

Contribution à l'étude de la microflore hétérotrophe de termites supérieurs à régimes alimentaires différenciés

par Alain Brauman *, Marc Labat** et Jean-louis Garcia *

RESUME

Un dénombrement de la microflore hétérotrophe du tractus digestif d'un termite supérieur xylophage, *Nasutitermes arborum*, a montré que ce termite possède une flore de 10^9 bactéries/tube digestif; cette microflore est principalement composée de bactéries fermentatives (68%). La population anaérobie stricte ne constitue que 10% de la microflore totale et les bactéries méthanogènes 1%. La mesure de l'émission comparée de méthane, chez 3 espèces, a montré une différence significative selon les régimes alimentaires; ce sont les termites humivores qui se révèlent les plus méthanogènes. Chez *Cubitermes sp.*, espèce humivore, un essai de biodégradation de monomères aromatiques caractéristiques de la ligninolyse a permis de révéler une microflore symbiotique capable de dégrader le benzoate et le syringate. Le vanilate et le ferrulate n'ont pas été métabolisés.

* Laboratoire de Microbiologie ORSTOM, Université de Provence, 3 Place Victor Hugo, 13331 Marseille Cedex 3

** Laboratoire de Microbiologie, ORSTOM, BP 181, Brazzaville, Congo

INTRODUCTION

Le termite est un insecte ubiquiste qui recouvre actuellement plus des deux tiers de la surface terrestre; il représente dans le milieu tropical, la biomasse la plus importante (9). Par ses comportements alimentaires divers, il constitue le premier assimilateur de composés ligno-cellulosiques dans ce milieu (4). Cette potentialité de dégradation est liée à la présence, dans son tractus digestif, d'une microflore symbiotique nombreuse et diversifiée (3-7).

Le rôle exact de cette microflore n'est actuellement bien connu que pour les termites inférieurs qui possèdent des flagellés cellulolytiques symbiotiques (14). Chez les termites supérieurs qui constituent 75 % des espèces connues, l'importance de cette microflore dans le processus digestif du termite n'est pas encore élucidée.

Dans ce but nos travaux ont porté, dans un premier temps, sur la quantification et la qualification globale de la flore d'un termite supérieur xylophage, *Nasutitermes arborum*.

La présence d'une microflore méthanogène chez ce termite ainsi que la mise en évidence par plusieurs auteurs, d'une importante émission de méthane par les termites (15), nous ont conduits, dans un deuxième temps, à mesurer cette émission chez différentes espèces de termites à régime alimentaire différent.

Les humivores possèdent un faible équipement polysaccharidasique (13); les polysides végétaux ne peuvent donc pas constituer l'essentiel de leur alimentation. Or, comme nous le démontrerons, ce sont les espèces qui produisent le plus de méthane. L'humus qui constitue leur substrat, est composé de nombreux polyphénols et composés monoaromatiques qui proviennent de la dégradation des tanins et de la lignine. Il était donc intéressant de chercher dans un troisième temps, à isoler des cultures mixtes bactériennes provenant de leur tractus digestif, capables de dégrader des monomères aromatiques (11) caractéristiques des produits de dégradation de la lignine.

MATERIELS ET METHODES

TECHNIQUES DE NUMERATION - Dix tubes digestifs sont disséqués stérilement, des milieux réduits spécifiques sont ensuite ensemencés avec cet inoculum finement broyé, selon les techniques classiques de l'anaérobiose (2-8).

Cette numération est basée sur deux critères :

1- la sensibilité des bactéries à l'oxygène: bactéries aérobies, anaérobies facultatives, anaérobies strictes;

2- leurs métabolismes spécifiques.

EMISSION DE METHANE PAR DES ESPECES DE TERMITES A REGIME ALIMENTAIRE DIFFERENT - 25 termites sont introduits dans un flacon de 300ml contenant 10 g de leur substrat alimentaire. Une mesure du gaz émis est effectuée toutes les 4 heures par chromatographie en phase gazeuse (5). Les résultats représentent les valeurs moyennes obtenues à partir de cinq échantillons.

