

D.E.A DE BIOTECHNOLOGIE

OPTION MICROBIOLOGIE

ANNÉE 1982 - 1983

ETUDE DE LA MICROFLORE HETEROTROPHE
D'UN TERMITE SUPERIEUR NASUTITERMES ARBORUM
(TERMIDAE NASUTITERMITINAE - SMEATHMAN)

D.E.A effectué par Alain BRAUMAN, sous la Direction de Monsieur
Le Professeur THOMAS, du Laboratoire de Biotechnologie de l'UTC
de COMPIEGNE.

Stage effectué sous la Direction de Monsieur J.L GARCIA, du
Laboratoire de Microbiologie de l'ORSTOM de l'Université de PROVENCE,
et de Monsieur Le Professeur RENOUX, du Laboratoire de Biologie des
Populations de l'Université PARIS XII.

R E S U M E

Une numération et une qualification partielle des bactéries du tractus digestif de Nasutitermes arborum (termitidae) ont été entreprises à l'aide de techniques permettant l'isolement de bactéries anaérobies strictes. Parallèlement à ce travail une observation in situ de la panse au M.E.B. et au M.E.T. a été effectuée. Le M.E.B. a révélé une importante flore filamenteuse composée de champignons et d'actinomycètes entremêlés au bol alimentaire, ainsi qu'une flore bactérienne pléïmorphe au voisinage de la paroi. Le M.E.T. nous a permis de différencier 5 morphotypes bactériens caractéristiques dont des spirochètes. On a dénombré $7,5 \cdot 10^5$ bactéries/tube digestif de termite, composées principalement de bactéries fermentatives anaérobies facultatives. Les bactéries anaérobies strictes constituent 38 % de la flore dénombrée. Les spirochètes, présents seulement en culture mixte, n'ont pu être dénombrés. Aucune croissance de bactéries cellulolytiques n'a pu être observée. La majorité de la population anaérobie facultative est composée de staphylocoques, streptocoques, bacillus, ainsi que d'Enterobacters, Flavobacteriums, Lactobacillus en moindre nombre. La quasi-totalité des anaérobies strictes sont des Clostridiums.

TABLE DES MATIERES

Pages

=====

INTRODUCTION	1
PREMIERE PARTIE - REVUE BIBLIOGRAPHIQUE SUR LA SYMBIOSE CHEZ LE TERMITE	
1. NOTIONS GENERALES SUR LES TERMITES	3
2. LES SYMBIONTES INTESTINAUX DES TERMITES	7
3. ROLES DES BACTERIES DANS LE METABOLISME DU TERMITE	11
4. CONCLUSION	20
DEUXIEME PARTIE - PARTIE EXPERIMENTALE	
PARTIE EXPERIMENTALE 1 : Observation <u>in situ</u> au microscope électronique des populations symbiotiques de la panse du termite <u>Nasutitermes arborum</u> .	
INTRODUCTION	23
1. TECHNIQUE ET MATERIEL DE LA MICROSCOPIE ELECTRONIQUE	26
1.1. Microscope à balayage	26
1.2. Microscope à transmission	27
2. RESULTAT	28
2.1. Microscope à balayage	28
2.2. Microscope à transmission	32
PARTIE EXPERIMENTALE 2 : Quantification et qualification partielle des bactéries symbiotiques du termite <u>Nasutitermes arborum</u>	
INTRODUCTION	38
1. APERCU SUR LES POPULATIONS IMPLIQUEES DANS LA METHANOGENESE	39
2. TECHNIQUES DE BASE DE L'ANAEROBIOSE	41
3. TECHNIQUE DE NUMERATION	49
4. ISOLEMENT DES SOUCHES BACTERIENNES	57
5. ETUDES DES SOUCHES BACTERIENNES ISOLEES	58
6. RESULTATS	59
CONCLUSION ET DISCUSSION	77
BIBLIOGRAPHIE	81
ANNEXES	93

I N T R O D U C T I O N

Le termite est surtout connu et appréhendé comme étant un insecte destructeur. Son rôle dans la bioconversion est pourtant primordial, notamment en milieu tropical, où il constitue une des biomasses les plus importantes. Dans le cadre d'un programme "Biodynamique des sols tropicaux", il était nécessaire de connaître l'importance du termite dans le processus d'humification. Les possibilités de digestion de la matière organique et notamment de la cellulose sont étroitement liées chez le termite à sa flore bactérienne associée. Le rôle de cette flore est encore mal connu chez les termites supérieurs (qui constituent 75 % des termites). Notre étude a donc porté sur la quantification et la qualification partielle, ainsi que sur l'analyse in situ de la microflore associée chez un termite supérieur, Nasutitermes arborum. Cette espèce, facile à élever, fait actuellement l'objet d'une étude biochimique, portant sur ses enzymes digestives, au Laboratoire de Zoologie de l'Université de Dijon dirigé par Monsieur Noirot. L'étude microbiologique réalisée ici est donc le complément indispensable à toute analyse de la digestion des termites.

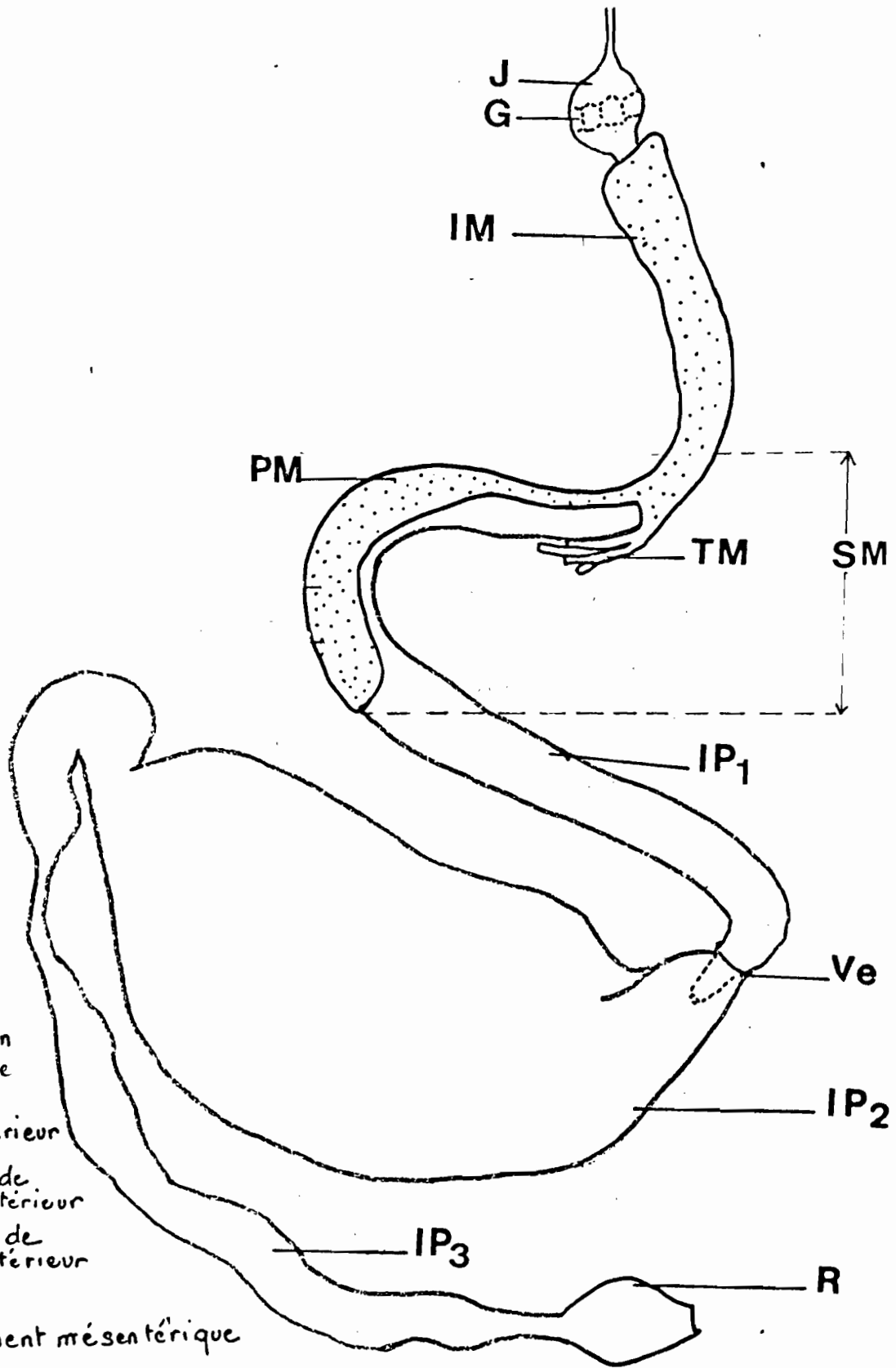
TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

PREMIERE PARTIE - REVUE BIBLIOGRAPHIQUE SUR LA SYMBIOSE CHEZ LE TERMITE

1. NOTIONS GENERALES SUR LES TERMITES	p 1
1.1. Biologie des termites	3
1.2. Tube digestif et nutrition chez termite	4
1.2.1. Anatomie du tube digestif des termites	
1.2.2. Conditions physico-chimiques dans le tube digestif	
1.2.2.1. Potentiel d'oxydo-réduction	
1.2.2.2. pH	
2. LES SYMBIONTES INTESTINAUX DES TERMITES	7
2.1. Les protozoaires	7
2.2. Les champignons	8
2.3. Les bactéries	8
2.3.1. Introduction	
2.3.2. Bactéries du segment mixte	
2.3.3. Bactéries du tube digestif postérieur	
2.3.4. Cas particulier des spirochètes	
3. ROLE DES BACTERIES DANS LE METABOLISME DU TERMITE	11
3.1. Rôle dans le métabolisme de la cellulose	11
3.1.1. Aperçu sur l'hydrolyse enzymatique de la cellulose	
3.1.2. Rôle des bactéries	
3.1.2.1. Chez les termites inférieurs	
3.1.2.2. Chez les termites supérieurs	
3.2. Rôle dans le métabolisme de l'azote	13
3.2.1. Rôle dans la fixation de l'azote	
3.2.2. Rôle dans le recyclage de l'azote	
3.2.3. Rôle dans le métabolisme des acides aminés	
3.3. Rôle dans le métabolisme de la lignine	17
3.4. Rôle dans l'émission du méthane	18
4. CONCLUSION	20

FIG. I



G. Gésier

IM. Intestin moyen

SM. Segment mixte

IP₁. 1^{er} segment de l'intestin postérieur

IP₂. 2^{ème} segment de l'intestin postérieur

IP₃. 3^{ème} segment de l'intestin postérieur

J. Jabot

PM. Prolongement mésentérique

R. Rectum

TM. Tubes de Malpighi

Ve. Valvule entérique

1. NOTIONS GENERALES SUR LES TERMITES.

1.1. Biologie des termites

Les termites sont des insectes sociaux appartenant à l'ordre des Isoptères. Ils sont caractérisés par :

- . un mode de vie en société,
- . le développement de castes distinctes au sein de la colonie,
- . des métamorphoses incomplètes (hétérométabolisme paurométabole),
- . une nutrition à base de cellulose, hémicellulose et lignine.

La pauvreté de leur alimentation en azote en fait des oligotrophes.

Il y a plus de 20 000 espèces de termites vivant essentiellement dans les régions chaudes, réparties en six familles dont deux appartiennent aux termites inférieurs; ces termites possèdent dans leur tube digestif une faune unique de protozoaires flagellés (Oxymonad, Trichomonad) qui sont capables de digérer le bois et vivent en symbiose étroite avec le termite (12) (56). La 6ème famille, celle des Termitidae ou termites supérieurs, famille à laquelle appartient l'espèce étudiée (Nasutitermes arborum) dans ce travail comprend 75% des espèces. Les protozoaires sont, quand ils existent, en nombre limité et ne comprennent pas d'espèces xylophages. Cette famille possède par contre une flore bactérienne importante dont le rôle dans le métabolisme énergétique du termite n'est pas complètement élucidé.

Une des principales caractéristiques des termites est de posséder des castes morphologiquement et fonctionnellement distinctes (57) (32).

Ces castes peuvent être divisées en deux groupes principaux :

- . les individus stériles,
- . les individus reproducteurs.

Les éléments les plus importants des castes stériles sont les soldats et les ouvriers ; ces derniers sont responsables de la construction du nid et de l'alimentation des autres membres de la colonie (soldats, sexués, larves, couple royal)

Ils assument cette tâche soit par la régurgitation d'aliments prédigérés (alimentation stomodéale), soit par des aliments provenant de l'intestin postérieur (origine proctodéale).

Ces phénomènes sont regroupés sous le nom de trophallaxie.²⁽¹⁾

Les ouvriers constituent la caste la plus nombreuse.

Les termites sont généralement connus par les désastres qu'ils engendrent, mais on méconnaît leur importance

écologique. Leur répartition géographique étendue sur plus des deux tiers des continents et leur type d'alimentation font qu'ils constituent un maillon important dans la décomposition du sol dans notre biosphère. Les termites sont particulièrement abondants en forêt tropicale humide, sempervirente ou semi-décidue où leur rôle semble considérable dans le recyclage de la litière et la dégradation de la biomasse végétale. Mais les mécanismes utilisés sont très mal connus.

Dans les savanes tropicales, la décomposition des tissus végétaux par les termites est du même ordre que celles occasionnées par les herbivores, à cause de l'importance de leur biomasse (10 à 20 g/m³) (14).

1.2. Tube digestif et nutrition chez le termite supérieur

----- 1.2.1. Anatomie du tube digestif des termites (cf. schéma 1)

Le tube digestif des termites est composé de trois parties :
(32) (44) (12).

- . Le tube digestif antérieur ou stomodeum d'origine ectodermique comprend l'oesophage, le jabot musculaire et le gésier. Il se termine par la valve oesophagienne et assure principalement la digestion mécanique des aliments.
- . Le tube digestif moyen ou mésentéron d'origine endodermique : il se compose d'un tube cylindrique et se termine par la valve proctodéale point d'attache des tubes de Malpighi. Il est le principal responsable de la digestion enzymatique des aliments (59) (25).
- . Tube digestif postérieur ou proctodeum d'origine ectodermique : il est composé de trois segments :
 - a) segment P1 : relativement vaste, il se termine par la valve entérique qui empêche le reflux du bol alimentaire.

b) segment P2 : très volumineux, c'est la panse qui abrite la majorité de la microflore et de la microfaune du termite.

c) segment P3 : généralement assez long, il se termine par le rectum.

Chez le termite, la morphologie du tube digestif varie avec le type d'alimentation. Certains termites supérieurs possèdent une structure particulière située à la jonction du tube digestif moyen et postérieur, le segment mixte. Il doit son nom au fait qu'une de ses faces est constituée par la paroi du mésenteron et l'autre par l'épithélium proctodeal. Dans cette région existe une poche, constituée par un repli du mésentéron, (44) dans laquelle vivent des bactéries qui ont l'apparence d'une culture pure. Ces bactéries sont complètement isolées du bol alimentaire (43).

1.2.2. Conditions physico-chimiques dans le tube digestif

1.2.2.1. Potentiel d'oxydo-réduction

Il est généralement admis que l'atmosphère du tube digestif est anaérobie. Plusieurs faits viennent appuyer cette hypothèse :

- . la grande sensibilité des protozoaires et des bactéries symbiotiques vis-à-vis de l'oxygène (17) (79) (38)
- . les produits finaux qui existent dans le tube digestif postérieur sont l'hydrogène et l'acétate (33) (38). qui sont les principaux produits issus de la fermentation des sucres.
- . l'émission de méthane mesuré in situ chez les termites (15) (87) (70).

La mesure du potentiel redox chez plus de neuf espèces de termites, à l'aide d'indicateurs colorés (81) (22) a montré que le tube digestif antérieur était aérobie ($E' \approx 100$ mV) mais que chez la grande majorité des espèces étudiées, les tubes digestifs postérieurs étaient, avec un potentiel compris entre - 230 et - 270 mV, strictement anaérobies.

1.2.2.2. pH

La mesure du pH des différentes sections du tube digestif

(41) (60) a montré que : . le tube digestif moyen a un voisin de la neutralité,

. le tube postérieur a un pH compris entre 6 et 7,5, hormis les espèces humivores qui ont un pH plus alcalin.

Les conditions physico-chimiques existant dans le proctodeum sont favorables à la croissance de nombreux microorganismes anaérobies dont la moyenne de tolérance vis-à-vis du pH se situe entre 6 et 9.

1.2.3. Nutrition chez les termites supérieurs

Les termites supérieurs se nourrissent préférentiellement de bois partiellement dégradé par les champignons. Ils se nourrissent également de feuilles et d'humus. L'absorption des aliments commence dès le tube digestif moyen où elle se limite à des composés solubles ou facilement hydrolysables du bol alimentaire. C'est au niveau du tube digestif postérieur qui possède un épithélium très mince qu'elle est la plus importante (12). On pense que la digestion chez le termite est assez voisine de celle des ruminants dont le processus dominant est la digestion microbienne. (38)

Le temps de rétention du bol alimentaire dans la panse est compris entre 8 et 12 heures, ce qui correspond à la moitié de la durée du transit intestinal (42).

Les termites ont une efficacité digestive (carbone ingéré - carbone dans les fèces) très importante, généralement supérieure à 60 % (14) avec pour la cellulose des taux pouvant avoisiner 90 %. Ces taux sont quasiment uniques dans le monde animal.

Le fait que la plus grande partie de la dégradation et l'absorption des aliments ait lieu dans la panse, où il y a peu d'enzymes endogènes sécrétés conduit à penser que la microflore symbiotique qui l'habite joue un rôle primordial dans la digestion chez le termite.

2. LES SYMBIOTES INTESTINAUX

2.1 Les protozoaires

Dès les premières études sur la symbiose chez les termites inférieurs on a mis en évidence l'existence de protozoaires qui constituent une faune importante et spécifique de leur tractus digestif (17)

Toutes les espèces connues ont été inventoriées par Yamin 1979 (84). On sait maintenant quelles sont strictement anaérobies (52) (25) et sont en grande partie responsables de la cellulolyse chez les termites inférieurs. Les protozoaires ne peuvent se développer qu'en présence de symbiotes endo- ou/et ectosymbiotiques.

Les champignons

Les champignons ont été trouvés dans le tube digestif des termites mais ils ne semblent pas contribuer significativement à la digestion de la cellulose (36). L'absorption de fongicides par un termite supérieur *Nasutitermes exitiosus* (23) ne modifie pas sa durée de vie. Il semble donc que les champignons ne soient que des organismes transitoires chez le termite. Il faut signaler le cas des termites champignonnistes, comme *Macrotermes natalensis*, qui cultive des champignons spécifiques dont l'ingestion leur facilite l'assimilation de la cellulose (51).

Les bactéries

2.3.1. Introduction

La flore intestinale du termite se répartit dans le tube digestif en partie dans le segment mixte, mais sa grande majorité colonise le tube digestif postérieur au niveau de la panse. L'étude anatomique nous révèle que la flore intestinale varie considérablement suivant le segment considéré mais que la composition et la densité de cette flore paraît constante d'un individu à un autre dans un segment donné (56).

Malgré le nombre important d'espèces de termites, l'analyse quantitative et qualitative de cette flore chez les termites supérieurs n'a été que peu étudiée. En outre, peu de chercheurs ont utilisés dans cette quantification les techniques d'anaérobie stricte. Ces études ont permis néanmoins de montrer une grande diversité d'espèces bactériennes et leur exceptionnelle densité. Dans bien des cas, la densité bactérienne est telle qu'elle forme la majeure partie du contenu intestinal de la panse.

2.3.2. Bactéries du segment mixte

Dans cette partie de l'intestin qui n'existe que chez certains

termite supérieurs, existent des bactéries en grande densité qui ont l'apparence d'une culture pure (56). Suivant les espèces de termites, leur forme est très variée ; elle peut aller du court bâtonnet aux longs filaments flexueux, mais il n'existe qu'une seule forme bactérienne par termite. Cet amas bactérien est isolé du bol alimentaire (cf. 121). A cet endroit, le bol alimentaire est encore entouré d'une membrane péritrophique et le transit est rapide. Le rôle de ces bactéries dans la digestion semble donc limité.

2.3.3. Bactéries du tube digestif postérieur

Peu de bactéries semblent habiter le premier segment du proctodeum en règle générale ; cette première partie est souvent très courte (Ex : Nasutitermes). En revanche, dès la barrière de la valvule entérique passée, la densité de la microflore change radicalement. Autour de la valvule, on observe une pullulation extraordinaire de bactéries (56). Cette densité microbienne semble diminuer quand on s'éloigne de cette valvule.

