite et le fait que l'on puisse travailler en poudre facilitent une dispersion quasi parfaite des contaminants ou autres additifs secs. Notons aussi que le lavage des ustensiles d'élevage récupérés y compris du squelette de billes est très facile.

4. Milieu d'élevage et quelques résultats

Nous avons donc utilisé la méthode standardisée suivante (fig. 1): boîte d'élevage de 2 litres; surface «terrière»: 300 cm²; ventilation d'air saturé d'eau: 4 l/heure; squelette: 2.850 g de billes de verre de diamètre = $20 \pm ,5$ mm; matrice: macropore 37% (= 200 cm³); silice humectée: 630 g (= 540 cm³). La silice humectée est constituée de 180 g de lévilite et de 414 g d'eau mélangées avant d'être incorporées aux billes. En pratique, une certaine porosité additionnelle existe, due aux billes qui ne sont pas parfaitement jointives (des amas de la silice humectée les séparent) et à une microporosité du mélange lévilite de sorte que 400 cm³ de pores totaux peuvent être comblés par de l'eau.

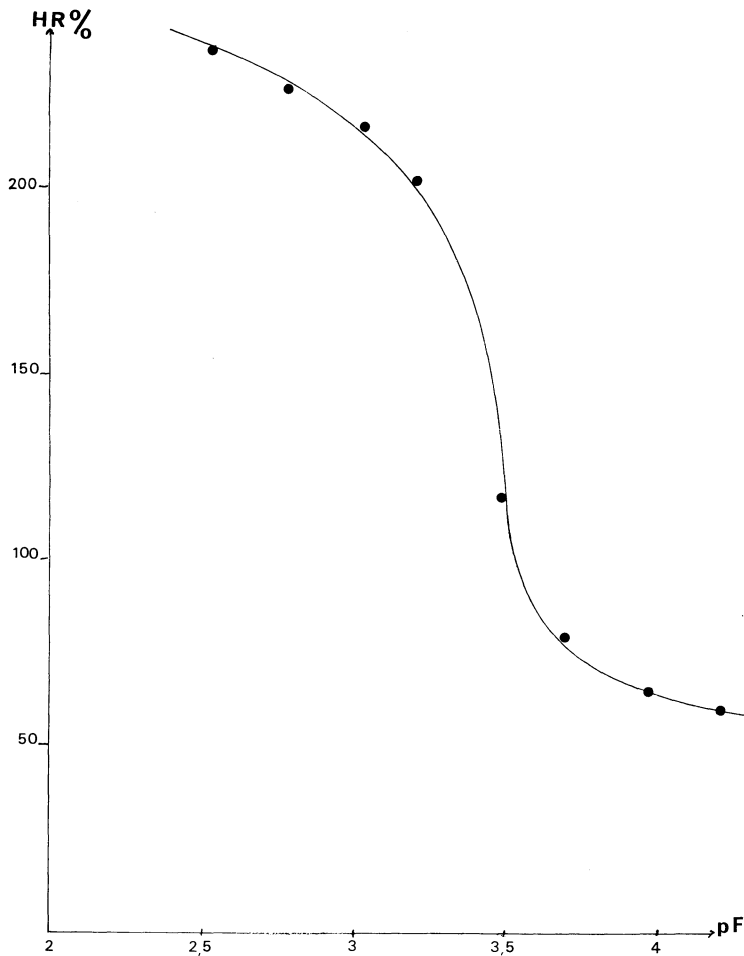


Fig. 2. Relation pF et humidité relative en pourcent du poids sec de la matrice (lévillite) (données de DE CRECY, I. N. R. A., Dijon).

La pureté de ce milieu standard est relativement élevée et contrôlable; il est contaminé seulement par les récipients (actuellement en polychlorure de vinyl), les billes de verre, l'eau et la silice. La silice utilisée est à 99% de SiO_2 lorsqu'elle est desséchée mais contient normalement 4,5—5,5% d'eau de constitution et 12% d'eau libre au maximum. Une grande surface spécifique ($450 \text{ m}^2/\text{g}$ minimum) due aux particules très fines (5 nm) et son pH (en suspension à 10% = 7—8) favorisent nettement les élevages. Les impuretés sont en analyse type de 0,7% de sels solubles à l'eau; As = 0,1 ppm, Pb = 15 ppm, Fe = 200 ppm. Une fiche technique précise peut être obtenue pour chaque lot de silice.