MESURE DE LA DEGRADATION ANAEROBIE DES COMPOSES AROMATIQUES

Milieux - Des milieux réduits (8), contenant l'une des sources de carbone suivantes : benzoate, vanilate, ferrulate ou syringate (2,5mM), sont inoculés avec un broyat de tubes digestifs disséqués stérilement (2).

Espèces - Quatre espèces de termites ont été testées : trois humivores dont deux *Cubitermes*, l'un de forêt, l'autre de savane, et un *Thoracotermes* dont le biotope est proche de celui du *Cubitermes* de forêt ainsi qu'une espèce xylophage *Nasutitermes arborum*.

analyses - Les composés aromatiques sont dosés soit au spectrophotomètre UV à 225nm pour le benzoate et le syringate, et à 251nm pour le vanilate, soit en HPLC(5).

Les acides gras et le méthane sont mesurés par chromatographie en phase gazeuse.(8)

RESULTATS

QUANTIFICATION ET QUALIFICATION PARTIELLE DE LA MICROFLORE D'UN TERMITE SUPERIEUR *NASUTITERMES ARBORUM*

Dénombrement - Les résultats sont rassemblés dans la figure 1. Il apparaît que :

- la population totale est de l'ordre de 10^6 bactéries/tube digestif, ce qui, ramené au volume de l'intestin qui est d'environ 1 microlitre, nous donne une population de l'ordre de 10^9 bact/ml;

- ce sont les bactéries fermentatives qui constituent la microflore la plus abondante; elles représentent 68% de la microflore totale. La majorité d'entre elles (75%) fermentent le glucose;

- les bactéries anaérobies strictes ne constituent que 10% de la population totale;

- chez cette espèce, les bactéries méthanogènes ne représentent qu'une faible partie de la microflore totale (1%);

- aucune bactérie sulfato-réductrice ni cellulolytique n'a pu être mise en évidence chez cette espèce.

Comme le tube digestif du termite est souvent assimilé à un microfermenteur, il nous a paru intéressant de comparer nos résultats avec ceux obtenus, avec les mêmes techniques, à partir d'un digesteur alimenté avec un substrat cellulosique (pulpes de betterave)(12).

La flore totale est aussi abondante que celle rencontrée dans le fermenteur : 10^8 à 10^{10} bactéries/ml; la flore fermentative est également la plus nombreuse, mais, en ce qui concerne la microflore strictement anaérobie, on constate une profonde différence : en effet, cette microflore constitue 80 % de la microflore totale dans le digesteur, alors que chez le termite, elle n'en représente que 10%. Dans cette microflore, l'exemple des méthanogènes est à cet égard tout à fait représentatif: 10 % dans le digesteur, moins de 1% chez le termite.

Isolément et caractérisation des souches bactériennes -54 souches pures ont été isolées à partir des différents milieux de numération. Parmi elles, 21 sont apparues différentes lors de leur caractérisation. Selon les critères de classification du Manuel de Bergey, quatre groupes ont été distingués :

1) Bacilles sporulés du groupe II: Ils constituent la majorité des bactéries anaérobies facultatives isolées à partir des milieux non réduits. Ils ont la particularité de former de longues chaînes semblables à de longs filaments.

2) Cocci anaérobies facultatifs: Ils constituent la majorité des bactéries isolées à partir des milieux réduits. Ils sont tous fermentatifs et appartiennent au genre *Staphylococcus*.

3) Bacilles asporulés: C'est le groupe le plus hétérogène; il contient, en particulier, les actinomycètes qui, d'après les analyses en microscopie électronique(2), semblent constituer une microflore importante du tractus digestif. Des représentants des genres *Flavobacterium*, *Enterobacter* et *Lactobacillus* ont été isolés, mais ils ne semblent pas constituer une population stable.

4) Bactéries anaérobies strictes: Ce sont toutes des *Clostridium* à spore ovale terminale déformante. Leur caractérisation a permis d'identifier la plupart de ces souches comme étant des *C. bifermentans* ou des *C. Sordellii*. Ils sont tous producteurs d'acétate et généralement d'isovalérate; seule une souche fermente le glucose en propionate et acétate.