En dépit du fait que la panse est anaérobie (47) (28) (73), la densité des microorganismes varie entre 10^5 et 10^9 /tube digestif. Le volume interne du tube digestif avoisinant le microlitre, cela implique qu'il y a entre 10^8 et 10^{10} bactéries/tube digestif (73). Il est intéressant de constater que ces chiffres sont similaires à ceux rencontrés dans les fermenteurs de type industriel (30). Il faut souligner que les bactéries adhèrent fortement aux parois du tube digestif (7) (13) et sont souvent sous forme d'agrégats. La quantification est alors étroitement dépendante de la manière d'homogénéiser les préparations. C'est pourquoi Schultz et Breznack ont estimé qu'on ne recouvrait actuellement que 13 % de la flore totale.

Les organismes isolés par ces auteurs à partir d'un termite xylophage (Reticulitermes flavipes) étaient en majorité des streptocoques (66,6 %) des Bacteroides anaérobies oxygène tolérant et des entérobactéries, le reste de la population étant constitué de Lactobacillus et Fusobacterium (73). Chez Nasutitermes exitiosus, la population principale est constituée de staphylocoques et streptocoques. (23)

La majorité des espèces isolées sont donc des bactéries hétérotrophes acidifiantes anaérobies facultatives. Ces mêmes auteurs ont pu mettre en évidence (74) une symbiose

entre un streptocoque et un Bacteroides qui constituent la flore principale du termite Reticulitermes flavipes. En coculture, le streptocoque produisait du lactate à partir du glucose; ce lactate produit permettant la croissance des Bacteroides qui le fermentaient en propionate, acétate et CO₂. Ce type de nutrition qu'on qualifie de "nutrition croisée" entre deux espèces pourrait constituer l'un des aspects de la fermentation totale in vivo (14).

La spécificité de cette microflore vis-à-vis du termite a été démontrée par plusieurs auteurs (47) (77) (73) (23). Ils ont collecté les mêmes espèces de termites à différents endroits et ont montré qu'ils possédaient la même microflore. Ceci indique donc qu'il existe une sélection s'opérant dans le tractus digestif et pouvant influencer les bactéries qui y résident.

La nature strictement anaérobie de la panse implique que les bactéries aérobies strictes trouvées ne font pas partie de la flore autochtone, mais sont probablement des bactéries "en transit" ingérées par le termite, ou provenant d'autres parties du tube digestif, ou bien des contaminants de la surface externe du termite.

Une des particularités de la microflore du termite est la présence, surtout chez les termites humivores, des bactéries filamenteuses. Ces bactéries ont été identifiées comme étant des actinomycètes (7); elles constituent du fait de leur densité un véritable filtre bactérien du bol alimentaire. Cette microflore du termite humivore serait protégée de celle du bol alimentaire par le pH fortement basique (pH = 11) du premier segment proctodeal. Le rôle de ces bactéries est encore inconnu.

2.3.4. Cas particulier des spirochètes

Les spirochètes constituent un groupe bactérien très reconnaissable par leur aspect ondulé et torsadé, leurs flagelles axiaux et les mouvements spiralés de leurs déplacements. Ils sont particulièrement abondants dans la panse de nombreux termites quand les tubes digestifs sont vus microscopiquement sous forme de frottis. Ils peuvent exister à l'état libre et isolés dans la lumière du tube digestif ou liés à des protozoaires (10) (60).

L'étude de leur rôle chez les termites est limité par le fait qu'on n'a jamais pu les isoler.

O'Brien et al (60) ont réussi à les garder pendant 72 heures dans une culture mixte dans des conditions

d'anaérobiose stricte. Cependant des expériences de défaunation spécifique des spirochètes, menées sur Nasutitermes exitiosus nourris avec du métronidazole ou exposés à de l'oxygène pur ont montré une baisse drastique de la durée de vie du termite qui se réduisait de 250 à 13 jours, les autres bactéries anaérobies facultatives n'étant pas affectées par ce traitement. Les auteurs affirment ne pas avoir pu isoler d'anaérobies strictes chez ce termite (23) (55). Ce dernier ne possédant pas de flagellés symbiotiques, les spirochètes semblent donc jouer un rôle important dans le métabolisme lorsque les flagellés sont absents.

Dans un seul cas, on a pu montrer le rôle des spirochètes chez Mixotripha paradoxa, flagellé symbiotique d'un termite inférieur (Mastotermes darwiniensis). Cleveland et Grunstones (19) ont montré que sa surface était entourée par une ciliature de spirochètes et de bacilles, la coordination des ondulations des spirochètes permettant la locomotion du protozoaire à travers le bol alimentaire.

3. ROLE DES BACTERIES DANS LE METABOLISME DU TERMITE

3.1. Rôle dans le métabolisme de la cellulose

3.1.1. Aperçu sur l'hydrolyse enzymatique de la cellulose

L'hydrolyse enzymatique de la cellulose implique l'action de deux types de cellulases

- . La 1-4 β -D glucan 4 glucanohydrolase cellulase de type C₁.
- . Endoglucanase (3-2, 1-4) : cellulase de type C_x.

La première est active sur la cellulose cristalline alors que la deuxième l'est contre les composés solubles de la cellulose tel que la carboxyméthylcellulose. L'action de ces deux enzymes est complétée par la cellobiase ou β glucosidase qui hydrolyse la cellobiose en deux molécules de glucoses.

3.1.2. Rôle des bactéries

La cellulose étant le principal aliment des termites, il était normal que la grande majorité des études sur la microflore du termite se soit orientée vers son rôle dans la digestion cellulolytique.

Cellulose et hémicellulose subissent selon les espèces une dégradation importante de l'ordre de 65 à 90 % (21). Leur taux d'assimilation chez les termites xylophages est élevé; il s'étend selon les espèces de 51 à 93 %.

3.1.2.1. Chez les termites inférieurs

La dégradation de la cellulose est assurée à 70 % par les protozoaires symbiotiques. Ils transforment la cellulose par voie fermentative en CO₂, H₂ et acétate. Ce dernier est utilisé comme substrat énergétique par le termite et comme précurseur de la synthèse de ses acides aminés. (53) (38). Grâce aux travaux récents de Yamin (85) qui a réussi des cultures axéniques de protozoaires, on a pu montrer que c'était bien le protozoaire et non les bactéries endosymbiotiques qui étaient responsables de la cellulolyse.

3.1.2.2. Chez les termites supérieurs

Dans cette famille de termite, le rôle des bactéries est encore très controversé. En effet, seuls quelques auteurs ont isolé des bactéries cellulolytiques (48) (49). Notamment Thayer (78) a isolé Bacillus cereus et Serrattia marcescens, toutes deux capables d'oxyder la carboxyméthylcellulose en sucres réducteurs. Mais en majorité les essais d'isolements des bactéries cellulolytiques se seront souvent révélés négatifs (17) (36) (73) ; ceux qui les ont isolés sont également souvent non explicites sur leur méthode de stérilisation de la surface du termite (28). Quand les essais d'isolements furent positifs, aucune quantification et identification ne furent entreprises. L'isolement des bactéries cellulolytiques se heurte au problème de mise en culture. En effet, la digestion de la cellulose par des bactéries isolées est un processus lent qui peut s'étaler de quelques semaines à plusieurs mois. Les expériences (59) menées sur Nasutitermes exitiosus permettent de dégager deux points importants :

- a) Les expériences de défaunation des termites réalisées par l'emploi d'antibiotiques ont montré qu'elles avaient peu d'effet sur le métabolisme de la cellulose. Chez ces termites les bactéries jouent donc dans ce processus un rôle mineur.

b) Des mesures de distribution des carbohydrases dans le tractus digestif ont montré que :

- . La grande majorité de la cellulase Cx se situait dans le tube digestif moyen (59 %), le tube digestif postérieur n'en possédant que 8 %.
- . L'activité de la cellobiase se répartit chez Nasutitermes essentiellement dans le tube digestif moyen (93 à 97 %).

Ces termites, dont le tube digestif moyen est dépourvu de bactéries, possèdent donc un système d'enzymes cellulolytiques endogène.

Si l'ensemble des travaux sur les termites supérieurs ont montré une prédominance du tube digestif moyen dans la sécrétion des carbohydrases (80) (25) (71) (82) (45). Il faut cependant tempérer ces affirmations, car la plupart des chercheurs ont utilisé pour leurs études la forme soluble de la cellulose, la carboxyméthylcellulose. Ils n'ont de ce fait pas pu mesurer l'activité de la cellulase C1. Chez un terme supérieur, seul un rapport a montré qu'elle existe (67).

Ces auteurs émettent l'hypothèse d'une possible production mixte des cellulases par les bactéries symbiotiques (C1 cellulase) et le terme (Cx cellulase).

Ainsi l'évolution phyllogénique des termites qui est marquée par la disparition des flagellés symbiotiques semble s'accompagner de l'acquisition d'enzymes endogènes permettant la digestion cellulolytique. Le rôle de la flore dans ce processus reste encore à préciser.

3.2. Métabolisme de l'azote

----- 3.2.1. Rôle dans la fixation de l'azote.

L'oligonitrophie des termites est particulièrement apparente pour les espèces se nourrissant à partir du bois qui contient 0,2 à 0,3 % d'azote (20) (12). Pourtant les termites possèdent un rapport C/N semblable à celui des insectes, en général, de 10 à 20 %. Il est donc apparu intuitivement que les termites devaient posséder un système efficace pour acquérir et conserver leur azote.

C'est grâce à la technique de mise en évidence de la fixation de l'azote par la réduction d'acétylène en éthylène (85) qu'on a pu montrer que certains termites étaient capables de fixer l'azote. Les mêmes auteurs ont montré que l'intestin postérieur était impliqué dans ce phénomène. Quand on nourrit le termite Nasutitermes exitiosus avec des antibiotiques, la capacité de fixation est perdue (23) (15) (55). O'Brien et al (55) ont mesuré l'activité de trois enzymes, deux aminotransférases et une glutamate déshydrogénase, lorsqu'on soumettait deux espèces de termites, une supérieure (N.exitiosus) l'autre inférieure (Coptotermes lacteus) à une défaustration aux antibiotiques. Sur les trois enzymes seule la glutamate-déshydrogénase est affectée par les variations de la microflore du tractus digestif. Les auteurs ont montré que l'activité de cette enzyme est directement liée chez le termite inférieur à la disparition spécifique des protozoaires et des spirochètes.

Des essais d'isolement sur Coptotermes formosanus (termite inférieur) ont permis d'identifier les bactéries fixatrices comme appartenant aux entérobactéries (62). Ces bactéries sont anaérobies facultatives mais la fixation de l'azote est inhibée par l'oxygène. Le nombre d'Enterobacter agglomerans était insuffisant pour rendre compte du taux de fixation de l'azote par les tubes digestifs intacts. Les auteurs l'attribuent au manque de dispersion des agrégats bactériens au cours de l'homogénéisation du tube digestif ou à la sensibilité de la nitrogénase bactérienne. D'autres tentatives d'isolement chez d'autres espèces ont abouti à des résultats identiques (24). On a pu isoler notamment chez trois espèces de termites des Citrobacter freundii (29). On peut noter que les entérobactéries isolées à partir de C.lacteus étaient NADP+ dépendantes pour la glutamate-déshydrogénase alors que celles mesurées in vivo étaient NAD+ dépendantes (55).

Un fait important est la perte rapide en moins de 24 h de la capacité de fixation de N₂ quand on transplante les termites (Nasutitermes) au laboratoire (68).

Potrikus et Breznack (1979) ont montré que cette capacité s'abaissait de 75 % après une période de neuf mois de captivité chez Reticulitermes flavipes. Ces résultats corrélés avec le fait que les termites captifs possèdent une teneur élevée en acide urique (55) impliquent que le métabolisme des composés azotés des termites captifs n'est pas exactement le même que celui des termites

"sauvages".

Les mesures du taux de fixation de N_2 de différentes espèces de termites ont montré une forte variation intra-et interspécifique. Ces variations sont liées à plusieurs facteurs :

- a) le taux de fixation de N_2 est lié à la richesse en azote du substrat. Breznack et al (11) ont montré que ce taux chez C.formosanus variait inversement avec le taux de NO_3^- et NH_4^+ ajoutés à un papier filtre servant de substrat nutritif. La nitrogénase est ainsi repressée quand le termite s'alimente avec un substrat trop riche en azote. Ce type d'alimentation entraîne également des faunations anormales chez le termite.
- b) l'âge et le stade de développement sont importants. Le taux de fixation de N_2 chez les petites larves de C.formosanus est 300 fois plus élevé que celui des larves plus développées.
- c) Selon les castes, par exemple chez Nasutitermes, les soldats ont un taux de fixation de N_2 plus élevé que les ouvriers, ce qui les rend moins dépendants des ouvriers. Si la fixation de N_2 n'est pas le seul processus qu'utilise le termite pour rétablir son bilan azoté, il constitue néanmoins un phénomène important pour lequel la microflore associée semble jouer un grand rôle.

Rôle dans le recyclage de l'azote

Un processus complémentaire à la fixation de l'azote est le recyclage des composés azotés. Chez le termite il peut se faire selon trois voies :

- a. mise en réserve et recyclage des déchets métaboliques azotés ;

b. recyclage des "tissus" des termites par la digestion des exuvies ;

c. digestion et assimilation des bactéries du tube digestif, de leur lyse et des produits de leur métabolisme.

Des études ont montré que la première voie existait et passait par un intermédiaire bactérien. Les termites comme beaucoup d'insectes synthétisent l'acide urique. Celui-ci est un produit d'excrétion solide, non toxique, ce qui minimise ainsi les pertes en eau de l'insecte. Leach et Granowski ont émis l'hypothèse en 1938 que les termites étaient capables de réutiliser l'azote présent dans leur réserve d'acide urique. Cette hypothèse semble validée par le fait que l'acide urique chez les termites représente 5 % du poids sec alors que les fèces n'en contiennent que 0,04 % (55).

Des études faites à l'aide de ^{14}C et ^{15}N ont montré que l'acide urique était transporté de son site de stockage (corps gras) au tube digestif via les tubes de Malpighi (65) ; il doit donc passer obligatoirement par la panse avant d'être éliminé. Ces études corrélées avec le fait que les termites possèdent les enzymes nécessaires à la synthèse de l'acide urique mais pas ceux qui sont nécessaires à sa dégradation (14) montrent que ce sont les symbiotes bactériens qui sont responsables de cette dégradation.

Cette hypothèse fut précisée par l'emploi d'antibiotiques n'affectant pas les protozoaires. Cette défaunation entraîne une perte des capacités d'uréolyse (55). Dans des conditions d'anaérobioses strictes, des bactéries uréolytiques ont été isolées du tractus digestif de R. flavipes. Ces bactéries sont capables d'utiliser l'acide urique comme source de carbone et d'azote. Elles ont été identifiées comme appartenant aux groupes de Streptococcus sp, Bactéroïdes termitides et Citrobacter sp. Les Streptococcus ne peuvent dégrader complètement l'acide urique qu'en présence de formiate dans le milieu (64). Les capacités de dégradation de l'acide urique sont en rapport avec la densité des bactéries uréolytiques présentes dans le tube digestif : $6 \cdot 10^4$ bactéries/TD (63). On ne sait pas encore sous quelle forme l'azote de l'acide urique devient assimilable pour l'insecte ; NH_3 étant l'un des produits majeurs de l'uréolyse in vitro représente l'une des possibilités, car certains termites

14.

(R.flavipes) possèdent des glutamines-synthétases (63). Une autre possibilité est que l'azote de l'acide urique est d'abord assimilé par les bactéries du tube digestif, avant d'être absorbé par l'intestin postérieur du termite après sécrétion ou lyse bactérienne ou grâce à des phénomènes de coprophagie et trophallaxie. Les termites et les bactéries bénéficiant tous deux du cycle de l'acide urique, cette symbiose peut être considérée comme un mutualisme vrai.

3.2.3. Rôle dans le métabolisme des acides aminés

Plusieurs études ont été menées afin de déterminer l'influence des variations de la microflore symbiotique du termite sur sa composition en acides aminés. Les expériences de défaunation par l'oxygène ou par les antibiotiques donnent des résultats variant avec les espèces étudiées. Spetch et al (76) ont montré que la destruction des bactéries du tractus chez un termite inférieur R.santonensis conduit à une baisse du taux d'acides aminés libres quand le termite est nourri avec de la cellulose marquée. Aucun changement n'était appréciable chez le termite supérieur N.nigriceps. Nazarczuk et al 1981 (55) ont observé au cours d'expériences de défaunation spécifiques chez deux espèces de termites inférieurs et supérieurs que les acides aminés n'étaient pas affectés par la défaunation.

D'autres auteurs (53), dans une étude plus complète, ont mesuré l'activité spécifique présente dans les protéines cellulaires élaborées à partir d'acétate marqué. Ils ont pu démontrer l'incapacité du termite inférieur (Coptotermes formosanus) complètement défauné à synthétiser ses acides aminés comme pouvaient le faire les termites pas ou partiellement défaunés (dont un protozoaire sur trois manquait). Ces auteurs concluent que chez ce termite, les bactéries du tractus digestif ainsi que deux espèces de protozoaires participent à la synthèse des acides aminés trouvés dans les protéines cellulaires (53).

3.3. Rôle dans le métabolisme de la lignine

La décomposition de la lignine est un processus connu comme étant aérobie (60) ce qui ne permet pas de comprendre comment il peut avoir lieu dans le tube digestif postérieur anaérobie des termites. De multiples hypothèses furent émises :

- a) Il existerait des sites aérobies dans la panse à prédominance anaérobie (50).
- b) La ligninolyse chez les termites emprunterait des voies différentes de celles connues actuellement.
- c) Chez les termites supérieurs, comme chez Cubitermes severus (14), des sections du tube digestif postérieur sont très alcalines (pH \approx 11). Il se pourrait qu'un prétraitement alcalin couplé à une intrusion d'oxygène amenée par le bol alimentaire, ou des peroxydases excrétées par les parois du tube digestif ou enfin les bactéries de la flore permettent cette ligninolyse.

Un fait certain est que dans ce domaine la littérature est très contradictoire. Selon les auteurs, la lignine serait dégradée chez le termite dans des proportions comprises entre 2 et 83 %. (75) (21). Les méthodes de mesure de cette dégradation sont criticables car les auteurs utilisent pour doser la lignine des acides forts tels que l'acide sulfurique concentré, pour enlever la cellulose des fèces. Ces acides peuvent alors très bien dissoudre la lignine qui a pu être rendue plus acido-soluble par son passage dans le tractus digestif.

Des informations plus conséquentes ont été fournies par Butler et Bucherfield (16) qui ont nourri le termite Nasutitermes exitiosus avec de la lignine marquée d'origine naturelle ou synthétique. Ils ont pu suivre sa biodégradation grâce à l'émission du CO₂ marqué. Ils ont trouvé que la lignine naturelle était métabolisée dans des proportions importantes (15 à 63 %) alors que la lignine synthétique était peu attaquée (14 à 32 %).

Les produits de dégradation de la lignine ne se retrouvent pas dans les fèces. Le termite à la fin de l'expérience possède une faible radioactivité. Ces faits impliquent donc que les termites peuvent déméthyliser, dépolymériser et dégrader les cycles aromatiques des lignines synthétique et naturelle. Ces expériences n'ont pas permis de situer les sites préférentiels de dégradation. On ne sait toujours pas si la flore microbienne est impliquée dans cette digestion.

3.4. Rôle dans l'émission de méthane

Des travaux récents ont montré que les termites émettaient des quantités importantes de méthane et autres gaz, tels que l'hydrogène et le dioxyde de carbone. (15) (70) (87) . Pour certaines espèces, cette production rapportée au poids peut être supérieure à celle des ruminants. Le méthane est apparemment d'origine bactérienne, car l'émission s'arrête quand on soumet le

termite à des antibiotiques qui n'atteignent pas les protozoaires. La production moyenne du méthane, calculée sur plusieurs espèces est de $0,8 \mu\text{g}/\text{CH}_4/\text{g}/\text{termite}$ (87). Le papier filtre est un substrat qui favorise l'émission de méthane. On suppose qu'il est dégradé en substrats intermédiaires plus rapidement que le bois, ces substrats, acétate, hydrogène, dioxyde de carbone permettant la croissance des bactéries méthanigènes.

Les termites et les ruminants possèdent tous deux une flore symbiotique située dans une portion dilatée de leur tube digestif. Leur substrat nutritif étant proche, il était intéressant de comparer les deux types d'assimilation de la cellulose ; chez les ruminants, elle est d'abord dégradée par les bactéries du rumen en produits intermédiaires énergétiquement riches (acides organiques). Ces produits sont ensuite oxydés par l'hôte en formiate, dioxyde de carbone et hydrogène qui servent à la croissance des bactéries méthanigènes. Ce schéma d'assimilation est directement transposable aux termites, bien qu'il ne soit encore qu'à l'état d'hypothèse, plus vraisemblable pour les termites inférieurs que supérieurs.