Ce milieu a été utilisé pour diverses expériences de durée variable (tableau 1). Pour comparer avec des sols d'origine naturelle, ceux-ci ont été essayés dans les mêmes conditions d'espace volumique et de porosité, c'est-à-dire avec un squelette de billes identique (apport de 540 cm^3 de ces sols). Le nombre de vers introduits dans chaque boîte est ajusté pour obtenir une biomasse équivalente à environ 2 T de lombriciens vifs à l'hectare. Aucune mortalité particulière n'a été décelée si ce n'est dans les gros *Lumbricus terrestris* L. probablement en raison des pores inter-billes un peu étroits.

Une expérience de longue durée a été également effectuée avec des *Nicodrilus* anéciques larves de Cîteaux, placés dans un sol humifère ou dans l'artisol (2 répétitions) pendant

Tableau 1. Survie de lombriciens dans divers élevages

Souches	Sols	Nourriture	N. I. N. S. Mort.			Duree	T °C
<i>E. fetida</i>	Artisol	0	420	402	4,3	7 j	22,5
	Artisol	0	120	112	6,7	28 j	22,5
	humifère + billes	0	60	57	5,0	7 j	22,5
	argileux + billes	0	60	59	1,7	7 j	22,5
	sablo-lim. + billes	0	60	58	3,3	7 j	22,5
	Artisol	son (500 mg p. s.)	20	19	5,0	7 j	22,5
	Artisol	son (500 mg p. s.)	20	19	5,0	7 j	22,5
<i>A. chlorotica</i>	Artisol	0	80	77	3,8	7 j	18
<i>L. terrestris</i>	A Artisol	0	18	15	16,7	7 j	18
	S Artisol	0	11	9	18,2	7 j	18
	L Artisol	0	20	19	5,0	7 j	18

N. I.: nombre initial de vers; N. S.: nombre de survivants; Mort.: mortalité en %; A: adultes; S: subadultes; L: larves.

Tableau 2. Comparaison sol-artisol pendant une longue (deux répétitions)

		Début		Contrôles					
		Mise en élevage 29/6/79		12/7 (13ème j.)		2/8 (34ème j.)		7/9 (70ème j.)	
		N. I.	P. M.	N. S.	P. M.	N. S.	P. M.	N. S.	P. M.
Sol	1	6	406,8 ± 64,7	6	391,0	5	350,0	5	284,4
	2	6	421,0 ± 108,2	6	387,0	6	425,0	5	270,2
Artisol	1	6	400,0 ± 80,0	6	419,2	6	431,7	6	271,2
	2	6	425,7 ± 115,4	6	400,2	6	403,3	6	280,3

N. I.: nombre initial de vers; N. S.: nombre de survivants; P. M.: poids moyen (mg p. h.).

70 jours (tableau 2). La chute de poids observée provient de la période estivale chez ces animaux à diapause ou/et du mode d'alimentation, constituée de fragments végétaux de 1—2 mm ($\frac{1}{3}$ son, $\frac{1}{3}$ tilleul, $\frac{1}{3}$ foin) que l'on sait aujourd'hui inadéquats car les larves s'alimentent surtout de fins débris (FERRIÈRE, sous presse).

D'une façon générale, la tenue sanitaire des lombriciens est très bonne dans l'artisol. Pour déclencher une éventuelle interaction par cadavérisation, nous avons introduit dans un élevage 4 *E. fetida* sectionnés, nous avons récolté au bout de 52 jours 4 régénérats (2 régénérations caudales, 1 céphalique et 1 double caudale et céphalique). La survie de diverses espèces a pu être observée dans le milieu de lévillite seule (sans squelette), lequel peut être utilisé comme moyen de purger les animaux au même titre que la cellulose. Toutes les espèces testées consomment la lévillite hydratée. Elle constitue également un support neutre permettant, en modifiant les proportions d'eau, le fouissage des endogés et anéciques.