EMISSION DE METHANE PAR DES ESPECES DE TERMITES A REGIME ALIMENTAIRE DIFFERENT

Description des espèces -Trois espèces provenant de la forêt du Mayombe, située en République Populaire du Congo, ont été testées :

- *Cubitermes sp*: une des espèces humivores les plus abondantes en forêt et dont le régime alimentaire est mal connu.

- *Macrotermes mûléri*: termite champignoniste le plus représenté au niveau de la densité des nids. Il se nourrit à partir de meules colonisées par un champignon symbiotique basidiomycète (13).

- *Microcerotermes parvus* : termite xylophage, espèce rudérale dont les constructions sont fréquentes dans les arbres des villages.

Les résultats sont rassemblés dans les figures 2 et 3. La figure 2 nous montre clairement la variation importante d'émission en fonction du régime alimentaire. Ce sont les espèces humivores qui sont, dans tout les cas, les plus méthanogènes.

La comparaison de l'émission entre les individus morts et vivants au sein d'une même espèce (fig 3) nous montre que, chez les espèces humivores, les individus morts émettent deux fois moins de méthane que les animaux vivants. Par contre chez l'espèce champignonniste, nous n'avons noté aucune différence d'émission entre les individus morts et vivants.

MESURE DE LA DEGRADATION EN ANAEROBIOSE DES COMPOSES AROMATIQUES PAR DES CULTURES MIXTES PROVENANT DU TUBE DIGESTIF DES TERMITES HUMIVORES

Les résultats sont reportés dans les figures 5, 6, 7, 8 et 9.

- Sur les quatre espèces testées, seules les deux espèces humivores de forêt *Cubitermes sp.* et *Thoracotermes sp.* ont donné des résultats significatifs de dégradation du benzoate et syringate. (fig 7)

- Le vanilate n'est pas dégradé en méthane mais en un composé intermédiaire détectable en HPLC (fig 4).

- Le benzoate est dégradé en méthane et acétate alors que le syringate est majoritairement dégradé en acétate et butyrate (fig 5).

- Les temps de latence sont de l'ordre de 15 jours pour le benzoate et de 10 jours pour le syringate, puis la dégradation s'effectue entre 5 et 10 jours (fig 5 et 6).

- La dégradation de l'acide syringique est linéaire jusqu'à 5 mM (fig 8).

Des isollements de bactéries méthanogènes et cellulolytiques ont été entrepris en parallèle à partir de ces différentes espèces de termites. Ainsi, ont pu être mises en évidence :

- à partir des cultures mixtes du *Cubitermes* de forêt :

• une bactérie méthanogène du type *Methanogenium*, utilisant H_2 et CO_2

- à partir des cultures mixtes du *Cubitermes* de savane :

• une bactérie méthanogène du genre *Methanosarcina*, utilisant le méthanol ou l'acétate

- à partir du *Nasutitermes* sp. :

• trois souches de bactéries cellulolytiques isolées sur cellulose MN 300

DISCUSSION

Dénombrement et qualifications - Ce travail nous a permis de confirmer la grande hétérogénéité de la microflore de la panse du termite. La comparaison de ces résultats avec ceux déjà obtenus sur d'autres espèces montre assez peu d'homologie entre les différentes microflores (1-6-7). Seuls les staphylocoques anaérobies stricts semblent représenter une population relativement courante chez les termites supérieurs.

Les bactéries anaérobies strictes et notamment les bactéries méthanogènes ne semblent pas constituer une population importante par rapport à celle observée dans les digesteurs. L'assimilation de la panse de ce termite à un microfermenteur est donc fortement spéculative. Ces résultats sont cependant à relativiser car :

- la numération de la flore anaérobie facultative ne permet pas de différencier la flore de passage de la microflore endogène spécifique du termite, ce qui a pour conséquence globale une surestimation de cette flore par rapport à la flore totale;

- la flore symbiotique du termite a pu, également, être sous estimée pour plusieurs raisons telles que le manque de facteurs de croissance spécifiques dans les milieux de culture ou les perturbations physiologiques dues à l'élevage des insectes.