Vu l'importance des termites qui recouvrent plus des 2/3 de la surface terrestre, ainsi que leur importante densité, des extrapolations ont été faites pour évaluer l'émission de méthane due aux termites et son importance vis-à-vis de l'émission globale annuelle qui atteint $3,5 \text{ à } 12,1 \cdot 10^{14} \text{ g}$. La part que prennent les termites dans cette émission varie selon les auteurs. Elle serait de 40 % pour Zimmerman et al (70) et seulement de 15 % pour Rasmussen et Khalil (87). Cette variabilité s'explique par les méthodes différentes de mesure du méthane employées par ces deux auteurs. Zimmermann mesure directement le méthane produit par une espèce de termite et l'extrapole à l'ensemble de la population. Rasmussen utilise une méthode indirecte ; il mesure le méthane corrélativement à la quantité de carbone ingéré par le termite. Ces chiffres sont par leur nature sujet à une grande incertitude et liés à la variabilité intra- et interspécifique du termite ainsi qu'aux différentes niches écologiques qu'ils occupent. Ils permettent néanmoins de souligner l'importance des termites dans le cycle du méthane. L'étape suivante consiste maintenant à isoler et à caractériser les bactéries méthanigènes ainsi qu'à étudier leur rôle chez les termites.

4. CONCLUSION

Les expériences de défaunation et de défloration chez les termites inférieurs et supérieurs ont montré une baisse réelle de la durée de vie. Si l'on sait maintenant grâce à ces expériences que cette microflore est indispensable, on ne sait toujours quasiment rien sur son rôle, surtout chez les termites supérieurs. Ce résumé bibliographique nous a permis de montrer que les symbiotes des termites semblent jouer

- un rôle majeur dans :

- . la cellulolyse chez les termites inférieurs ;
- . le métabolisme des composés azotés ;
- . l'émission des gaz : méthane, hydrogène, dioxyde de carbone ;

- un rôle mineur dans :

- . la cellulolyse chez les termites supérieurs.

Ainsi, d'importants progrès ont été faits dans la connaissance de la composition de la flore, notamment en ce qui concerne les interactions communautaires et l'identification de certains microorganismes participant au métabolisme énergétique. Nos travaux futurs devraient s'orienter vers une quantification des bactéries et l'étude du rôle des différents groupes bactériens tels que les spirochètes dans le métabolisme des termites supérieurs. Ceci sera possible grâce à l'emploi de bactéricides spécifiques vis-à-vis des groupes symbiotiques, qui éclaircira le rôle de chaque espèce dans la symbiose en général. Ces travaux devront être complétés par l'étude approfondie de la biochimie de cette symbiose, domaine encore très mal connu.

L'aire de répartition des termites recouvre à l'heure actuelle 68 % de la surface terrestre. Celle-ci est continuellement en extension du fait de la dégradation de la forêt tropicale due aux activités humaines. Ils seraient responsables de 77 % de la production primaire nette (NPP) des terres émergées (87). Ainsi, leurs capacités d'adaptation et de biodégradation dues à leur microflore associée font des termites un des maillons principaux du cycle du carbone surtout à l'échelle tropicale.

DEUXIEME PARTIE

PARTIE EXPERIMENTALE

PARTIE EXPERIMENTALE 1

OBSERVATION IN SITU AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE
DES POPULATIONS SYMBIOTIQUES DE LA PANSE DU TERMITE
NASUTITERMES ARBORUM

SOMMAIRE

INTRODUCTION

1. TECHNIQUE ET MATERIEL UTILISE DE LA MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

1.1. Microscope à balayage

1.1.1. Prélèvement de l'échantillon

1.1.2. Fixation

1.1.3. Déshydratation

1.2. Microscope à transmission

1.2.1. Fixation

1.2.2. Déshydratation

1.2.3. Inclusion

2. RESULTAT

2.1. Microscope à balayage

2.1.1. avec le bol alimentaire

2.1.2. sans le bol alimentaire

2.2. Microscope à transmission

INTRODUCTION

S'il est bien établi que le termite possède une flore et une faune nombreuse et spécifique (cf. partie bibliographique), il semble intéressant de savoir comme elles se répartissent in situ dans le tube digestif et par quel mécanisme elle résistent aux mouvements permanents du bol alimentaire.

La majorité des observations précédentes faites au microscope électronique (43) s'étaient attachées à étudier les détails anatomiques et morphologiques du tube digestif, mais les populations bactériennes n'avaient pratiquement jamais été décrites de manière détaillée. Seuls deux auteurs, Breznack et Bignell (8) (13) ont observé en priorité les bactéries, l'un chez deux espèces de termites xylophages (R. flavipes et C. formosanus), l'autre chez une espèce de termite humivore (C. severus).

Plusieurs caractéristiques ont pu ainsi être mises en évidence :

- . Une grande densité et diversité des bactéries ; Breznack a dénombré plus de 30 morphotypes différents chez deux espèces étudiées (cf. photo 1), dont seulement 3 étaient communes aux deux espèces.
- . Des sites préférentiels où se forment les agrégats bactériens ; chez les termites inférieurs xylophages, ce sont des microcupules réparties uniformément sur toute la surface de la panse, remplies de matériel granulaire (cf. photo 2). Les bactéries s'y fixent grâce à des fibres présentes à leurs extrémités. Chez les termites humivores (8) ces sites sont des épines cuticulaires réparties régulièrement dans la dernière portion de la panse. Ces épines sont recouvertes de bactéries essentiellement filamenteuses de type actinomycètes. Elles présentent la particularité d'être très longues (180 à 210 μm) par rapport à la lumière du tube digestif, qui

photo 1

(13)

vue au H.E.T de l'épithélium de la panse de R. flavipes et de ses bactéries associées

trait = 1 μm

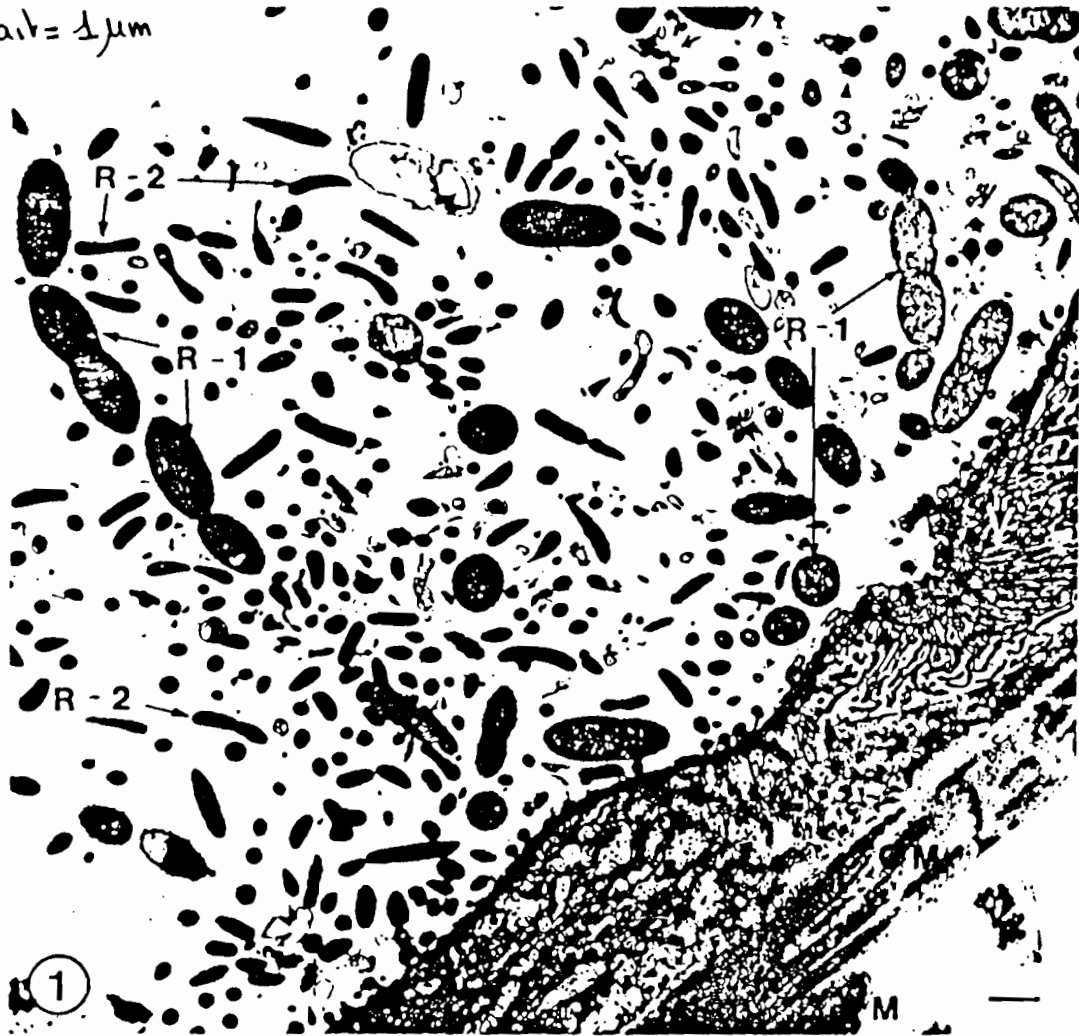


photo 2

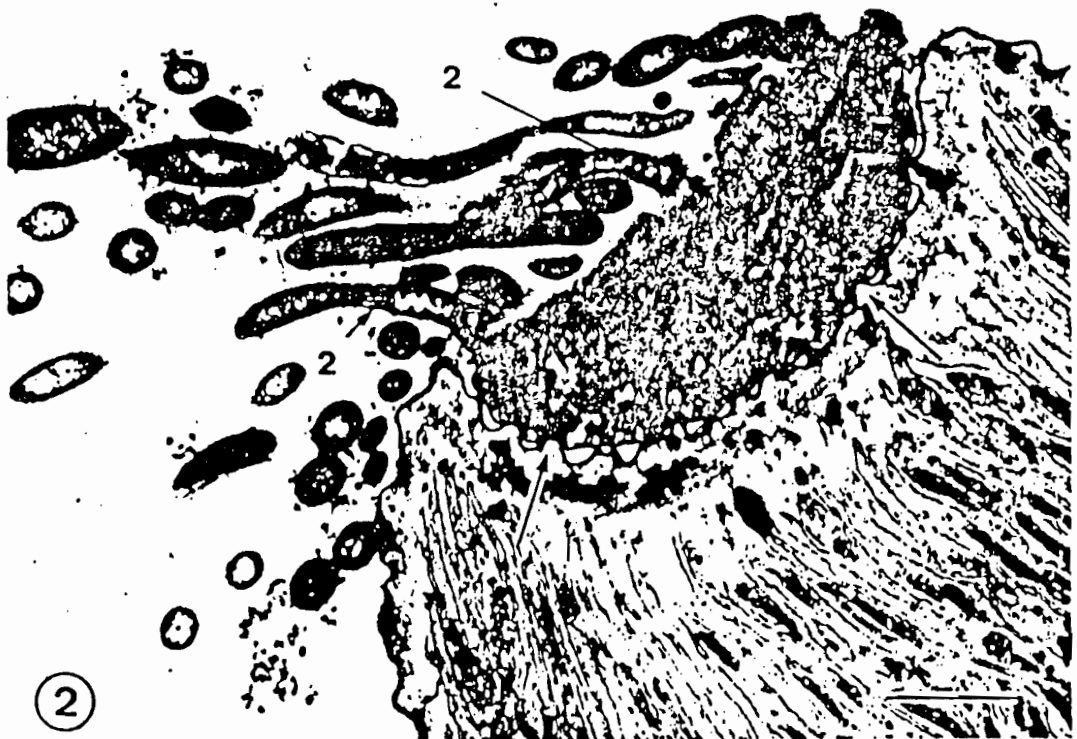
(13)

vue au H.E.T d'une cupule épithéliale chez C. formosanus

trait = 1 μm

BREZNAK AND PANKRATZ

APPL. ENVIRON. MICROBIOL.



n'excède pas 400 μm . In situ elles obliquent vers le rectum et s'interpénètrent à travers la lumière du tube digestif. Elles forment donc avec leurs bactéries associées, une véritable matrice, qui filtre le bol alimentaire pendant la péristaltie.

Les bactéries s'attachent donc soit à la membrane épithéliale, soit entre elles, pour résister au courant permanent de matières. Ces faits démontrent l'importance de l'agencement des bactéries à l'intérieur du tube digestif. Mon travail a donc consisté à visualiser cette diversité bactérienne et à mettre en évidence les interactions entre les bactéries et le bol alimentaire.

1. TECHNIQUE ET MATERIEL DE LA MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

1.1. Microscope à balayage

1.1.1. Prélèvement de l'échantillon

Le termite est disséqué puis le tube digestif est prélevé et déposé dans une goutte de tampon Sorënsen de pH 7,2 (mélange 1/4 - 3/4 de tampon monophosphate et de tampon dissodique). Le tube digestif est ensuite incisé sur toute la longueur de la panse pour éliminer le matériel minéral pendant les rinçages du tube avec le tampon,

1.1.1.2. Fixation

- . fixer l'échantillon à la glutaraldéhyde de 2,5 % dans du tampon Sorënsen 0,1 M

temps : 1 h

- . laver au même tampon

temps : 2 fois 5 min.

- . postfixation à l'acide osmique 1 % dans le même tampon

temps : 30 min. à 4°C

- . laver au même tampon

temps : 3 fois 5 min.

1.1.1.3. Déshydratation

Les échantillons sont ensuite progressivement déshydratés selon le protocole suivant :

- . alcool 30° temps : 10 min.
- . alcool 50° temps : 10 min.
- . alcool 70° temps : 10 min.
- . alcool 100° temps : 2 fois 15 min.
- . mélange alcool 100°/amylacétate (50-50 v/v) temps : 15 min.
- . 3 bains d'amylacétate pur temps : 15 min.

L'échantillon est passé au point critique (appareil polaron à CO₂) puis métallisé (appareil à pulvérisation cathodique) avant d'être observé au microscope à balayage (MEB 07 de Cameca) dans les conditions suivantes :

Coupe Sagittale de la panse du termite

Photo. 3 (panse avec Bol alimentaire) (M.E.B)



75μ

M. Hyphe mycellien (champignon) (g x 1350)

Bf. Bactérie filamenteuse: type actinomycètes.

P. Paroi de la panse

Bo. Bol alimentaire

à l'aide d'un microtome, les coupes étant faites avec un diamant. On les examine ensuite au microscope électronique à transmission (Philips) sous 80 MV de tension.

RESULTAT

2.1. Microscope à balayage

2.1.1. avec le bol alimentaire

La photo 3 est une coupe longitudinale de la panse du termite, où le bol alimentaire a été légèrement gratté. La panse est remplie de filaments du type mycellien. De par leur taille, certains semblent être des champignons. Il semblerait que ces formes filamenteuses soient pour la plupart des actinomycètes, en effet :

- . ils possèdent une morphologie caractéristique (longs filaments fins) ;
- . ces photos sont très voisines de celles obtenues (9) chez un termite *inferieure* humivore Coptotermes severus où les actinomycètes constituent la flore dominante ;
- . leur croissance a pu être obtenue dans des milieux spécifiques (cf. partie expérimentale).

Ils recouvrent l'ensemble de la panse (photo 4) et semblent en interaction étroite avec le bol alimentaire. A ce stade nous n'avons pu visualiser aucun autre morphotype bactérien. Il est intéressant de constater l'absence de tout protozoaire, ce qui confirme la littérature sur les termites supérieurs (cf. partie bibliographique).

2.1.2. sans le bol alimentaire

Pour les photos 5 et 6, le bol alimentaire a été séparé de la paroi après déshydratation. Ceci permet de visualiser une abondante flore bactérienne pléiomorphe, avec une prédominance des formes coccobacillaires et de bâtonnets fins.

Nous n'avons pu mettre en évidence aucune chaîne



Bactérie filamenteuse, recouvrant l'épithélium de la pu

Photo. 4

(M.E.B)



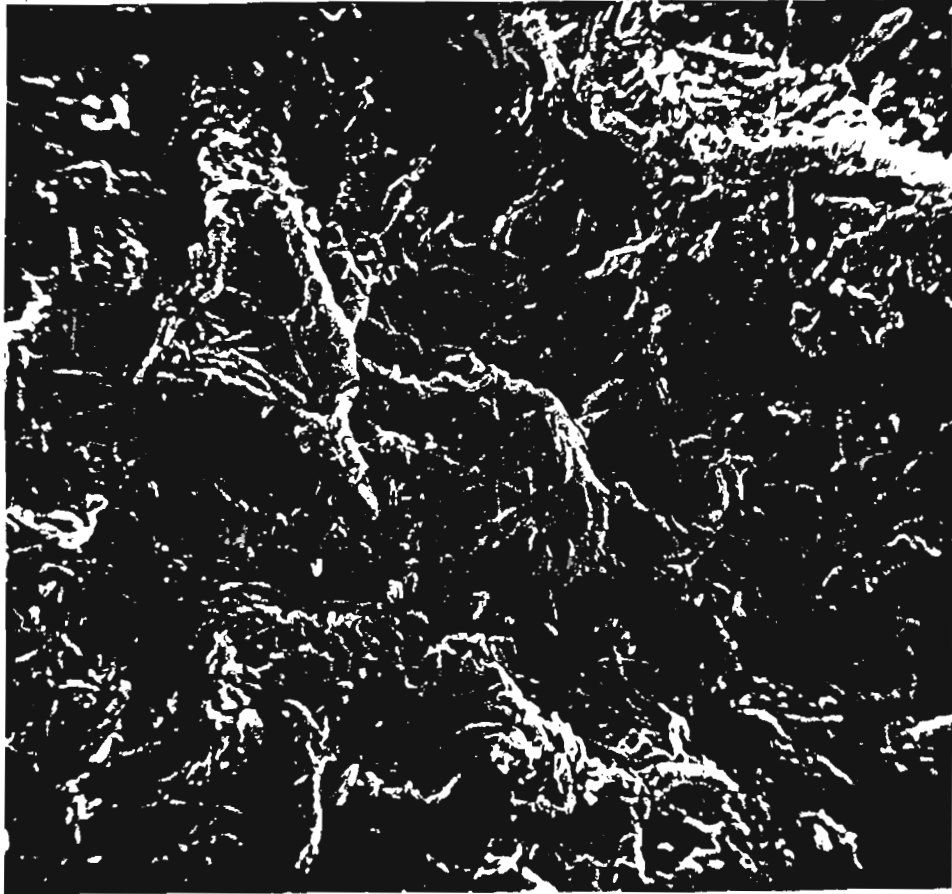
$1\mu = 1\mu\text{cm} (g = 10800)$

B.F. Bactérie filamenteuse

P. Paroi

Photo. 5.

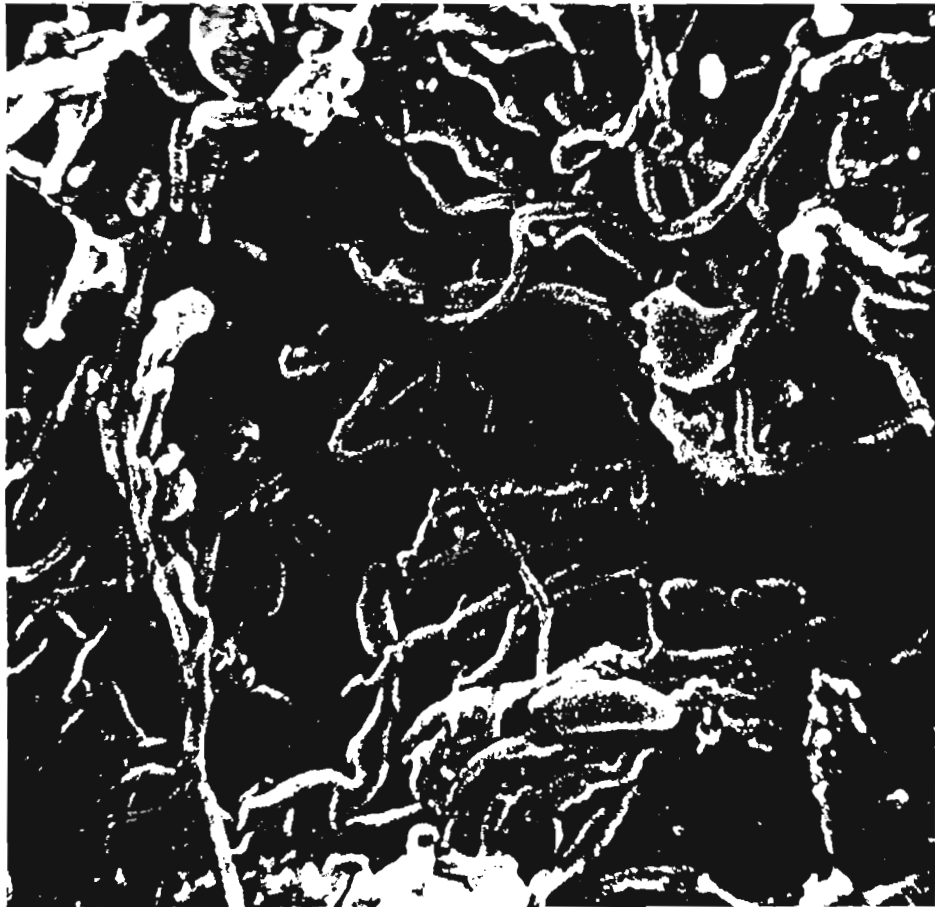
Observation de la paroi de la panse
sans bol alimentaire (H.E.B.)