La proportion d'eau adoptée (230 % de poids sec de la matrice) correspond à pF = 2,5 (fig. 2). Ce pF s'est avéré être une valeur très favorable à l'activité optimale (mesurée par la méthode au formol) des lombriciens au champ (MAZAUD 1979).

Il est évident que les conditions d'élevage définies plus haut sont celles initiales. L'activité des lombriciens et les apports d'aliments entraînent peu à peu une dérive dans la composition et dans la distribution des éléments de la matrice — distribution dépendant des moeurs (type d'activité) des lombriciens. Nous n'avons toutefois pas eu à renouveler les milieux d'élevage pour les types d'expériences effectuées, aucun phénomène parasite, comme la glyification artificielle dans les sols d'élevage, n'a, par exemple, été observé.

5. Conclusion

Nous possédons dorénavant un milieu standard chimiquement inerte et contrôlable permettant l'élevage des lombriciens. Hormis la taille du squelette qui devra être adaptée

pour les lombriciens de très grande taille, l'artisol semble universel ce qui n'interdit pas des adaptations, notamment par simplification pour des usages particuliers. Le milieu thermique et hydrique et l'aération sont contrôlables depuis longtemps. Un seul point reste ouvert dans la définition de l'environnement expérimental: la nourriture. Celle-ci n'est pas nécessaire pour les élevages de courte durée (étude de létalité aiguë de contaminants par exemple), elle peut requérir des normes précises et contrôlables, telle la production d'algues en conditions standards (FERRIÈRE & BOUCHÉ, en prép.) ou au contraire n'utiliser que des végétaux plus ou moins contrôlés.

La difficulté essentielle, celle d'un sol réellement artificiel, standardisable et utilisable pour des lombriciens variés, est par contre levée.

6. Produits spécifiques utilisés (fournisseurs)

- + Billes en verre noir diamètre $20 \pm 1,5$ mm: Société Preciver, 131, avenue Gambetta F - 94700 Maisons-Alfort
- + Silice précipitée hydratée amorphe «lévilite»: Rhône-Poulenc — Chimie fine, 2, rue Saint-Pierre-Le-Jeune F - 67006 Strasbourg Cédex

7. Résumé · Summary

Un milieu artificiel, permettant l'élevage des lombriciens pendant plusieurs mois, est décrit. Il est chimiquement contrôlé et inerte. Quelques applications sont indiquées.

A new implement, essential for ecophysiology and ecotoxicology: the rearing of earthworms in an artificial soil

An artificial milieu, allowing the rearing of earthworms for several months is described. It is chemically controlled and inert. Several uses are described.