La faible densité des bactéries anaérobies strictes, notamment méthanogènes, rencontrée chez *Nasutitermes* nous a amenés à vérifier si ce résultat était lié à cette espèce ou à son type de régime alimentaire. C'est pourquoi nous avons mesuré comparativement l'émission de méthane chez différentes espèces à régimes alimentaires différents.

Emission de méthane - Ces résultats montrent que chez les espèces humivores, la flore méthanogène est étroitement dépendante des conditions physiologiques de l'hôte. Elle ne semble donc pas constituer, pour ces espèces, une simple "flore de passage".

Bien que ces résultats se doivent d'être confirmés sur un éventail plus large d'espèces, ils permettent de relativiser les affirmations selon lesquelles les termites seraient responsables de 15 à 45 % de l'émission annuelle de méthane dans l'atmosphère.

En effet, les données obtenues en laboratoire sur plusieurs espèces de termites inférieurs, ont été extrapolées par certains auteurs à l'ensemble des espèces recensées. Or nos résultats montrent que les termites supérieurs, qui ont un impact écologique essentiel en milieu tropical, émettraient, pour les espèces les plus productives, près de dix fois moins de méthane que les termites inférieurs. Cette émission semble également être fortement conditionnée par le mode de nutrition.

Dégradation des composés aromatiques - Ce sont les deux espèces les plus méthanogènes qui ont donné les meilleurs résultats de dégradation du benzoate et du syringate; il semble donc qu'il y ait une certaine corrélation entre le type de régime alimentaire et le type de bactéries rencontrées : cultures mixtes bactériennes dégradant les aromatiques chez les humivores, bactéries cellulolytiques chez le xylophage.

Les différences de dégradation entre le syringate et le benzoate s'expliquent par des différences structurelles entre ces deux composés. En effet, la dégradation du benzoate en anaérobiose est un processus consommateur d'énergie ($\Delta G^\circ = 10,8 \text{ kcal}$) (10) et ne peut devenir

exergonique que si la réaction de dégradation du benzoate est "couplée" à une réaction d'oxydation de l'hydrogène produit. Si le "consommateur d'hydrogène" est une bactérie, c'est alors un phénomène de syntrophie bactérienne basée sur le transfert interspécifique d'hydrogène. Chez les humivores étudiés ici, il semble que le rôle d'accepteur d'hydrogène soit joué par les bactéries méthanogènes. Cette syntrophie n'est plus obligatoire dans le cas du syringate, car sa dégradation en acetate et butyrate selon la stoechiométrie suivante est exergonique:

Syringate \longrightarrow 3,5 Acétate + 0,9 Butyrate + 0,5 Méthane
(calcul effectué sur une moyenne de 4 échantillons).

CONCLUSION

Les résultats présentés ne nous permettent pas de tirer des conclusions sur l'ensemble des termites, néanmoins ils nous ont permis de démontrer l'extrême hétérogénéité de la microflore de leur panse: hétérogénéité dans la nature des souches bactériennes présentes chez une espèce, hétérogénéité dans la répartition de ces souches à l'intérieur d'un même genre et selon les régimes alimentaires.

C'est pourquoi la connaissance du biotope et surtout du régime alimentaire exact du termite est un préalable indispensable à toute étude microbiologique approfondie de son tractus digestif.

REMERCIEMENTS - Ce travail a été réalisé dans le cadre du programme biodynamique des sols tropicaux (RCP N° 080765). Nous remercions plus particulièrement le Professeur J. Renoux pour l'aide qu'il nous a apportée.