$\overline{5\mu}$ (x 2000)

Photo. 6

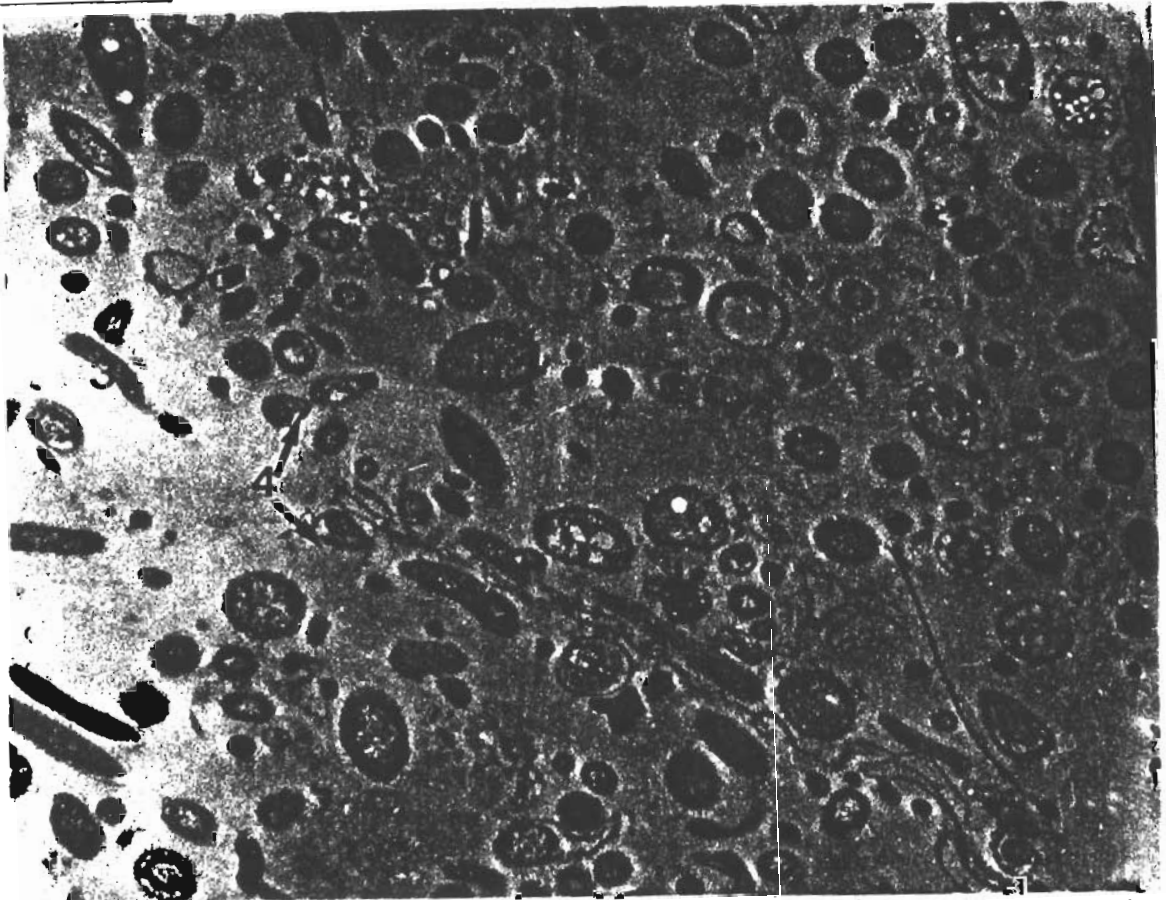
agrandissement (x5)



$\overline{1\mu}$ (x10000) B. Bacillus
Co. Coccobacille
E. Epithelium de la panse

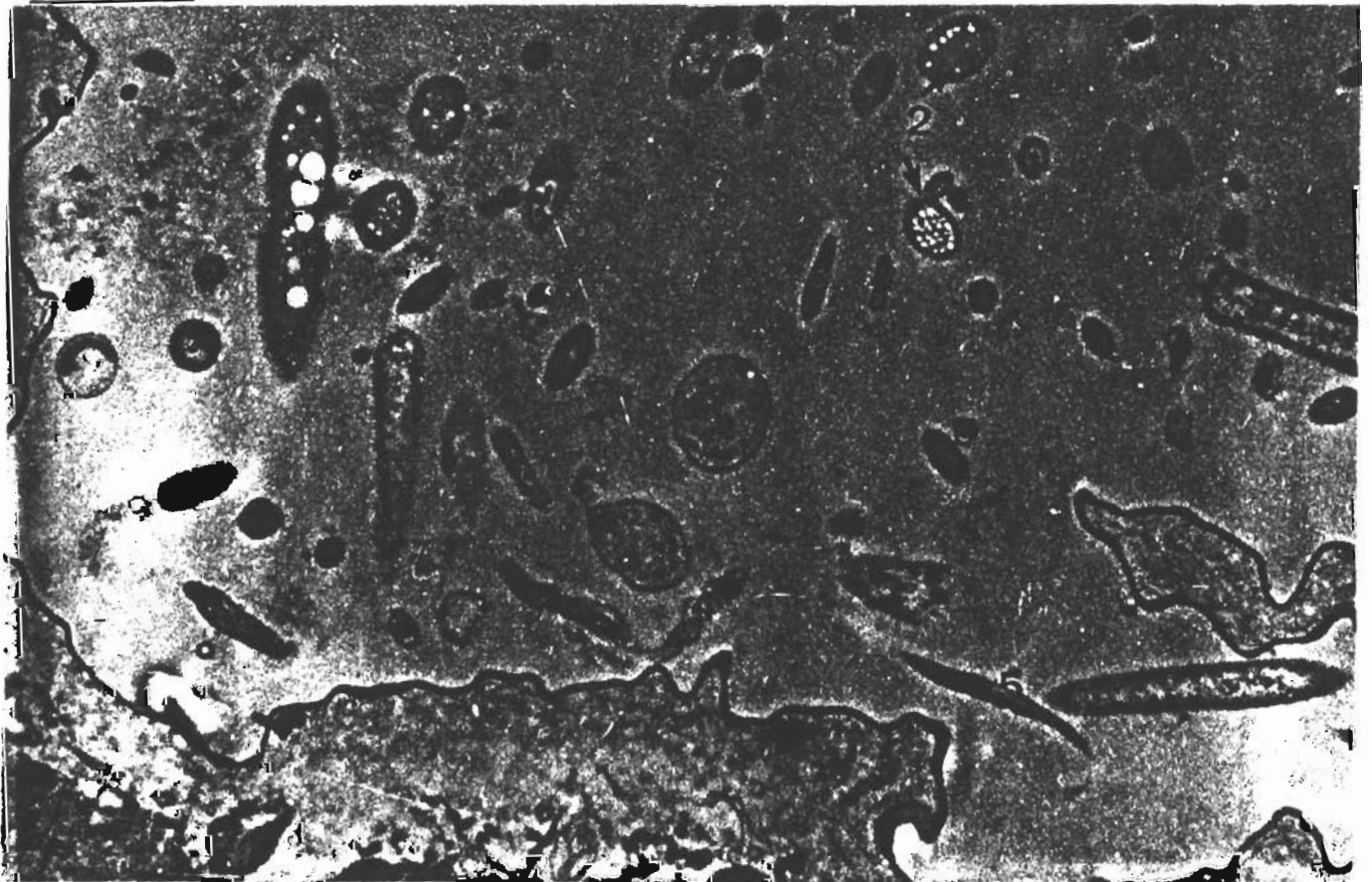
Photo 7

Section transversale de la panse (M.E.T)



$\overline{1\mu}$ (9x8500) 1: Morphotype 1 4: Morphotype 4
 2: " " 2 5: " " 5 } cf. texte
 3: " " 3

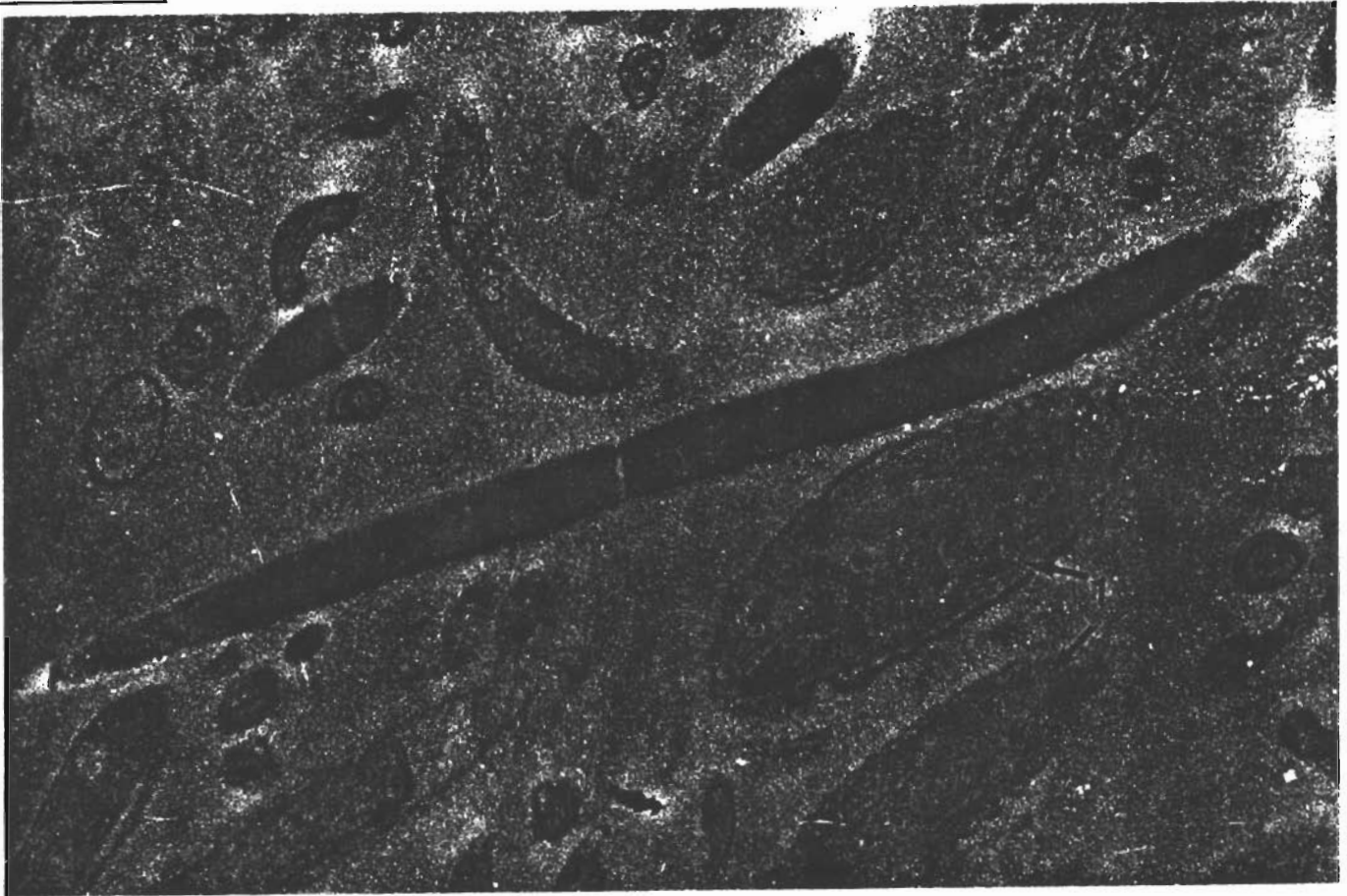
Photo 8



$\overline{1\mu}$ (9x8500)

Photo. 9

Morphotype bactérien caractéristique (M.E.T)



1.2 μ (g x 16500)

Photo. 10.



1 μ (g x 24750)

importante de bâtonnets, ni d'interactions particulières entre elles, comme les trichomes bactériens (cf. Breznack in situ).

2.2. Microscope à transmission

La microscopie à transmission permet de mieux visualiser l'hétérogénéité bactérienne. Les bactéries sont bien distinctes du bol alimentaire qui n'apparaît pas dans les coupes ultrafines. On a pu distinguer parmi ces bactéries 5 morphotypes :

- . morphotype 1 : constitué de bactérie de 2 à 3 μ de long, ovalée, dont la caractéristique principale est une membrane frangée et un cytoplasme hétérogène, (cf photo 7,9)
- . morphotype 2 : forme coccobacillaire hétérogène remplie de granules réfringents longueur : 1 x 1,5 μ , (cf photo 7,8)
- . morphotype 3 : bactérie à forme ondulée, longueur : 0,5 x 4 à 5 μ , présentant un cytoplasme clair à aspect homogène, (cf photo 7,9,11)
- . morphotype 4 : spirochète à forme torsadée et caractérisée par une enveloppe externe et un protoplasme cylindrique (cf. photo 10)
- . morphotype 5 : bactérie filamenteuse caractérisée par des extrémités très effilées, un cytoplasme dense et une structure médiane (cloisonnement ?), longueur : 0,3 x 4 à 10 μ (cf. photo 8,9).

Les morphotypes 1,2,3 et 4 sont proches de ceux décrits chez Coptotermes formosanus, par contre, les bactéries filamenteuses/du du type trouvé ici ne semblent pas avoir été retrouvées dans d'autres espèces de termites.

PARTIE EXPERIMENTALE 2

QUANTIFICATION ET QUALIFICATION PARTIELLE
DES BACTERIES SYMBIOTIQUES DU TERMITE
NASUTITERMES ARBORUM

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

1. APERCU SUR LES POPULATIONS IMPLIQUEES DANS LA METHANOGENESE

- 1.1. Hydrolyse et acidogénèse
- 1.2. L'acidogénèse
- 1.3. La méthanogénèse

2. TECHNIQUE DE BASE DE L'ANAEROBIE

- 2.1. Description du matériel utilisé
 - 1.1.1. La hotte anaérobie
 - 1.1.2. Dispositif de gazage
 - 1.1.3. Cylindre haute pression
- 2.2. Préparation des milieux
 - 1.2.1. Milieux préréduits liquides
 - 1.2.1.1. Caractéristiques communes
 - 1.2.1.2. Préparation
 - 1.2.2. Milieux préréduits solides.

3. TECHNIQUE DE NUMERATION

- 3.1. Avant-propos
- 3.2. Numération des bactéries totales
- 3.3. Numération des bactéries cellulolytiques
- 3.4. Numération des bactéries fixatrices d'azote
- 3.5. Numération des bactéries méthanigènes
- 3.6. Numération des bactéries acidifiantes
- 3.7. Numération des bactéries sulfato-réductrices
- 3.8. Numération des bactéries dénitrifiantes
- 3.9. Numération des bactéries anaérobies strictes non oxygène sensibles
- 3.10. Numération des bactéries anaérobies strictes oxygène sensibles
- 3.11. Numération des bactéries anaérobies facultatives

4. ISOLEMENT DES SOUCHES BACTERIENNES

- 4.1. Bactéries anaérobies facultatives
- 4.2. Bactéries anaérobies strictes

5. ETUDES DES SOUCHES BACTERIENNES ISOLEES

- 5.1. Bactéries anaérobies facultatives
 - 5.1.1. Morphologie
 - 5.1.2. Caractéristiques biochimiques
- 5.2. Bactéries anaérobies strictes

6. RESULTATS

- 6.1. Numération des populations bactériennes
- 6.2. Isolement et caractérisation des souches pures
 - 6.2.1. Bactéries anaérobies facultatives
 - 6.2.2.1. Bacilles sporulés
 - 6.2.2.2. Cocci
 - 6.2.2.3. Bacilles asporulés
 - 6.2.2. Bactéries anaérobies strictes

CONCLUSION ET DISCUSSION

INTRODUCTION

Dès 1946, Hungate a fait le parallèle entre la digestion de la cellulose chez les ruminants et celle qui existe dans la panse des termites. Depuis, bien des faits sont venus corroborer cette hypothèse :

- . La présence d'une flore nombreuse et diversifiée dont la densité (environ 10^8 bactéries/ml) est comparable à celle des digesteurs naturels (rumen) ou biogaz (73) ;
- . La présence de composés intermédiaires provenant de la dégradation anaérobie de la cellulose, tels que l'acétate, l'hydrogène, le dioxyde de carbone, le propionate (12) (5) ;
- . La production de méthane provenant de la microflore de la panse en quantité importante chez certaines espèces (87) (79) (15).
- . La rétention prolongée, de l'ordre de 12 heures (42) du bol alimentaire dans la panse du termite.
- . Un potentiel redox et un pH compatible avec la présence de bactéries anaérobies strictes (60).

Ces faits permettent donc d'assimiler la panse des termites à un microfermenteur ; c'est pourquoi j'ai utilisé pour cette étude de quantification des bactéries du termite, les techniques de numération des principaux groupes bactériens impliqués dans le processus de la digestion anaérobie mises au point au laboratoire de microbiologie de l'ORSTOM (30) et appliquées à des résidus cellulosiques. Cette quantification a l'avantage de permettre également une première approche du métabolisme de ces bactéries (cf. fig. II).

1. APERCU SUR LES POPULATIONS IMPLIQUEES DANS LA METHANOGENESE

La fermentation méthanique est un processus anaérobie complexe de conversion de la matière organique en acétate, CO_2 , H_2 et finalement méthane (cf. fig. II). Elle se déroule en 3 principales étapes anaérobies réalisées chacune par des populations bactériennes bien définies (31 (33)).

1.1. Hydrolyse et acidogénèse

Cette étape est réalisée par les bactéries hydrolytiques et fermentaires qui transforment les polymères biologiques complexes tels que la cellulose en alcools, acides gras volatils (acétate, propionate, butyrate, valérate).

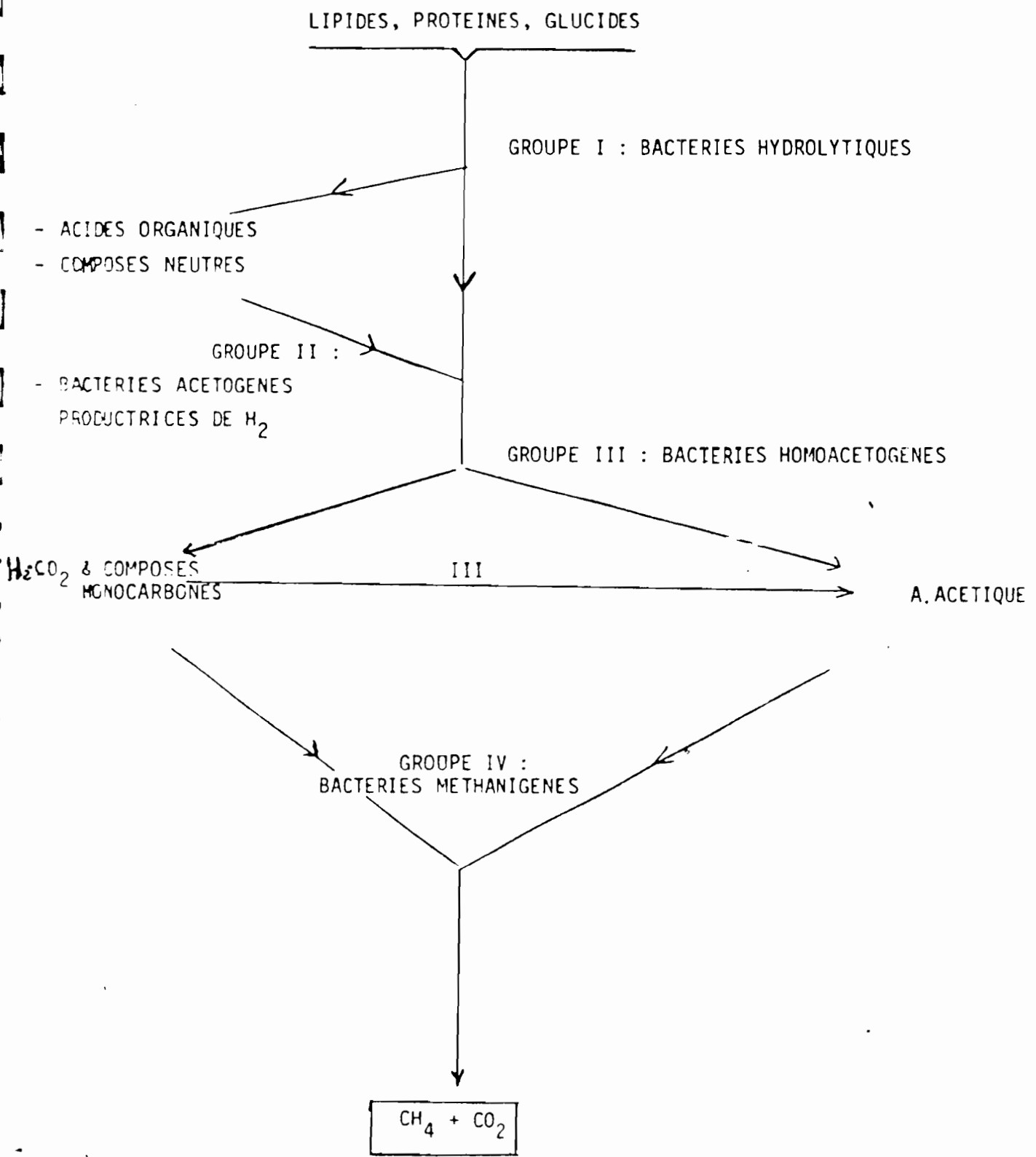
Chez les termites, elles seraient représentées principalement par les bactéries cellulolytiques qui sont mal connues et sont très difficiles à isoler en culture pure.