8. References bibliographiques

- BOUCHÉ, M. B., 1972. Lombriciens de France. Ecologie et systématique. Ed. I.N.R.A., Ann. zool.-écol. anim., numéro spécial **72**, 2, 1—671.
- 1977. Ecologie et paraécologie; peut-on estimer la contribution de la faune du sol aux cycles des éléments biogènes? In: U. LOHM & T. PERSSON: Soil organisms as components of ecosystems. Proc. 6th int. coll. soil zool., Ecol. bull. (Stockholm), **25**, 157—163.
- 1979. Conséquences de l'apport de contaminants sur les lombriciens. I. Problèmes en cause et méthodologie. Doc. pédozool. **1**, 1, 2—22.
- L. FAYOLLE, sous presse. Contamination chimique du chaînon trophique lombricien: problèmes méthodologiques et conséquences. C. R. 3ème coll. contamination des chaînes biologiques, Paris.
- DARWIN, C. R., 1881. The formations of vegetable mould through the action of worms with observations on their habits. London 366 pp. John Murray and Co.
- FERRIÈRE, G., 1980. Fonctions des lombriciens. VII. Une méthode d'analyse de la matière organique végétale ingérée. Pedobiologia **20**, 4, 263—273.
- M. B. BOUCHÉ, en prép. Mesure de débits métaboliques d'azote et de carbone chez les lombriciens. C. R. acad. scien.
- GODRON, M., P. DAGET, G. LONG, C. SAUVAGE, L. EMBERGER, E. LE FLOC'H, J. POISSONET & J. P. WACQUANT, 1968. Code pour le relevé méthodique de la végétation du milieu. Ed. C.N.R.S., Paris, 1—292.
- JEANSON, C., 1968. Essai de pédologie expérimentale: morphologie d'un sol artificiel structuré par les lombriciens. Thèse univ., Fac. scien. 1—357.
- 1972. Etude microscopique de dépôts de fer, de manganèse et de calcium dans un sol expérimental, leur association avec des micro-organismes. Rev. écol. biol. sol **9**, 3, 479—489.
- MAZAUD, D., 1979. Evaluation de méthodes de marquage permettant le repérage des lombriciens au terrain; premières applications. Thèse docteur-ingénieur, sciences agronomiques, I. N. R. A. Paris-Grignon, Paris, 1—178 + annexes 1—80.
- ROUELLE, J., 1977. Ecologie du cycle de l'azote: dénombrement des peuplements microbiens des structures du sol (turricules et galeries) résultant de l'activité des vers de terre d'une prairie permanente. Thèse 3ème cycle, Univ. Lyon, octobre 1977.

Adresse des auteurs: Laboratoire de Zoologie du Sol, I. N. R. A., 17, rue Sully, F - 21034 Dijon, France.

The vertical distribution of cryptostigmatic mites,
soil organic matter and macroporosity
in three North Queensland rainforest soils

J. A. HOLT

With one figure

(Accepted: 15. 11. 80)

Key words: vertical distribution, Cryptostigmata, mites, organic matter, macroporosity, rainforest, Australia

Contents

1. Introduction	202
2. Field sites and methods	203
3. Results	204
3.1. Cryptostigmatid population density and size class distribution; 3.2. Organic C and M. O. M.; 3.3. Porosity; 3.4. Comparison of cryptostigmatid counts, organic C and M. O. M.	
4. Discussion	207
4.1. Organic matter; 4.2. Cryptostigmatids and porosity	
5. Summary · Zusammenfassung	208
6. Acknowledgements	208
7. References	208

1. Introduction

Most soil arthropods are found in the upper layers of soil profiles in close association with the litter and organic horizons (VAN DER DRIFT 1951; WALLWORK 1959; DAVIS 1963; WOOD 1967).

There are a number of soil conditions known to affect the distribution and abundance of soil animals. Some factors, such as organic matter content and macro-porosity remain relatively constant with time for a particular soil at a particular depth, while others such as soil water content and soil temperature show seasonal changes.

Some workers have demonstrated relationships between numbers of arthropods and soil moisture or soil temperature (VAN DER DRIFT 1951, WALLWORK 1959, LEBRUN 1971, USHEK 1975), while others (ANDERSON 1971, PLOWMAN 1979) were unable to find any such relationships. Several studies have shown evidence of seasonal vertical migrations of soil Cryptostigmata, but as discussed by MITCHELL (1978, p. 519) other studies were unable to detect any such migrations.

In a parallel study on these soils (J. A. HOLT, unpublished) it has been shown that although changes in numbers of cryptostigmatids do occur, there are no seasonal changes in the proportions of cryptostigmatids in the 0—4 cm and 4—8 cm soil layers over a period of 17 months.

Soil porosity is an important component of the environment of Cryptostigmata and affects their movements in soil profiles. HAARLØV (1960) has demonstrated a relationship between the changing percentage of soil interstices and arthropod numbers with depth, while KLIMA (1956) observed that species with relatively small breadth are most numerous in deeper soil layers. Although it is generally accepted that larger species of microarthropods are confined to the upper layers of soil where interstices are larger, the relationships between pore size and micro-arthropod size and numbers is poorly known at present.