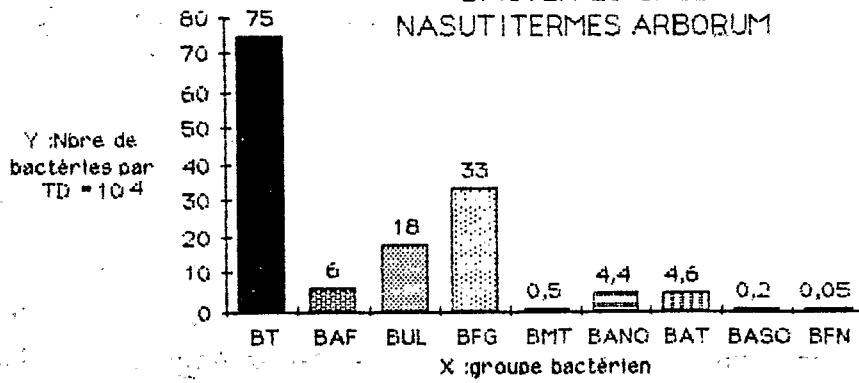
REFERENCES

- (1) BIGNELL D.E., OSKARSSON H. & ANDERSON J.M. - 1979 - Association of actinomycete-like bacteria with soil-feeding termites. *Appl. Environ. Microbiol.*, **37**, 339-342.
- (2) BRAUMAN A. - 1983 - Etude de la microflore hétérotrophe d'un termite supérieur *Nasutitermes arborum* DEA Paris XII, 110pp.
- (3) BREZNAK J.A. - 1975 - Symbiotic relationship between termites and their intestinal microbiota. In *Symbiosis*, D.H. Jennings and D.L. Lee, eds, Cambridge University Press.
- (4) BUTLER J.H.A. & BUCHERFIELD J.M. - 1979 - Digestion of lignine by termites. *Soil Biol. Biochem.*, **11**, 507-13.
- (5) CORD-RUWISCH R., OLLIVIER B. & GARCIA J.L. - 1986 - Fructose degradation by *Desulfovibrio* sp. in pure culture and in coculture with *Methanospirillum hungatei*. *Curr. Microbiol.* **13**, 285-289.

- (6) EUTICK M.L., O'BRIEN R.W. & SLAYTOR M. - 1978a - Bacteria from the gut of Australian termites. *App. Environ. Microbiol.*, **35**, 823-828.
- (7) EUTICK M.L., VEIVERS P., O'BRIEN R.W. & SLAYTOR M. - 1978 b - Dependence of the higher termite *Nasutitermes exitiosus* and the lower termite *Coptotermes lacteus* on their gut flora. *J. Insect. Physiol.*, **24**, 363-368.
- (8) GARCIA J.L., GUYOT J.P., OLLIVIER B., TRAD M. & PAYCHENG C. - 1982 - Ecologie microbienne de la digestion anaérobie. Techniques de numération et d'isolement. *Cah. O R S T O M., sér. Biol.*, **45**, 3-15.
- (9) LEE K. & WOOD T.J. - 1971 - *Termites and Soils* Academic Press. New York
- (10) FERRY R.S. - 1976 - Anaerobic degradation of benzoate to methane by a microbial consortium. *Arch. Microbiol.* **107**, 33-40.
- (11) KAISER J.P. & HANSELMANN. K.W. - 1982 - Aromatic chemicals through anaerobic microbial conversion of lignin monomers. *Experientia*. **38**
- (12) LABAT M. & GARCIA. J.L. - 1986 - Study on the development of methanogenic microflora during anaerobic digestion of sugar beet pulp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 163-68.
- (13) ROULAND C. - 1986 - Contribution a l'étude des osidases digestives de plusieurs espèces de termites africains. Thèse d'état, Université de créteil Paris XII.
- (14) YAMIN M.A. & TRAGER W. - 1979 - Cellulolytic activity of axenically-cultivated termite flagellate *Trichomitopsis termopsidis*. *J. Gen. Microbiol.*, **113**, 417-420.
- (15) ZIMMERMANN P.R., GRENNBERG J.P., WANDIGA S.O. & CRUTZEN P.J. - 1982 - termite: a potentially large source of atmospheric methane, carbon dioxide and molecular hydrogen. *Science*, **218**, 563-565.