1.2. L'acétogénèse

Les produits de l'acidogénèse sont décomposés en 3 éléments, par les bactéries acétogènes, essentiels pour la production du méthane : l'acétate, le formiate et $\text{H}_2 + \text{CO}_2$. De nombreux groupe bactériens sont capables de former de l'acétate.

- . Les bactéries sulfato-réductrices du type I (BSR 1) qui oxydent le lactate en acétate et les bactéries sulfato-réductrices de type II (BSR 2) qui sont capables de dégrader les acides gras (C_{30} C_{18}) en acétate ; cette transformation nécessite la présence de sulfate comme accepteur final d'électrons. En l'absence de sulfate, les bactéries méthanigènes peuvent jouer le rôle d'accepteur d'électrons dans le cadre d'un transfert interspécifique d'hydrogène.
- . Les bactéries homoacétogènes qui forment de l'acétate soit à partir de l'hydrogène comme source de protons et de CO_2 comme source de

FIGURE II



(d'après J.G. ZEIKUS-19-)

41

carbone, soit à partir de protons issus de la dégradation d'un sucre.

- . Les bactéries productrices d'hydrogène obligatoires (OHPA) ou syntrophiques. Ces bactéries ne peuvent produire de l'acétate ou à de faibles pressions d'hydrogène à cause de contraintes thermodynamiques. Elles ne peuvent donc croître qu'en coculture, en présence d'une bactérie anaérobie utilisatrice d'hydrogène telle que les méthanigènes ou les bactéries sulfato-réductrices.

1.3. La méthanogénèse

Les bactéries méthanigènes utilisent les produits issus de l'acétogénèse, c'est-à-dire le formiate, l'acétate et $\text{CO}_2 + \text{H}_2$ pour former du CH_4 .

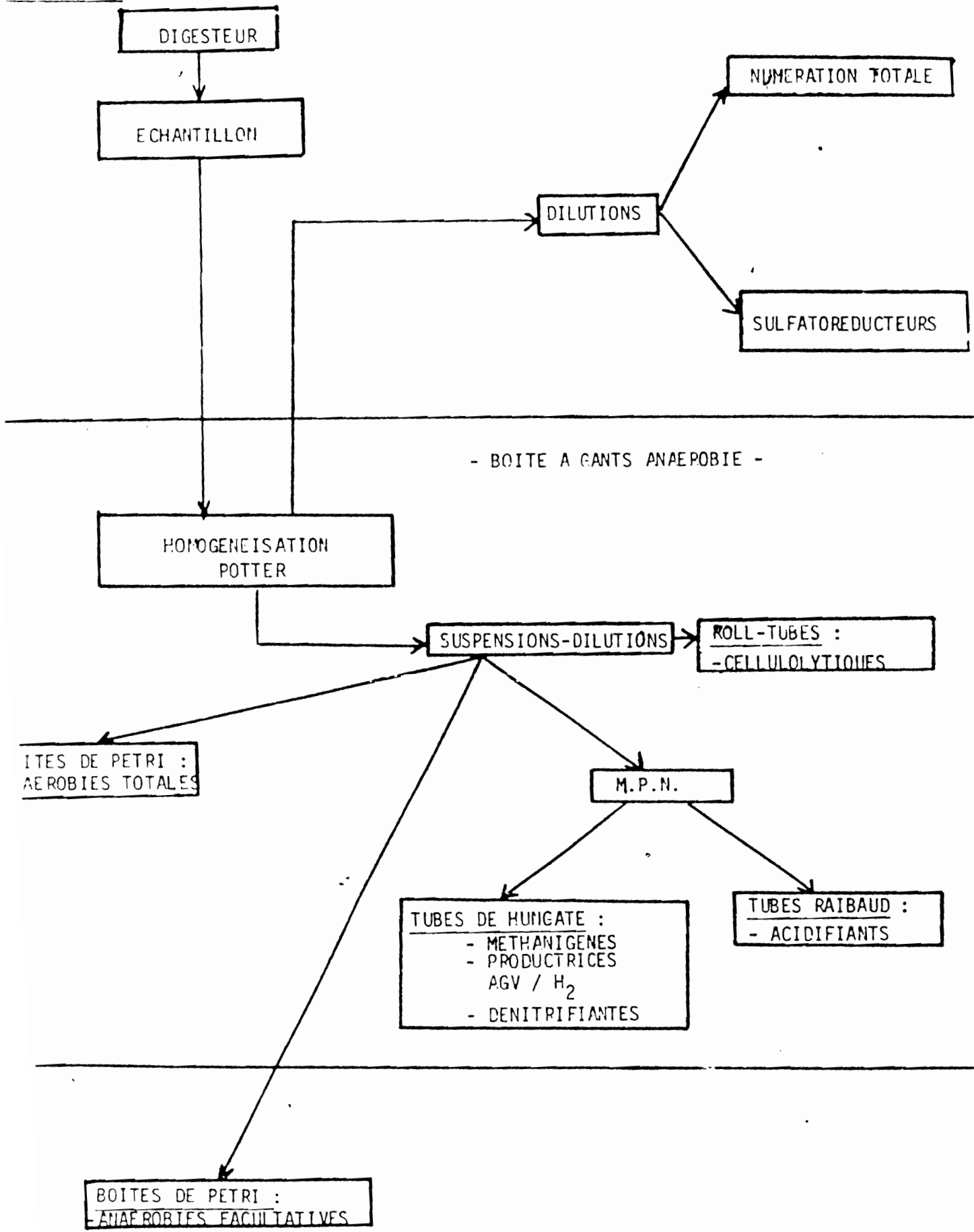
Ces bactéries présentent un ensemble de particularités qui permet de les classer, avec d'autres bactéries telles que les holobactéries, dans le nouveau groupe bactérien des archéobactéries (3). Leur isolement est long et fastidieux, car elles ont une croissance lente et demandent la mise en oeuvre de techniques adaptées à la stricte anaérobiose. Certaines espèces ont un seuil léthal inférieur à 10 ppm d' O_2 .

2. TECHNIQUES DE BASE DE L'ANAEROBIOSE

2.1. Description du matériel utilisé (cf. fig. JII)

On doit à Hungate (39 (40)) d'avoir jeté les bases de l'anaérobiose moderne et d'avoir permis ainsi un bond formidable dans la connaissance de la microbiologie et la biochimie des bactéries anaérobies. Ces techniques ont été depuis considérablement améliorées et développées (?) (35); celles utilisées dans le laboratoire de l'ORSTOM et décrites ci-après bénéficient des avantages des techniques les plus récentes. Le système utilisé comprend quatre composantes :

FIGURE III



- . une boîte à gants anaérobie
- . un dispositif de gazage
- . des cylindres haute pression
- . des tubes à septum ou tubes de Hungate.

2.1.1. La hotte anaérobie (cf. photo 11) (1)

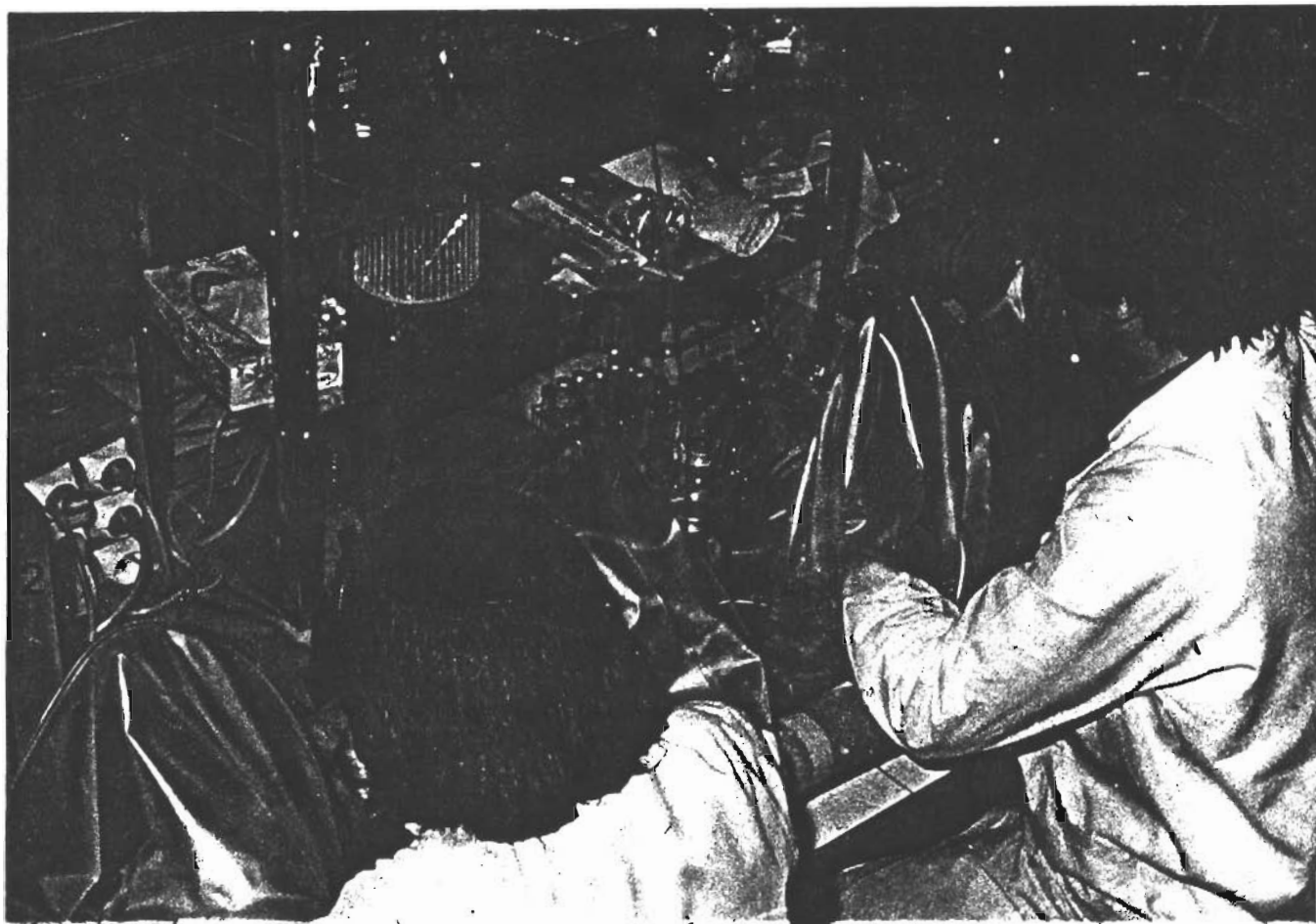
Celle utilisée est une hotte en PVC gonflable (La Cathène, Bezons). Son atmosphère interne est un mélange de N_2-H_2 (95 : 5 %) ; elle contient :

- . un catalyseur (chlorure de palladium) permettant de piéger l'oxygène sous forme d' H_2O d'où la nécessité d'une certaine teneur en hydrogène dans la hotte
- . un déshydratant (silicagel)
- . du charbon activé sous forme de granulés (80-100 mesh) afin de piéger H_2S qui pourrait contaminer le catalyseur
- . une électrode à oxygène sensible jusqu'au ppm car dans la hotte la teneur en oxygène doit être maintenu en deçà de 10 ppm.
- . un sas d'entrée cylindrique pour l'entrée et la sortie du matériel, l'opération de rentrée s'effectue avec 3 cycles vide-azote.
- . 2 turbines permettant la circulation des gaz au travers du charbon activé et du catalyseur pour piéger l'oxygène
- . un stérilisateur électrique pour les oèses.

La hotte doit être toujours gardée pressurisée afin de limiter la diffusion de l'oxygène. En cas de forte teneur en oxygène il faut régénérer le déshydratant et ajouter de l'hydrogène.

Photo. 11.

Hotte anaérobie



1. Stérilisateur
2. Etuve
3. Silicagel
4. Sas d'entrée

2.1.2. Dispositif de gazage (cf. photo 12a)

Ce dispositif permet d'échanger l'atmosphère des tubes et flacons de croissance ainsi que des cylindres haute pression. Il a été mis au point par Balch et al (?). Il se compose d'une ligne principale de distribution permettant de distribuer 3 gaz (N_2 , N_2/CO_2 , H_2/CO_2) ou le vide et d'une série de huit tuyaux en polyéthylène munis à leur extrémité d'une aiguille vacutainer double tête. Un tuyau est relié à une seringue de verre bourrée de coton cardé et terminé par une canule recourbée, ce qui permet de remplacer l'atmosphère aérobie des seringues utilisées pour les incubations par une atmosphère anaérobie. Un autre tuyau permet de faire le vide et de pressuriser les cylindres haute pression décrits ci-après.

2.1.3. Cylindre haute pression

C'est un système conçu pour permettre l'incubation des bactéries anaérobies strictes sur boîtes de Pétri sous une pression élevée de H_2-CO_2 , si nécessaire. Il est composé d'un corps cylindrique en acier inoxydable fermé à chaque extrémité par une plaque circulaire en laiton, l'étanchéité étant assurée par un joint thorique. La plaque supérieure comporte un septum pour la prise d'échantillons de gaz, un manomètre et un robinet de gazage.

Tous les récipients utilisés sont bouchés à l'aide de septums maintenus par un bouchon à vis troué. Toutes les inoculations sont effectuées à l'aide de seringues stériles Terumo, préalablement vidées de leur air selon la technique décrite précédemment.

Photo 12a

Rampe de gazage

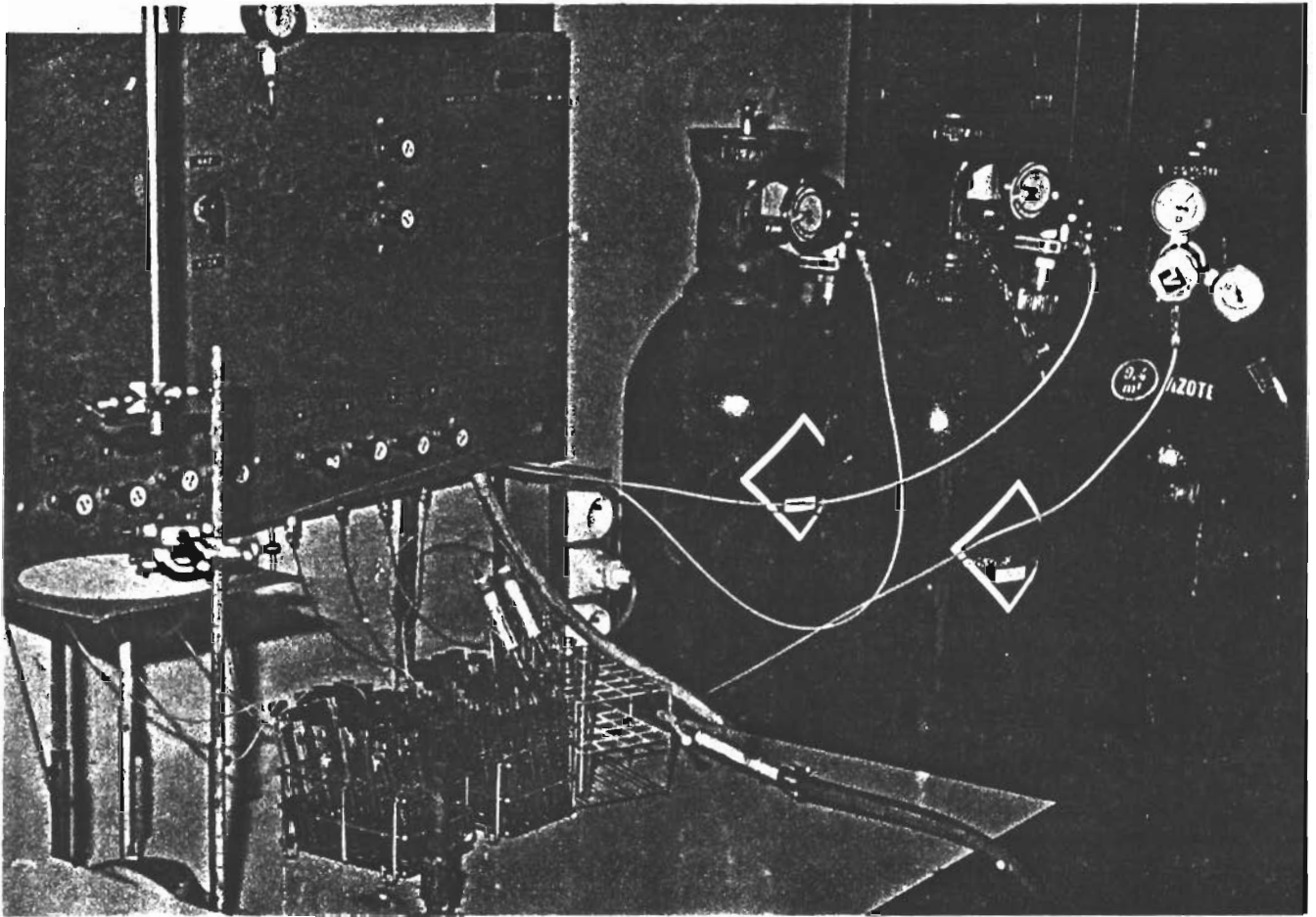
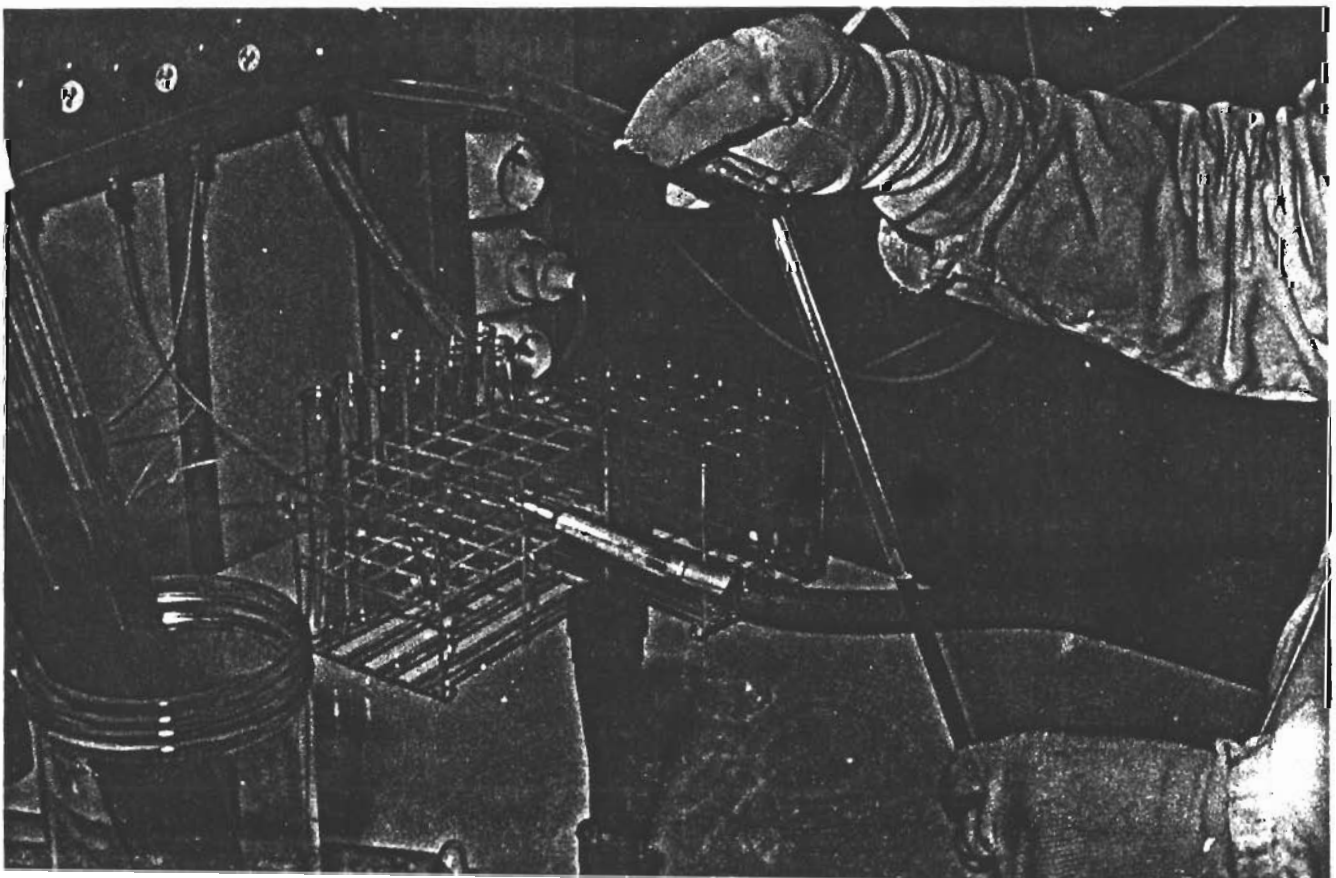


Photo 12b

Tube Raibaud



- refroidir le milieu dans un bain de glace, toujours sous atmosphère anaérobie
- ajuster le pH sous flux de gaz
- introduire le ballon dans la hotte et répartir le milieu (5 ml/tube, 300 ml/bouteille) à l'aide d'un répartiteur de milieux (Weathon Unispence). Boucher les flacons ou tubes avec les bouchons-septums appropriés.
- sortir et échanger l'atmosphère des récipients avec le gaz approprié. Ces tubes sont pressurisés à 1,5 atmosphère pour les tubes gazés avec du H_2/CO_2 et 0,5 atmosphère pour ceux gazés avec N_2/CO_2 (les flacons de 1 l modifiés sont gazés après autoclavage).
- autoclaver à 120°C, 20 min. ou 40 min.
- avant l'inoculation, ajouter stérilement à la seringue 0,1 ml d'une solution de Na_2S à 2,5 % (W/V) pour 5 ml de milieu
- ajouter le substrat carboné si nécessaire
- inoculer
- incuber
- repressuriser en cours d'incubation, si nécessaire.

Remarque : Pour les bactéries autres que les méthanigènes, on peut incorporer le Na_2S avant la stérilisation. En effet, le Na_2S semble libérer lors de la stérilisation des composés toxiques pour les méthanigènes.

2.2.2. Milieux préréduits solides

La préparation des milieux est exactement la même que celle des milieux liquides, à la seule différence qu'on y ajoute 1,5 % d'agar.

Après que le milieu ait été réduit sous flux d'azote, on ajuste le pH et on ajoute la quantité d'agar nécessaire.

On autoclave dans le ballon ayant servi à la préparation. Une fois stérile, le milieu est rentré dans la hotte et on le répartit en boîtes de Pétri. Dès qu'il est solidifié, on retourne les boîtes et on attend 3 à 4 jours avant d'inoculer.

Une fois inoculées, les boîtes sont placées dans le cylindre haute pression (introduit dans la hotte au moins un jour avant). Le cylindre sorti, on le pressurise directement à la pression désirée (3 atm pour les méthanigènes, 0,5 pour les autres). Il ne faut jamais faire le vide pour éviter la formation de bulles dans l'agar.

On peut suivre la croissance des méthanigènes qui poussent sur H_2/CO_2 en lisant sur le manomètre la baisse de pression résultant de la formation du méthane. Quand celle-ci devient trop importante, il faut repressuriser le cylindre.

3. TECHNIQUES DE NUMERATION

3.1. Avant-propos

Ces techniques ont été mises au point dans ce laboratoire et permettent une quantification simultanée des bactéries totales et de celles qui participent aux principales étapes de la fermentation méthanique. Je les ai directement transposées en y incluant deux milieux de numération complémentaires : milieu pour la numération des bactéries cellulolytiques, milieu pour la numération des bactéries fixatrices d'azote.

Après dissection de 10 termites, on prélève les tubes digestifs qu'on dépose, sous un flux d'azote, dans un tube de Hungate contenant 10 ml d'eau réduite (annexe 6). On introduit le tube bouché dans la boîte à gants anaérobie où il est homogénéisé dans un Potte pendant 10 à 15 min. Des suspensions-dilutions sont ensuite effectuées à l'aide de seringues stériles de 1 ml dans des tubes de Hungate contenant de l'eau réduite pour l'ensemencement des différents milieux de numération. Ces tubes de dilution contiennent des billes de verre qui, agitées par un cyclomixer (Clay Adam) avant chaque dilution, permettent une meilleure homogénéisation de l'inoculum. En fin d'opération, l'échantillon homogénéisé

ainsi que les tubes de suspensions-dilutions sont sortis de la boîte à gants pour la préparation d'autres numérations. La numération des bactéries, se fait soit en fonction de leur sensibilité à l'oxygène (bactéries aérobies, anaérobies facultatives, anaérobies strictes, oxygène- et non oxygène-sensibles) soit en fonction de leur métabolisme par le calcul du nombre le plus probable, MPN (annexe 1) : c'est le cas des méthanigènes, des acidifiantes et des dénitrifiantes. Tous les calculs du MPN ont été réalisés sur 4 dilutions avec 5 tubes par dilution.

3.2. Numération des bactéries totales

Cette numération s'effectue en dehors de la chambre anaérobie. Une dilution, généralement à 10^{-4} , est effectuée pour obtenir environ 200 bactéries par champ. La technique utilisée est une coloration à l'acridine orange, après filtration de 5 ml de la dilution choisie sur un filtre nucléopore en polycarbonate (taille des pores : $0,2 \mu\text{m}$ - diamètre : 15 mm), préalablement coloré au soudan B (34). Ces filtres présentent l'avantage d'avoir une surface plane et des pores de taille régulière.

La technique est la suivante :

- traitement des filtres

Placer les filtres 24 h au moins dans une solution de soudan B (annexe 15), les rincer abondamment dans de l'eau distillée filtrée. Ce traitement a pour effet d'éliminer l'autofluorescence du filtre et d'en accentuer le contraste avec les bactéries.

- coloration

- . placer un porte-filtre sur une fiole à vide, puis un filtre sur le verre fritté
- . filtrer 5 ml d'échantillon à la dilution 10^{-4} (parfois 10^{-3}) sous un vide très faible ($0,3 \text{ atm}$)
- . couper le vide, puis placer 2 ml d'acridine orange (annexe 15)
- . temps de contact : 5 min.
- . éliminer l'acridine en remettant le vide
- . laver à l'eau distillée

- . retirer le filtre et le sécher
- . découper un quartier de filtre, le monter dans une goutte d'huile à immersion entre lame et lamelle, et observer en immersion.

- comptage

Le comptage se fait au microscope à épifluorescence à l'aide d'un micromètre oculaire à réseauté $10^4 \mu^2$ et 10×10 carrés. Dix champs sont comptés ; on en effectue la moyenne que l'on ramène à 1 ml d'échantillon non dilué en multipliant par $4,810^7$ (pour une dilution 10^{-4} et un volume filtré de 5 ml).

3.3. Numération des bactéries cellulolytiques (BCA)

La composition du milieu est donnée en annexe (annexe 7). La préparation du milieu est la même que celle décrite au paragraphe 1.2.1. mis à part qu'on ajoute seulement 3 ml par tube de Hungate. Avant emploi, on fait bouillir les tubes et on les incube dans un bain-marie à 45° . Les tubes sont ensemencés avec 0,2 ml d'inoculum par tube. Une fois ensemencés, les tubes sont tournés selon la technique du "roll-tube" (39). On passe sur le tube en rotation un glaçon pour solidifier l'agar qui s'est réparti le long des parois internes du tube.

Cette technique possède un double avantage :

- a) une visualisation et une numération rapide des colonies en phase de croissance grâce aux plages de lyse de la cellulose
- b) un isolement rapide des colonies qui sont bien individualisées sur le tube.

L'incubation dure de 2 à 3 mois.

3.4. Numération des bactéries fixatrices d'azote (BFN)

Le milieu décrit en annexe 13 est un milieu azote-free (72). La nitrogénase est inhibée par de fortes concentrations d'oxygène. Le milieu contient donc de la gélose molle qui permet la croissance des bactéries dans des conditions de microaérophilie. Quand apparaît une croissance bactérienne (trouble du milieu) on ajoute

2 % d'acétylène dans l'atmosphère (4 dans 72).

3.5. Numération des bactéries méthanigènes

Le milieu de base utilisé est celui de Balch et al (1979), légèrement modifié (rapport en cours) par l'adjonction de NiCl_2 et de sélénite de sodium (annexe 10) qui permettent la croissance de certaines méthanigènes sous-évaluées précédemment. Une distinction a été effectuée selon les sources de carbone et d'énergie qu'utilisent ces bactéries. Elles répartissent en :

- . bactéries méthanigènes totales (BMT) qui utilisent comme source de carbone et d'énergie
 - acétate de Na 2,5 g/l
 - formate de Na 2,5 g/l
- gazage des tubes avec H_2/CO_2 1,5 atm

- . bactéries méthanigènes acétoclastes (BMA) qui utilisent
 - acétate de Na 8 g/l (0,1M)
- gazage des tubes avec N_2/CO_2 0,5 atm

Après trois semaines d'incubation, l'atmosphère des tubes présentant une croissance est analysée par chromatographie en phase gazeuse pour déceler la présence de CH_4 . On utilise un chromatographe à détection par ionisation de flamme (FID) dans les conditions suivantes :

- . colonne acier inox 30 cm x 1/8" remplie de carbone moléculaire

- . température injecteur : 115°C
- . température colonne : 190°C
- . température détecteur : 250°C

- . débit gaz vecteur N_2 : 25 ml min.
- . débit H_2 : 30 ml min.
- . débit air : 300 ml min.

3.6. Numération des bactéries acidifiantes

La composition de base du milieu (annexe 9) est la même que celle des méthanigènes auquel on ajoute un indicateur coloré, le bleu de bromothymol.

De même que pour les méthanigènes une distinction est faite pour ces bactéries en fonction de leur source de carbone et d'énergie :

- . bactéries acidifiantes fermentant le glucose
(BFC) glucose 5 g/l

- . bactéries acidifiantes fermentant le lactate
(BUL) lactate 5 g/l

Les tubes de Hungate sont gazés en N_2-CO_2 (80-20 %) jusqu'à 0,5 atm.

La croissance des bactéries est indiquée par le virage au jaune de l'indicateur coloré, témoin de l'acidification du milieu.

3.7. Numération des bactéries sulfato-réductrices

La numération des bactéries sulfato-réductrices est une donnée intéressante, en raison de leur compétition avec les méthanigènes pour le flux d'électrons servant à la réduction des substrats.

La technique de numération a été mise au point par Mouraret (54) à l'ORSTOM.

Sur une rampe de filtration, on place trois filtres millipores (du type HA 0,45 μ). Sur chacun des filtres on verse 50 ml d'une solution à 10^{-2} , on ouvre le vide. La filtration finie, à l'aide d'une pince, on enroule un filtre qu'on introduit dans un tube à vis (tube Kimax 125 x 16) contenant du milieu SU (annexe 12) jusqu'au col. On visse le bouchon soigneusement sans laisser de bulle d'air. On incube à 30°C et on note le nombre de jours nécessaires au noircissement du milieu. On se réfère ensuite à une courbe donnant le \log du nombre initial de bactéries en fonction du nombre de jours d'incubation, établie avec une souche pure de collection. Selon le substrat carboné utilisé, on a différencié :

- . bactéries sulfato-réductrices du groupe 1 et 2 (BSR 1 + 2). Les bactéries du groupe 1 oxydent le lactate en acétate qui est consommé par les bactéries du groupe 2 (schéma 1)
lactate de sodium à 60 % ...6 ml/l
- . bactéries sulfato-réductrices du groupe 2 (BSR 2) acétate de Na 6 g/l

3.8. Numération des bactéries dénitrifiantes

Le milieu utilisé (cf. annexe !!) possède certaines caractéristiques:

- . Il ne contient pas de sulfates pour empêcher la croissance des bactéries sulfato-réductrices.
- . Il ne contient pas de sucres fermentescibles pour empêcher la croissance des bactéries acidifiantes.
- . Les bactéries qui utilisent l'acétate ne poussent pas car il n'existe pas de pompe à hydrogène.

Le seul réducteur employé est la cystéine-HCl. Les tubes sont gazés avec de l'azote pur sous une pression de 0,3 atm. Après ensemencement, on ajoute 1 ml d'acétylène dans l'atmosphère de chaque tube avant incubation.

L'atmosphère des tubes qui présentent une croissance est analysée par chromatographie en phase gazeuse (86) pour déceler la présence de N₂O dont la réduction est bloquée par l'acétylène on utilise un chromatographe à détection par conductibilité thermique (TCD) dans les conditions suivantes :

- . température colonne : 85 °C isotherme
- . température injecteur : 105 °C
- . température détecteur : 105 °C
- . courant filaments : 250 mA
- . débit gaz vecteur He : 45 ml/min.
- . 2 colonnes acier inox 180 m x 1/8" remplies de carbosphère 60-80 mesh. Dans ces conditions, le

temps d'élu-tion de N_2O est de 7 min.

3.9. Numération des bactéries anaérobies strictes non oxygène-sensibles (BANOS) (cf. photo 12b)

Le milieu est le même que celui des bactéries acidifiantes fermentant le glucose (cf. annexe 9). On y ajoute de l'agar (5 g/l) en refaisant bouillir le milieu quelques instants avant de la répartir en tube de 16 (14 ml/tube).

Avant l'inoculation, on place les tubes au bain-marie bouillant puis on les incube dans un main-marie à 45°. On les ensemence à l'air (0,3 ml d'inoculum/tube) puis on les coule dans des tubes-vanille de Raibaud. Les bactéries ont donc été en contact avec O_2 mais sont incubées dans des conditions d'anaérobiose stricte. Seules pourront croître celles qui ne sont pas sensibles à l'oxygène. De même que pour les bactéries acidifiantes, les tubes sont comptés comme positifs quand il y a acidification du milieu, indiquée par le virage du vert au jaune du bleu de bromothymol. On peut également compter les colonies dans les tubes contenant les dilutions extrêmes.

3.10. Numération des bactéries anaérobies strictes oxygène-sensibles

Le milieu est identique au précédent, mais les boîtes de Pétri sont préparées et ensemencées dans la boîte à gants anaérobie. Elles sont ensuite placées dans un cylindre haute pression (cf. 1.1.3.) et gazées avec un mélange N_2-CO_2 (80-20 %). le dénombrement des colonies donne le nombre total des bactéries anaérobies. Pour avoir le nombre de bactéries oxygène-sensibles, il faut soustraire celui des bactéries anaérobies non oxygène-sensibles.

3.11. Numération des bactéries anaérobies facultatives

Elle s'effectue en boîte de Pétri sur agar nutritif. On étale en surface 0,2 ml de chaque dilution. Les colonies sont comptées sous une loupe binoculaire après quelques jours d'incubation en aéro-biose.

On a également recherché les actinomycètes qui semblent être une population importante du tractus digestif du termite. Le milieu

utilisé (cf. annexe 14) est un milieu minimum qui permet la croissance des actinomycètes moins compétitifs, dont la croissance est plus lente que les autres bactéries. Le milieu contient également un antifongique.

4. ISOLEMENT DES SOUCHES BACTERIENNES

4.1. Bactéries anaérobies facultatives

Elles sont isolées sans aucune précaution vis-à-vis de l'oxygène. Les colonies obtenues sur boîte de Pétri sont étalées sur de nouvelles boîtes. L'opération est répétée plusieurs fois jusqu'à purification des souches. Une fois isolées, les souches sont conservées sur gélose nutritive inclinée en pilulier à vis à 4°C.

4.2. Bactéries anaérobies strictes

On les isole à partir des boîtes de Pétri incubées en anaérobiose dans les containers spéciaux, à partir des tubes de numération des bactéries acidifiantes et à partir des tubes de Raibaud employés pour la numération des bactéries non oxygène-sensibles. Pour les colonies en boîte de Pétri, la procédure est la même que celle employée pour les bactéries anaérobies facultatives, à la seule différence que toutes les opérations sont effectuées dans la hotte anaérobie. Les souches pures sont conservées sur gélose inclinée en tube de Hungate sous atmosphère de N₂-CO₂ (80-20 %).

Pour le repiquage des colonies en tube de Raibaud, il suffit de couper le tube légèrement au-dessus de la colonie et de transférer celle-ci dans un tube de Hungate contenant 5 ml du même milieu liquide. Ces tubes sont ensuite gazés en N₂/CO₂ (80-20 %). Après 24 ou 48 h selon le temps de croissance, on rentre les tubes dans la hotte et les étale sur boîte de Pétri gélosée. La procédure est ensuite la même que pour les bactéries oxygène-sensibles.

5. ETUDE DES SOUCHES BACTERIENNES ISOLEES

5.1. Bactéries anaérobies facultatives

5.1.1. Morphologie

Les caractéristiques morphologiques telles que la forme, la taille, la présence et la forme des spores, la mobilité sont déterminées par un examen au microscope optique.

5.1.2. Caractéristiques biochimiques

L'étude est faite grâce à l'utilisation du système api 20 E (API-SYSTEM, La Balme-les-Grottes) qui permet la recherche de 22 caractères biochimiques.

Pour chaque souche, on effectue également une coloration de Gram.

5.2. Bactéries anaérobies strictes

L'étude de ces bactéries consiste à effectuer la coloration de Gram ainsi que les observations morphologiques classiques. Les caractéristiques biochimiques sont étudiées à l'aide de galeries api 20 A (spécial anaérobies strictes).

A.G.V.

On analyse également les acides gras volatils issus de la fermentation. Les souches isolées sont cultivées en milieu liquide (annexe 9). Avant analyse, on ajoute 20 µl de H₃PO₄ à 50 % puis on centrifuge le milieu pendant 5 min. Le surnageant est analysé par chromatographie à ionisation de flamme (varian série 2700).

Les caractéristiques sont les suivantes :

- . colonne acier inox de 2,70 m x 1/8" remplie de chromosorb WAW 80-100 mesh, imprégnée de 25 / NPGA (néopentylglycol adipate) et 2 % H_3PO_4
- . température colonne : 190°C isotherme
- . température injecteur : 200°
- . température détecteur : 245°
- . gaz vecteur N_2 débit : 17 ml/min.
- . injection : 2 μ l de l'échantillon

L'étalonnage est réalisé à l'aide d'une solution étalon contenant 1 ml de chacun des A.G.V. pour 100 ml d'eau.

6. RESULTATS ET DISCUSSION

6.1. Numération des populations bactériennes

Les numérations ont été effectuées avec de légères améliorations de protocole à chaque inoculation :

- . utilisation de billes de verre, lors de la 2ème inoculation, dans les tubes de dilution pour permettre une meilleure homogénéisation de l'inoculum
- . 3ème inoculation effectuée avec 20 tubes digestifs au lieu de 10 pour les deux précédentes.

Les résultats sont rassemblés dans le tableau 1.

La population totale est de l'ordre de 10^6 bactéries par tube digestif, si on admet que le volume de l'intestin chez cette espèce n'excède pas 1 μ l (Nasutitermes arborum étant une des espèces les plus petites), on arrive à une population de 10^9 bactéries/ml. (73) (60)

Ces chiffres sont peut-être surestimés, car une confusion reste toujours possible entre certaines formes bactériennes et les

nombreux débris lors du comptage par épifluorescence. Néanmoins, la bonne répétabilité des deux résultats trouvés montrent la fiabilité de cette méthode.

. bactéries anaérobies facultatives (BAF)

Elles constituent une population importante du tube digestif, environ 10 %. Leur proportion est donc sensiblement supérieure à celle que l'on rencontre habituellement dans les fermenteurs (1 %). Mais il faut signaler que les numérations sur boîte de Pétri sont moins reproductives que celles effectuées en milieu liquide avec la méthode statistique de McCrady. Ceci est dû en particulier aux différentes cinétiques de croissance des bactéries sur milieux solides. La présence toujours possible d'une colonie envahissante rend le comptage imprécis.

. bactéries fermentatives (BUL + BFG)

Elles constituent la population bactérienne la plus nombreuse (68 %). La majorité d'entre elles fermentent le glucose (75 %).

. bactéries méthanigènes totales et acétoclastes (BMA + BMT)

Sur les trois numérations, seule la première donna un résultat positif, ceci malgré l'augmentation de la densité de l'inoculum, lors de la troisième inoculation. Ce résultat pourrait s'expliquer :

- a) soit par une disparition de la flore méthanigène lors de la captivité des termites,
- b) soit par le milieu utilisé qui ne contiendrait pas tous les facteurs de croissance nécessaires.