FIG 1

NUMERATION DES BACTERIES CHEZ NASUTITERMES ARBORUM



BT: Bact totales
 BAF: Bact anaérobies facultatives
 BFS: Bact Fermentant le glucose
 BMT: Bact méthanogènes totales
 BAT: Bact anaérobies totales
 BUL: Bact utilisant le lactate
 BANOS: Bact anaérobies non O₂ sensible
 BASOS: Bact anaérobies O₂ sensible
 BFN: Bact fixatrices totales

FIG 2

MESURE COMPAREE DE L'EMISSION DE METHANE

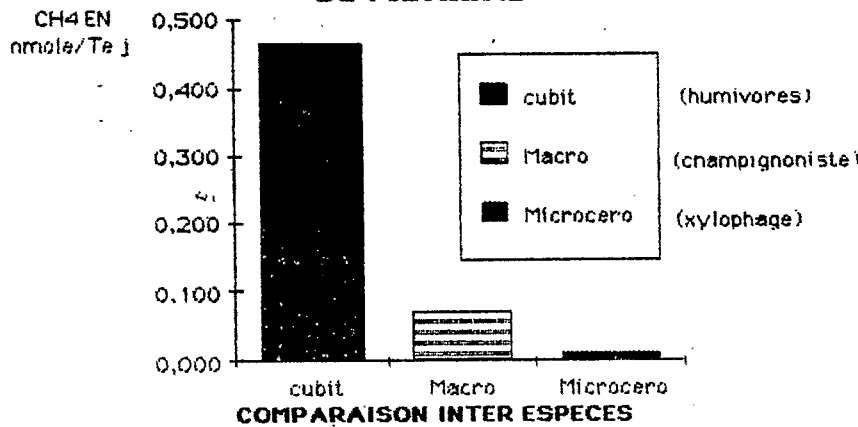
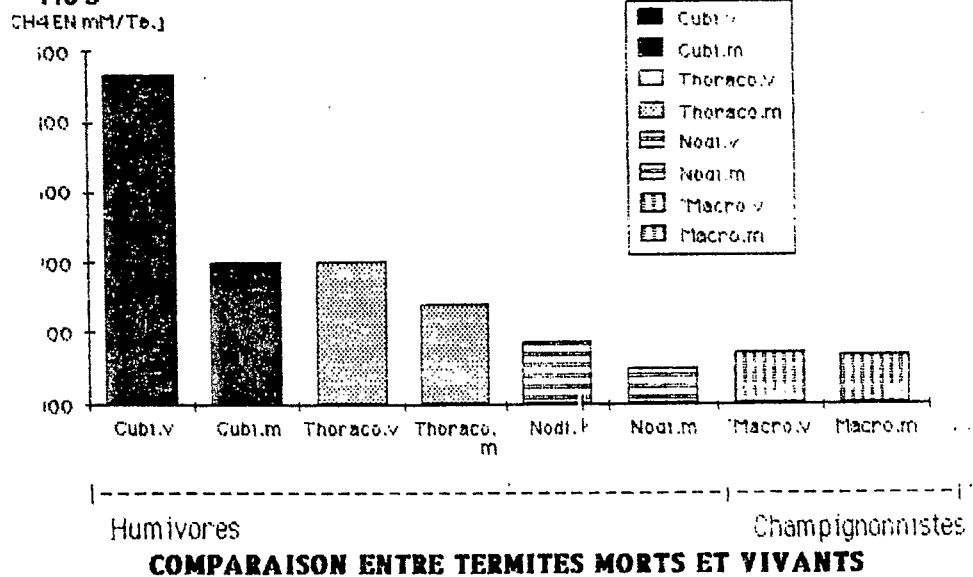
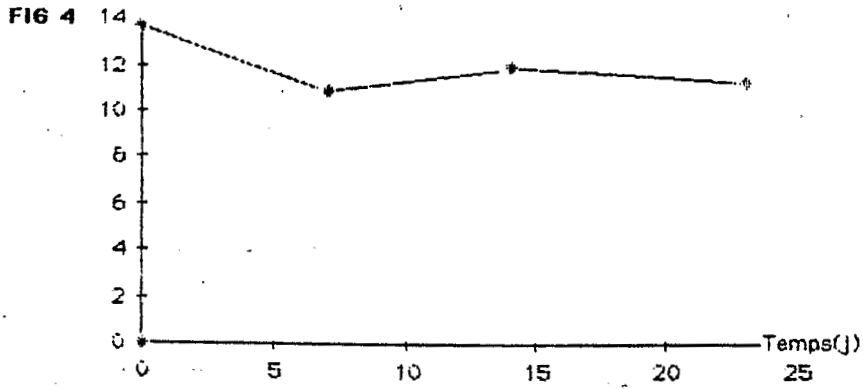