La première hypothèse a été rejetée par la mesure de l'émission de méthane in vivo chez les termites captifs. 40 termites ont été enfermés dans un flacon à bouchon-septum et l'émission de méthane a été testée au bout de 5 jours par rapport à un flacon

témoin contenant les mêmes supports (bois + sable). Les termites ont produit 0,35 µg de CH₄/termite par jour. Ce résultat est compatible avec les taux mesurés par d'autres auteurs (70) (87) chez la même famille de termite.

La seconde hypothèse implique que les termites possèderaient une flore méthanigène spécifique, car le milieu utilisé pour les numérations contient tous les facteurs nécessaires à la croissance des méthanigènes connus.

. bactéries anaérobies totales (BAT)

Cette numération a posé les mêmes problèmes que ceux évoqués pour les bactéries anaérobies facultatives, une inoculation supplémentaire a été nécessaire, afin d'avoir deux chiffres de numération significatifs. Pour calculer le nombre de bactéries anaérobies strictes sensibles à l'oxygène, on retranche généralement à ce nombre d'anaérobies totales les bactéries poussant sur le milieu de numération des bactéries non oxygène-sensibles (BANOS). Dans notre cas, le milieu liquide correspondant (BFG) a donné des résultats plus reproductibles, le nombre de bactéries anaérobies strictes a donc été calculé par différence entre la numération du milieu BFG et celle du milieu BANOS. Il représente 38 % de la microflore totale de la panse de termite.

. bactéries fixatrices d'azote

Les colonies quantifiées poussent dans un milieu sans azote et en microaérophilie, ce qui permet à l'activité fixatrice de N₂ de s'exprimer (la nitrogénase est inhibée par l'oxygène). Pourtant, la confirmation de la fixation de l'azote par le test de réduction d'acétylène en éthylène (ARA) s'est révélée négative. Ceci peut être dû :

- soit à la faible proportion de bactéries présentes par tubes de dilution
- soit à une forte réduction de la capacité de fixation chez ces termites lors de leur captivité, comparable à celle mesurée par Breznack (cf. partie bibliographique) (15).

Une mesure in vivo du taux de fixation de l'azote par le termite serait nécessaire pour confirmer la présence de bactéries fixatrices d'azote dans cet organisme. Je n'ai pu l'effectuer à cause de la mort prématurée de ma colonie de termites.

- . bactéries sulfato-réductrices (BSR₂, BSR₁₊₂),
bactéries dénitrifiantes BDN, bactéries cellulolytiques anaérobies (BCN), actinomycètes anaérobies (ACN)

Aucune croissance n'a été observée dans aucun de ces milieux. Dans le cas des bactéries cellulolytiques, cette absence de croissance en milieu anaérobie et aérobie confirme les résultats obtenus par d'autres auteurs (10) (17) chez les termites supérieurs. Les bactéries sulfato-réductrices, souvent associées aux bactéries méthanigènes dans les digesteurs, semblent également absentes. Aucune dénitrifiante anaérobie n'a été quantifiée ainsi qu'aucun actinomycète anaérobie. Les actinomycètes aérobies ont été trouvés dans un milieu approprié (milieu pauvre ACA) mais pas assez spécifique pour permettre leur quantification.

6.2. Isolement et caractérisation des souches

6.2.1. Avant-propos

On a isolé 54 souches pures à partir des différents milieux utilisés. Parmi elles, 21 sont apparues différentes lors de la caractérisation des souches isolées. Cette caractérisation reste cependant partielle, le but de notre étude étant d'avoir une qualification globale des populations bactériennes habitant la panse du termite.

6.2.2. Bactéries anaérobies facultatives

Selon les critères de classification du "Bergey's Manual of Bacteriology" on a distingué trois groupes:

6.2.2.1. Bactéries sporulées

Ce sont des bacilles du groupe 2 dont les caractéristiques sont décrites dans les tableaux II et III. Ils possèdent une spore ovale subterminale déformante (cf. photos 13) et forment des chaînes qui prennent l'apparence de longs filaments (cf. photo 14). Ils constituent la majorité des bactéries anaérobies facultatives trouvées.

6.2.2.2. Cocci anaérobies facultatifs

Ils sont tous fermentatifs et une souche fermente le glucose avec dégagement de gaz (cf. tableau IV et V). Ce sont, pour la plupart, des microcoques en amas (cf. photo 15) ou des diplocoques (cf. photo 16) du genre staphylocoques. Ils proviennent presque totalement des milieux de numération préréduits tels que BASOS et BANOS, alors que les bacillus proviennent principalement des milieux aérobies (BAF).

6.2.2.3. Bacilles asporulés

Ils constituent le groupe le plus hétérogène (cf. tableau VI et VII) et sont caractérisés par un grand polymorphisme de taille chez de nombreuses souches. Parmi ces souches on trouve les actinomycètes (cf. photo 17) qui semblent, d'après les photographies en microscopie à balayage, constituer une population importante de la microflore du termite. Les souches telles qu'Enterobacter lactobacillus, Flavobacterium, ont été trouvées chez le termite, mais elles ne semblent pas constituer chez ce termite la flore dominante.

6.2.3. Bactéries anaérobies strictes

Parmi les 24 souches isolées, toutes se sont révélées être des clostridium à spores ovales déformantes subterminales. Les caractéristiques sont rassemblées dans les tableaux 8, 9, 10. La classification effectuée selon les critères de Holdemann et Moore (35) a permis d'identifier la plupart des souches comme étant des C. bifermentans ou C. sordellii. Ils sont tous producteurs d'acétate et généralement d'isovalérate. Une seule souche (S 19) fermente le glucose en propionate et acétate.

T A B L E A U I

	NUMFRATION : bactéries / tube digestif			
	I ₁	I ₂	I ₃	Moyenne
BT	$5,4 \cdot 10^5$	10^6	inc	$7,5 \cdot 10^5$
BAF	$1,7 \cdot 10^5$	10^6	$1,1 \cdot 10^4$	$6 \cdot 10^4$
BUL	nd	$3,10^5$	$7,5 \cdot 10^4$	$1,8 \cdot 10^5$
BFG	nd	$4,5 \cdot 10^5$	$2,2 \cdot 10^5$	$3,3 \cdot 10^5$
BMA	10^4	100	100	100
BMT	$5 \cdot 10^3$	100	100	100
BANOS	$1,3 \cdot 10^5$	$1,5 \cdot 10^3$	$2,5 \cdot 10^3$	$4,4 \cdot 10^4$
BAT	$6,5 \cdot 10^4$	inc	$2,75 \cdot 10^4$	$4,6 \cdot 10^4$
BAT - BASOS BANOS	-	-	$7,5 \cdot 10^3$	$2 \cdot 10^3$
BFN	$4,25 \cdot 10^2$	$7,5 \cdot 10^2$	$4,25 \cdot 10^2$	$5,30 \cdot 10^2$
ACN	< 100	< 100	< 100	< 100
BS°R	< 100	< 10	< 10	
BSR ₁₊₂	< 100	< 10	< 10	< 10
BSR ₂	< 100	< 10	< 10	
BDN	< 100	< 100	< 100	< 100

Numération des différentes populations bactériennes

inc = incomptable

nd = non déterminé

BT = bactérie totale

BAF = bactérie anaérobie facultative

BUL = bactérie utilisant le lactate

BFG = bactérie utilisant le glucose

BMA = bactérie méthanigène

acétoclastique

BDN = bactérie dénitrifiante anaérobie

BMT = bactérie méthanigène totale

BANOS = bactérie anaérobie non O₂ sensible

BASOS = bactérie anaérobie O₂

BFN = bactérie fixatrice de N₂

ACN = bactérie cellulolytique anaérobie

TABLEAU I I

CARACTERES MORPHOLOGIQUES - BACILLES SPORULES ANAEROBIES FACULTATIFS

COLONIE	B 13	B 46	N 15	S 31	A 12	F 1
PIGMENT	translucide	translucide, légèrement bleutée	blanche	translucide	translucide	translucide
BORD	régulier	régulier	régulier	multilobée	régulier	déchiqueté
ASPECT	petite, plate,	petite, plate, indurée	plate, envahissante	indurée	plate	plate
CELLULE						
MORPHOLOGIE	bacille court et épais	bacille court	bacille court	bacille court et épais	bacille court	bacille court et épais
DISPOSITION	isolé ou en chaîne	chaîne	longues chaînes (\sim 30)	longues chaînes filament (?)	longues chaînes	longues chaînes ou paires
LONGUEUR	1 x 2-3 μ	0,5 x 3 μ	0,5 x 3-4 μ	0,5 x 3-10 μ	1 x 3-4 μ	1 x 3-4 μ
MOBILITE	-	(+)	(+)	(+)	(+)	-
SPORE	sub T, ovale def	sub T, ovale def	sub T, ovale def	sub T, ovale def	sub T, ovale def	sub T, ovale def
GRAM	-	-	-	-	-	-

T A B L E A U I I I
 BACILLES SPORULES ANAEROBIES FACULTATIFS - CARACTERES BIOCHIMIQUES

T E S T	SOUCHES					
	B 13	B 46	N 15	S 31	A 12	F 1
GLU	+	+	-	+	+	+
NIT	+	+	+	-	+	+
OX	-	-	f	+	+	-
CAT	+	+	+	+	+	+
ONPG	-	+	+	+	+	+
ADH	+	+	+	+	+	+
LDC	f	-	-	f	-	-
ODC	-	-	-	-	-	-
CIT	+	v	+	+	-	-
H ₂ S	-	-	-	-	-	-
URE	-	-	+	+	-	-
TDA	-	-	-	-	-	-
IND	-	-	-	-	-	-
VP	-	-	+	+	+	+
GEL	+	-	+	+	-	+
MAN	+	+	+	-	+	+
INO	-	-	-	-	-	-
SOR	-	+	-	-	-	-
RHA	+	+	+	-	+	-
SAC	+	+	-	+	+	+
MEL	+	+	-	-	-	-
AMY	+	+	+	+	+	+
ARA	+	+	+	+	+	+
N ₂	-	-	-	+	-	+
Espèce présumée	Bacillus du groupe 2					

f = coloration faible

v = variable

T A B L E A U I V

CARACTERES MORPHOLOGIQUES - COCCI ANAEROBIES FACULTATIFS

ASPECT MACROSCOPIQUE	C 1	C 2	C 3	C 4
PIGMENT	orange	orange - blanche	translucide	jaune
BORD	régulier	guiochée	régulier	régulier
ASPECT	bombée	bombée	petite, plate	petite, isolée, en dôme
ASPECT MICROSCOPIQUE				
MORPHOLOGIE	cocci	microcoques	cocci	microcoques
DISPOSITION	paire ou chaîne	grappe	en paire	en amas
LONGUEUR	1 μ	0,5 - 1 μ	1 μ	0,5 - 1 μ
MOBILITE	-	-	-	-
SPORE	-	-	-	-
GRAM	+	+	V	-

T A B L E A U V

COCCI ANAEROBIES FACULTATIFS

	C 1	C 2	C 3	C 4
GLU	+	+	+	+
NIT	-	-	-	-
OX	v	-	+	nd
CAT	-	nd	+	nd
ONPG	+	+	+	-
ADH	+	+	+	+
LDC	-	+	-	-
ODC	-	+	-	-
CIT	-	+	-	+
H ₂ S	-	-	-	-
URE	-	+	+	+
TDA	-	-	-	-
IND	-	-	-	-
VP	+	-	+	+
GEL	-	+	-	+
MAN	+	-	-	-
INO	-	-	+	-
SOR	+	-	+	-
RHA	+	-	+	-
SAC	+	-	-	+
MEL	v	-	+	-
AMY	+	-	+	-
ARA	+	-	+	-
N ₂	+	-	-	-
Espèce présumée	Str	gaz +	Sta	

Str: Streptocoques
 Sta: Staphylocoques

T A B L E A U V I

CARACTERES MORPHOLOGIQUES - BACILLES ASPORULES ANAEROBIES FACULTATIFS

COLONIE	A 110	A 19	A 15	B 44	A 17	F 3	F 5	F 6
PIGMENT	orange	blanche	blanche	orange	blanche	blanche	translucide	translucide
BORD	régulier	régulier	régulier	régulier	régulier	régulier	régulier	régulier
ASPECT	petite, bombée	opaque, mielleuse	neigeuse, indurée	indurée	petite, par 2	petite, bombée	petite, plate	envahissante
CELLULE								
MORPHOLOGIE	bacille court et fin	bacille court	filament	filament	coccobacille	coccobacille	bâtonnet fin et court	coccobacille
DISPOSITION	amas	paire	amas	amas	amas	paire	isolé	chaîne
LONGUEUR	0,5 x 2-3 μ	0,5 x 2-4 μ	1 x 10-50 μ		0,5 x 2 μ	0,5 x 1 μ	0,5 x 1,5 μ	0,5 x 1,5-2 μ
MOBILITE	-	-	-	-	-	-	-	+
SPORE	-	-	-	-	-	-	-	-
GRAM	-	-	+	+	v	-	+	v

T A B L E A U V I I
 BACILLES ASPORULES ANAEROBIES FACULTATIFS
 CARACTERES BIOCHIMIQUES

T E S T	SOUCHES							
	A 110	A 19	A 15	B 44	A 17	F 5	F 3	F 6
GLU	+	+	+	-	+	+	-	-
NIT	+	-	+	-	-	-	+	-
OX	-	-	-	+	+	+	-	+
CAT	+	+	nd	+	nd	-	+	+
ONPG	+	+	-	-	-	-	-	-
ADH	-	+	-	f	+	+	+	+
LDC	-	-	-	f	-	-	-	+
ODC	-	-	-	f	-	-	-	-
CIT	+	+	-	+	+	-	+	+
H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-
URE	-	-	-	+	-	-	f	+
TDA	-	-	-	-	-	-	-	-
IND	-	-	-	-	-	-	-	-
VP	+	v	+	+	-	+	+	-
GEL	-	+	-	+	+	-	-	-
MAN	+	-	-	-	f	+	+	+
INO	-	nd	-	-	-	-	-	-
SOR	+	nd	-	-	-	-	-	-
RHA	-	nd	-	-	-	+	+	+
SAC	+	nd	-	-	-	+	+	+
MEL	+	nd	-	-	+	+	+	-
AMY	+	nd	-	f	-	+	+	+
ARA	-	nd	-	f	+	+	-	-
N ₂	+	nd	-	+	-	+	+	+
Genre ou espèce présumé	Ente- robac- ter	Fla- vobac- terium	Actinomyces		Lactobacillus		Ind	

f = faible

nd = non déterminé

TABLEAU VIII

CARACTERES MORPHOLOGIQUES - BACILLES SPORULES ANAEROBIES STRICTES

COLONIE	S 35	N 14	N 13a	S 32b	L 32	S 16
PIGMENT	orange	translucide	orange	orange	jaune	orange - jaune
BORD	lisse	frangé	régulier	irrégulier	régulier	irrégulier
ASPECT	en dôme, miel	envahissante	bombée	flaque	ronde, bombée	bombée
CELLULE						
MORPHOLOGIE	bacille moyen épais	bacille large polymorphe	bacille court et épais	long bacille	bacille bout arrondi, court	bacille court et épais
DISPOSITION	isolé ou en chaînes	chaîne, branché	chaîne (filament)	chaîne, type filaments	paire ou isolé	paire ou amas
LONGUEUR	1 x 3-5 μ	1 x 3-7 μ	1 x 2-4 μ	1 x 5-10 μ	1-1,5 x 3-4 μ	0,5 x 3-5 μ
MOBILITE	(+)	-	-	-	+	-
SPORE	spore ovale sub T def	spore ovale sub T	spore ovale sub T à T	ovale, sub T def	ovale sub T def	ovale sub T
GRAM	-	-	-	v	v	-

v = variable

TABLEAU IX

CARACTERES MORPHOLOGIQUES - BACILLES SPORULES ANAEROBIES STRICTES

COLONIE	S 11	S 15	L 25a	S 19
PIGMENT	orange	incolore	jaune	orange
BORD	régulier	régulier	régulier	régulier
ASPECT	ronde	étalé	indéfini, étalé	petite, en dôme
CELLULE				
MORPHOLOGIE	bacille polymorphe détaillé	bacille court	bacille court à bout rond	bacille épais et court
DISPOSITION	chaînes (8-10 éléments)	paires	isolé ou paires	chaînes (2 à 6 éléments)
LONGUEUR	1 x 3-12 μ	0,5 - 2-4 μ	0,5 x 2-3 μ	1 x 3-10 μ
MOBILITE	-	-	-	-
SPORE	spore ovale sub T	spore ovale sub T	spore ovale sub T ou T	spore ovale sub T ou T
GRAM	-	-	V	+

BACILLES SPORULES ANAEROBIES STRICTES - CARACTERES BIOCHIMIQUES

		S13	N14	N13a	S32	S11	S16	L32	S19	S 15	L25a
IND		+	+	+	+	+	-	+	-	-	+
URE		+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
GLU		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MAN		-	-	-	-	+	+	-	+	+	+
LAC		-	-	-	-	+	f	-	+	+	-
SAC		-	-	-	-	+	-	-	+	+	-
MOL		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SAL		-	-	-	-	+	+	-	+	+	+
XYL		-	-	-	-	+	+	-	+	+	+
MRA		-	-	-	-	f	-	-	+	+	+
GEL		+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
ESC		+	+	+	+	-	+	+	-	+	+
GLY		v	-	-	-	-	+	-	-	+	-
CEL		-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
MNE		+	+	-	+	+	+	+	+	f	+
MLZ		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RAF		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SOR		-	f	-	-	-	-	-	-	-	-
RHA		-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
TRE		-	-	+	-	f	+	+	+	-	+
CAT		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A	A	++	++	++	++	++	++	++	++	++	nd
	P	-	-	-	-	-	-	-	+	-	nd
G	IB	-	-	-	+	-	+	-	-	+	nd
	B	-	+	-	-	-	-	-	-	+	nd
V	IV	+	+	+	+	+	+	+	-	+	nd
	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nd
Espèce présumée		Clostridium bifermentans ou "				Esp. indét	C. sph.	Clos. bif.	Espèce indéterminée		

C. bif. = Clostridium bifermentans

C. sph. = sphénoïdes

A. : Acétate B: Butyrate

P : Propionate IV: Isovalérate

IB : Isobutyrate V: Valérate

Photo.13 Bacillus Type 2 (Spore ovale déformante)

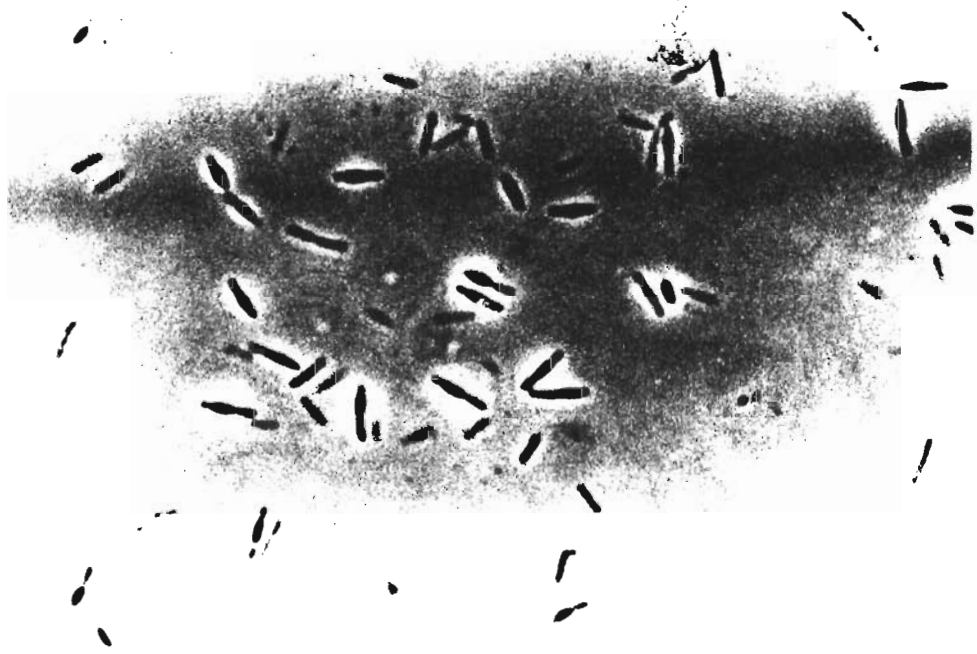


Photo.14 Filament sporulés (Bacillus)