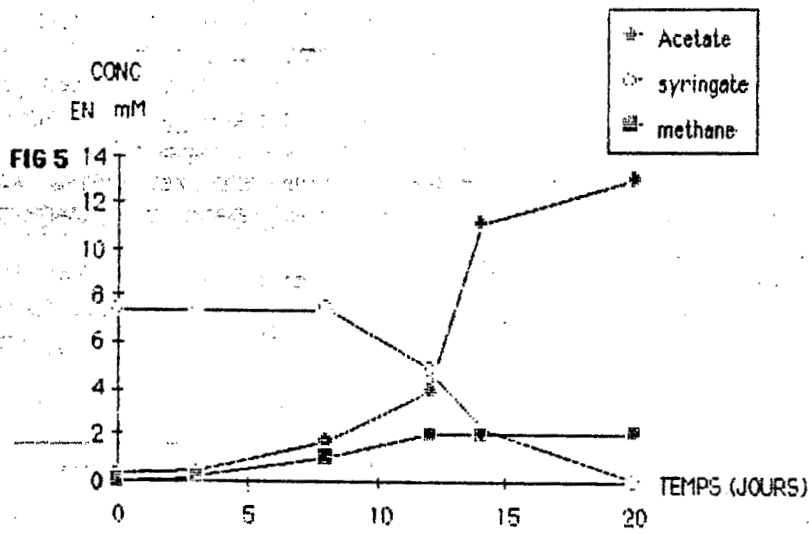
FIG 3



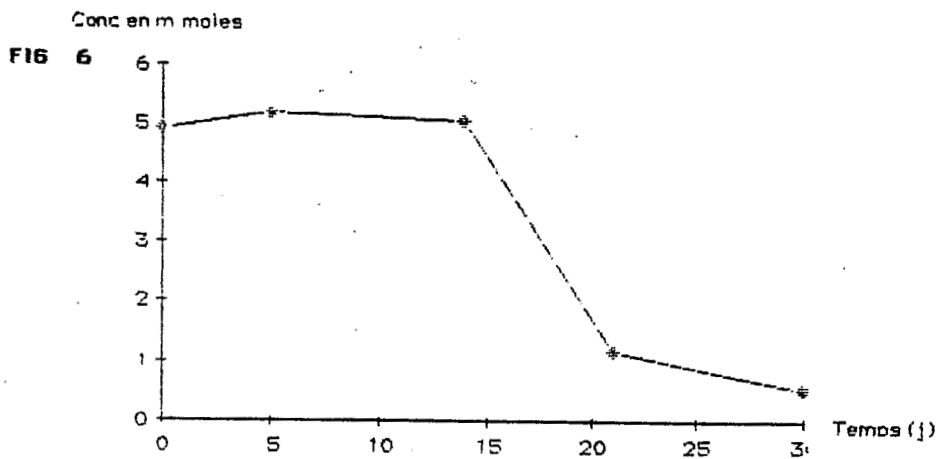
CONC (m.moles)



CINETIQUE DE DEGRADATION DU VANILLATE

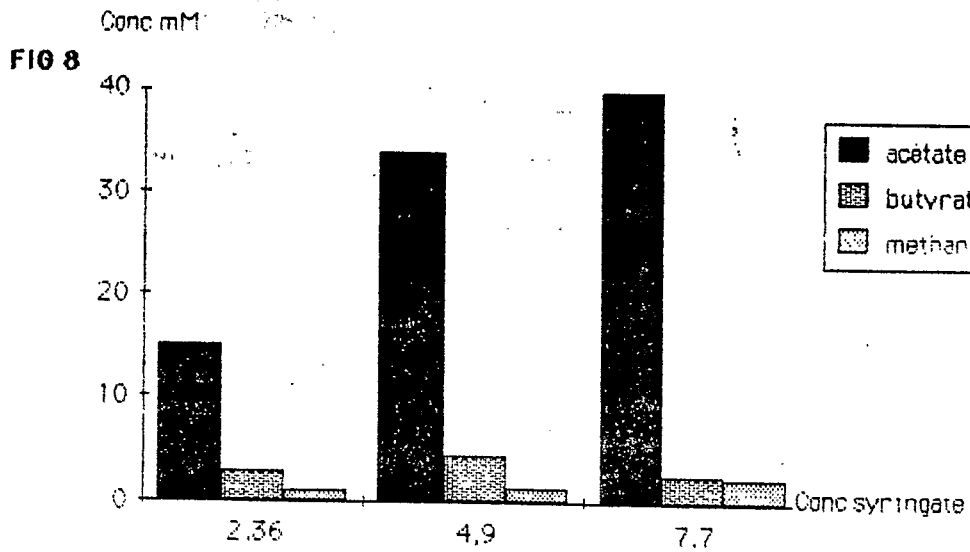
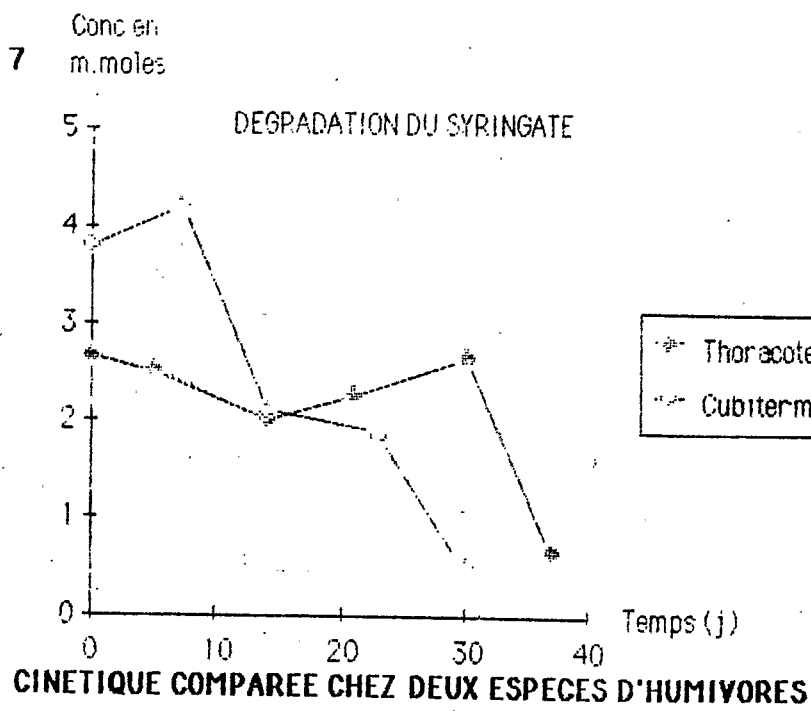


CINETIQUE DE DEGRADATION DU SYRINGATE



CINETIQUE DE DEGRADATION DU BENZOATE

FIG 7 Conc en
m.moles

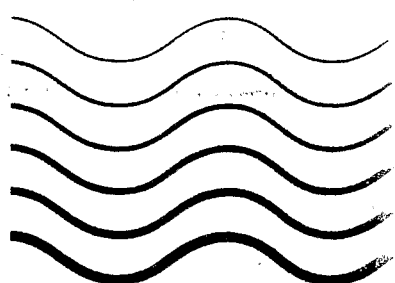
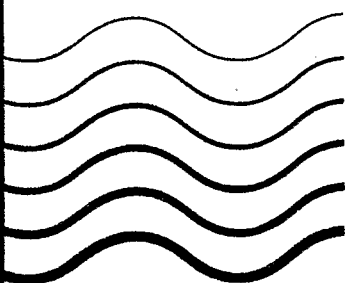


DEPARTEMENT D'HYDROBIOLOGIE

BULLETIN SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE

MICROBIOLOGIE DES ORGANISMES
ANIMAUX POECILOTHERMES
(Paris, 25 Novembre 1986)

Organisateurs :
R. LESEL (+)
J. FLANZY (++)
Juin 1987 n° 22



inra

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

18 JAN. 1989

ORSTOM Fonds Documentaire
N° : 25.480 ep1
Cote : B M P55