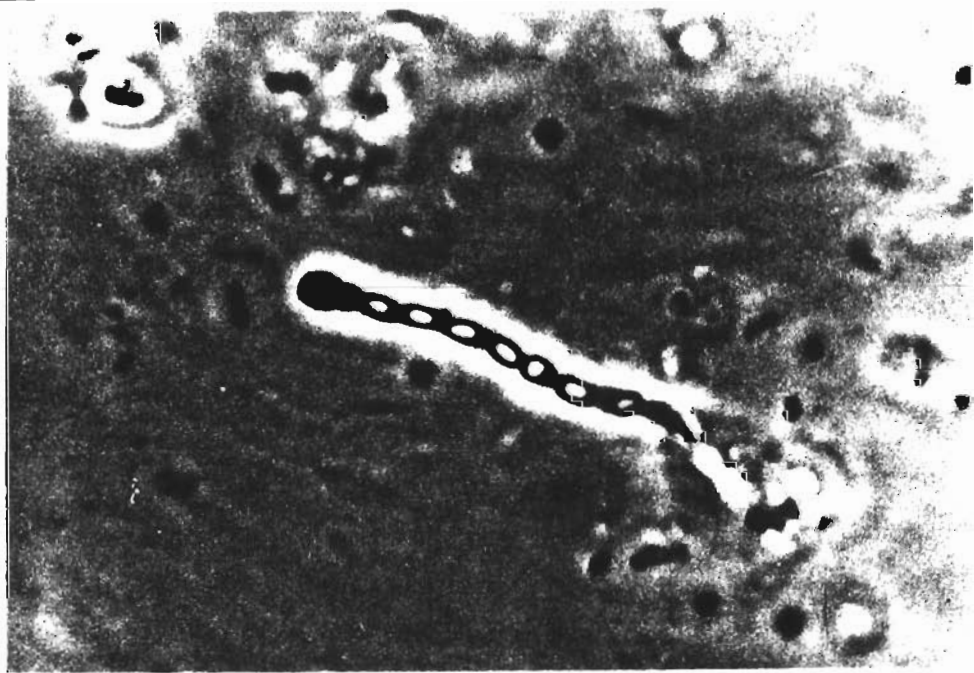


Photo.15 Micrococques en amas (Staphylocoques)

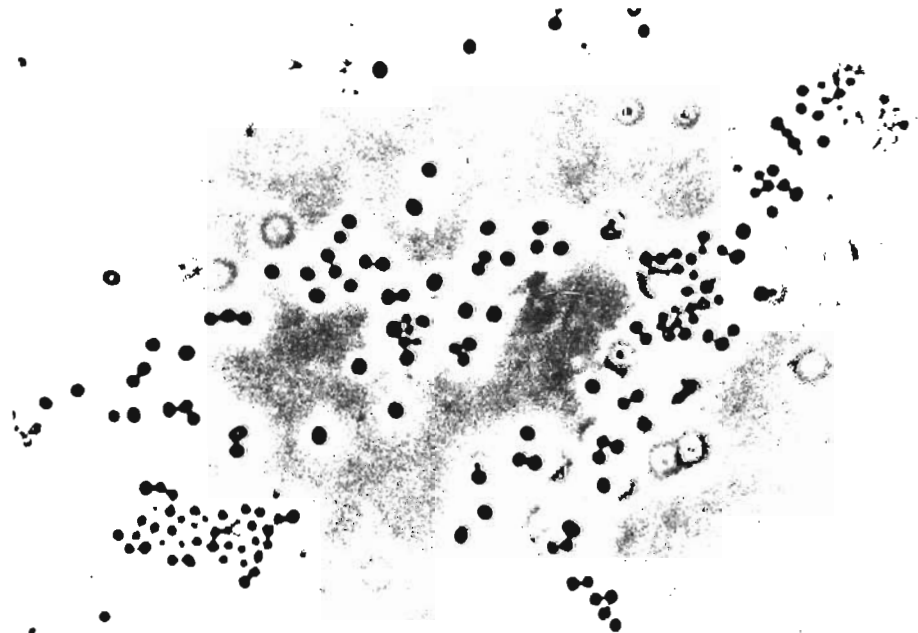


Photo. 16

Diplocoques



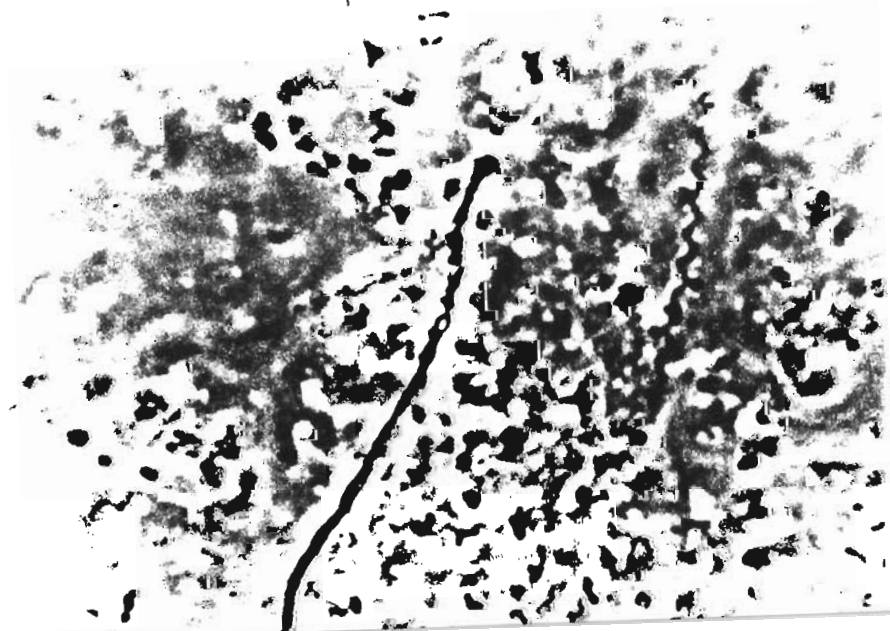
Photo. 17

Actinomycetes



Photo. 18

Spirochetes



7. DISCUSSION ET CONCLUSION

La microscopie à balayage a montrée l'abondance des formes filamenteuses et leurs interactions avec le bol alimentaire. Il serait intéressant de déterminer maintenant si les bactéries et les champignons proviennent du bois partiellement décomposés par les moisissures et les bactéries exogènes, où s'ils sont d'origine endogène comme chez les termites humivores (C. severus) (9).

Les bactéries non filamenteuses ne peuvent se visualiser qu'en l'absence du bol alimentaire, elles ne sont donc présentes que près de la membrane, ce qui laisserait supposer qu'il existe une forme d'interaction entre les bactéries et la membrane épithéliale. Cette hypothèse n'a pû être confirmée car nos procédés de fixations n'ont pû respecter la structure de la membrane. Il faut rappeler que ces interactions ont été mises en évidence par BREZNACK (13). Il a montré qu'il existait des sites d'agrégations bactériens au niveau de microcupules de l'épithélium. L'étude et la mise en évidence (grâce au M.E.T) de sites équivalents chez les termites supérieurs, où il n'existe pas de cupules, seraient un pas important vers la connaissance des modèles d'interactions biochimiques entre la microflore et leur hôte.

L'hétérogénéité et l'abondance de la flore, montrées par la microscopie électronique à transmission a été confirmé par les résultats obtenus lors de la numération et de la qualification des bactéries de l'intestin du termite.

Le nombre de bactéries total ($7,5 \cdot 10^5$) est proche de celui obtenu chez d'autres espèces (70) (46) (24).

La numération obtenue chez un termite du même genre, Nasutitermes exitiosus a donné une concentration de bactéries comprise entre $5 \cdot 10^6$ et $3 \cdot 10^7$ (24), fourchette dans laquelle se retrouve notre numération. Ces auteurs n'ont pû isoler

de bactéries anaérobies strictes alors qu'elles constituent dans notre étude 38 % de la population totale. Ceci confirme l'hypothèse de l'atmosphère anaérobie de la panse (60).

La population bactérienne qualifiée est sensiblement différente de celle trouvée chez les autres espèces de termites étudiées. Si on retrouve chez N. arborum comme chez N. exitiosus (24) une population importante de cocci, notamment des staphylocoques, la population majoritaire de bacilles rencontrée est constituée de clostridijs et de bacillus, alors qu'elle est constituée d'entérobacter chez Rhinotermitidae (termite inférieur) et de bactéroïdes (anaérobies strictes) d'entérobacter chez Reticulitermes flavipes (72) de bacillus cereus et d'arthrobacter chez Reticulitermes hesperus (76). Ceci confirme l'hypothèse émise par NOIROT (56) en 1959. " Si la flore bactérienne est présente chez tous les termitidae, elle ne semble pas homologue ou du même type d'association ".

Les expériences effectuées ne nous ont pas permis de différencier les bactéries spécifiques des bactéries en transit avec le bol alimentaire ; cependant le fait que les staphylocoques et streptocoques se soient retrouvés à chaque inoculation dans tous les milieux, et particulièrement dans les milieux pour anaérobies strictes alors que les bacillus et les bacilles asporulés (Enterobacteriaceae, Flavobacterium, Lactobacillus) n'ont poussés que dans les milieux pour anaérobies facultatives suggère que les streptocoques et staphylocoques ainsi que les clostridium constituent la flore spécifique de l'intestin postérieur anaérobie de ce termite. Cette hypothèse pourrait être confirmée par la qualification des bactéries colonisant le substrat et les feces du termite ainsi que

par une qualification spécifique à chaque stade du termite et dans chaque caste (ouvriers, soldats, sexués néoténiques).

Bien que les actinomycètes soient abondants dans le tube digestif (cf. observation au microscope électronique), nous n'avons pas pu les quantifier car le milieu utilisé s'est révélé peu spécifique. La numération de ce type de bactérie pose un problème du fait de leur croissance lente. Dans le tube digestif, ces bactéries croissent aisément car le flux continu de matière organique diminue les phénomènes de compétition qui se retrouvent dans un milieu de culture expérimental (aucune croissance d'actinomycète anaérobie n'a été détectée).

Nous n'avons réussi à isoler ni des bactéries méthanigènes ni des spirochètes. Ces derniers ont pu être visualisés en culture mixte dans les milieux de culture pour anaérobie strict (BASOS) (cf photo 12b) et oxygène tolérant (BANOS) ce qui suggère que les spirochètes du termite sont des bactéries anaérobies strictes oxygène tolérantes. Cette absence de croissance de ces bactéries est peut être due à l'emploi de milieu pas assez proche des conditions physicochimiques existant dans la panse. L'incorporation au milieu de culture d'extraits de termite permettrait un meilleur recouvrement des bactéries de la panse dont les exigences nous sont inconnues.

Ce travail pourrait être poursuivi dans plusieurs directions :

- 1 - Une voie microbiologique qui consisterait à qualifier plus complètement les espèces présentes grâce à l'emploi de milieux appropriés. Cette étude pourrait déboucher par exemple sur la qualification d'espèces nouvelles méthanigènes. Une application du pouvoir méthanigène des termites a été entreprise au Laboratoire

d'Energétique biochimique de M. Buvet, l'utilisation d'extrait de termitière comme pied de cuve pour fermenteur, donne des résultats encourageants (rapport en cours).

- . Etablir le rôle des différents groupes bactériens présents grâce à l'emploi de bactéricides spécifiques.
- . Mettre en évidence une évolution des populations symbiotiques du termite lors de sa captivité (Ex : perte de la capacité de fixation de l'azote).
- . Déterminer une population symbiotique spécifique des termites par la comparaison d'espèces ayant même habitat et même comportement alimentaire.

2 - Une voie biochimique

- . Etude des interactions biochimiques entre les bactéries symbiotiques par la mise au point de cultures mixtes in vitro.
- . Etude du métabolisme de certains polymères biologiques intéressants lignine, cellulose, hemicellulose par l'emploi d'indicateurs marqués.

Ce type d'étude permettrait non seulement de mieux connaître les interactions bactéries hôte, mais d'obtenir des informations importantes sur les stratégies écologiques à adopter pour la meilleure utilisation des ressources (bois) ou des procédés de bioconversion (méthane).

B I B L I O G R A P H I E

- (1) ARANKI, A AND FRETER, R.
Use of anaerobic glove boxes for the cultivation of strictly anaerobic bacteria.
Am.J.Clim.Nutr ; 1972,25 , 1329 - 1334
- (2) BALCH, W.E AND WOLFE, R.S
New approach to the cultivation of methanogenic bacteria : 2-m captoethane sulfonicacid (HS-COM) - Dependant growth of Methanobacterium ruminantium in a pressurized atmosphere.
Appl. environ Microbiol ; 1979, 43 , 260 - 296.
- (3) BALCH, W.E, FOX, O.E, MAGRUM, L.J, WOESE, C.R, AND WOLFE, R.S
Methanogens : reevaluation of a unique biological
Microbiol.rev ; 1979, 120 , 201 - 204
- (4) BAYON, C. and MATHELIN, J
Carbohydrate fermentation and by product absorption studied with labelled cellulose in Oryctes nasicornis larvae
J.Insect.Physiol ; 1980, 26 , 883 - 840
- (5) BAYON, C
Volatil fatty acid and methane production in relation to anaerobic carbohydrate fermentation in Oryctes nasicornis larvae
J.Insect Physiol ; 1980, 26 , 819 - 828
- (6) BERGEY
Bergey's Manuel of Bacteriology 8^e edition
- (7) BIGNELL, D.E, OSKERSSON, H, ANDERSON, J.M
Distribution and abundance of bacteria in the gut of a soil-feeding termite Procupitermes aburiensis
J of Gen Microbiol ; 1979,117, 393 - 403
- (8) BIGNELL, B.E, OSKARSSON, H, ANDERSON, J.M
Association of actinomycete - like bacteria with soil-feeding termites.
Appl. Environ Microbiol, 1939 ; 339 - 342

- (9) BIGNELL D.E, OSKARSSON H, ANDERSON J.M

Colonization of the epithelial face of peritrophic membrane and the ectoperitrophic space by actinomycetes in a soil-feeding termites

J. Invertebrate Pathology ; 1980, 36, 426 - 428

- (10) BREZNACK J.A

Biology of non pathogenic, host associated spirochetes.

C.R.C Crit. Rev. Microb ; 1973, 2, 457 - 489

- (11) BREZNACK J.A

Nitrogen fixation in termites

Nature ; 1973, 244, 577 - 80

- (12) BREZNACK J.A

Symbiotic relationships between termites and their intestinal microbiota

'Symbiosis' (Soc. Exp.Biol.Symp.Ser N° 29) Cambridge Univ. Press ; 1975, 559 - 80

- (13) BREZNACK J.A AND PANKRATZ H.S

In situ morphology of the gut microbiota of wood eating termites (Reticulitermes flavipes and Coptotermes formosanus)
Appl. Environ Microbiol ; 1977, 33, 406 - 426

- (14) BREZNACK J.A

Intestinal microbiota of termites and other xylophagous insects

Ann.Rev.Microbiol ; 1982, 36, 323 - 343

- (15) BREZNACK J.A, MERTINS, J.W & COPPEL H.C

Nitrogen fixation and methane production in a wood eating cockroach

Cryptocercus punctulatus Scudder

University of Wisconsin Foresty Research notes, N°184 ; 1974

- (16) BUTLER J.H.A AND BUKERFIELD J.C

Digestion of lignin by termites Nasotitermes exitiosus

Soil.Biol.Biochem ; 1979, 11, 507 - 13

- (17) CLEVELAND, L.R
The physiological and symbiotic relationships between the intestinal protozoa of termites and their host with special reference to Reticulitermes flavipes (Kollar)
Biol.Mar.Biol. Woods Hole ; 1924, 46, 177 - 227
- (18) CLEVELAND, L.R
Toxicity of oxygen for protozoa in vivo and in vitro ; animals defaunated without injury
Biol.Mar.Biol. Woods hole ; 1925, 48, 455 - 68
- (19) CLEVELAND, L.R, GRIMSTONE, A.V
The fine structure of the flagellate Mixotricha paradoxa associated Micro-organisms
Pro.R.Soc.Lond (Ser.B) ; 1964, 159, 668 - 86
- (20) COWLING, E.B, MERRIL, W.
Can J. Bot ; 1966, 44, 1539 - 54
- (21) ESENTHER, G.R, KIRK, T.K
Ann. Entomal Soc. Am ; 1974, 67, 989 - 91
- (22) EUTICK, M.L, O'BRIEN, R.W, SLAYTOR M
Aerobic states of gut of Nasutitermes exitiosus and Coptotermes lacteus
High and low caste termite
J.Insect Physiol ; 1976, 22, 1377 - 80
- (23) EUTICK, M.L, VEIVERS, P, O'BRIEN, R.W
Dependance of the higher termite Nasutitermes exitiosus and the lower termites Coptotermes lacteus on their gut flora.
J.Insect Physiol ; 1978, 24, 363 - 68
- (24) EUTICK, M.L, VEIVERS, P, O'BRIEN, R.W
Bacteria from the gut of an Australian termites
Appl. Environ Microbiol ; 1978, 35, 823 - 8

- (25) MC EWEN S.E, SLAYTOR, M, O'BRIEN, R.W
Cellobiase activity in three species of Australian termites
Insect Biochem ; 1980, 10, 563 - 67
- (26) FACHT D.D, JOSEPH, H
An improved method for the enumeration of denitrifying bacteria
Soil SCI. Soc. Amer. Proc ; 1973, 37, 698 - 99
- (27) FRENCH R.J, BLAND, D.E
Lignin degradation in the termites Coptotermes lacteus and
Nasutitermes exitiosus
Mat and Organ ; 1975, 10, 281 - 88
- (28) FRENCH, R.J
The role of termite hindgut bacteria in wood decomposition
Mater. Org. 10 ; 1975, 1 - 13
- (29) FRENCH, R.J, TURNER, T.J, BRADBURY, J.F
Nitrogen fixation by bacteria from the hindgut of termites
J. Gen. Microbiol ; 1976, 95, 202 - 06
- (30) GARCIA, J.L, GUYOT, J.P, OLLIVIER, B, PAYCHENG, C
Ecologie microbienne de la digestion anaerobie. Techniques de
numération et d'isolement.
Cah ORSTOM, Ser.Biol ; 1982, 45, 3 - 15
- (31) GARCIA, J.L
La fermentation methanique
ORSTOM 1983
- (32) GRASSE, P.P
Traité de zoologie
Vol IX " Les termites " Masson Paris
- (33) GUYOT, J.P
Ecologie microbienne des digesteurs anaerobies
Rapport élève ORSTOM lère année ; 1981

- (34) HOBBIE, J.E, DALEY, R.J, JASPER, S
Use of nucleopore filters for counting by fluorescence microscopy.
Appl. Environ Microbiol ; 1977, 33, 1225 - 28
- (35) HOLDEMAN, L.V, MOORE, W.E.C
Anaerobie Laboratory Manuel
Blacksburg : Virginia Polytechnic Institute and state University ; 1972
- (36) HUNGATE, R.E
Studies on the nutrition of Zootermopsis.
I the role of bacteria and molds in cellulose decomposition
Zentbl. Bakt Parasitkde (Abt Z) ; 1936, 94, 240 - 9
- (37) HUNGATE, R.E
Studies : on the nutrition of Zootermopsis II. The relative importance of the termite and the protozoaire in wood digestion
Ecology ; 1938, 19, 1 - 25
- (38) HUNGATE, R.E
Experiments on the nutrition of Zootermopsis III. The anaerobie carbohydrate dissimilation by the intestinal protozoa
Ecology 1939, 20, 230 - 45
- (39) HUNGATE, R.E
A roll tube method for cultivation of strict anaerobes
J.R NORRIS and D.W Ribbons (Eds), "Methods in Microbiology 1969
- (40) HUNGATE, R.E, SMITH, W, CLARKE, R.T.J
Suitability of butyl rubber stoppers for closing anaerobie roll culture tubes.
J Bacteriol ; 1966, 91, 908 - 09
- (41) KOVOOR, J
Le PH intestinal d'un termite supérieur (Microcerotermes edentatus)
Insectes Sociaux ; 1967, 14, 157 - 60

- (42) KOVOOR, J
 Etude radiographique du transit intestinal chez un
 termite supérieur
 Separatum Exp ; 1967, 23, 820 - 24
- (43) KOVOOR, J
 L'intestin d'un termite supérieur (Microcerotermes)
 Histophysiologie et flore bactérienne symbiotique
 Rev. Biol. n° 1 ; 1968, CII, 46 - 82
- (44) KOVOOR, J
 Anatomie comparée du tube digestif des termites, sous
 famille des Nasutitermitidae
 Insectes Sociaux ; 1969, 16, 197 - 230
- (45) KOVOOR, J
 Présence d'enzymes cellulolytiques dans l'intestin d'un
 termite supérieur
Microcerotermes edentatus (W.A.S)
 Ann SCI Natn. Zoll ; 1970, 12, 65 - 71
- (46) KRASIL'NIKOV, N.A, SATDYKOV, S.I
 Estimation of the total bacteria in the intestines of
 termites
 Mikrobiologiya (Eng.Transl) ; 1969, 38, 289 - 92
- (47) KRAZIL'NIKOV, N.A, SATDYKOV, S.I
 Bacteria of termites intestines
 Mikrobiologiya (Eng.Transl) ; 1970, 39, 562 - 4
- (48) KRELINOVA, O, KIRKU, V, SKODA, J
 Cellulolytic activity of bacterial symbionts of wood
 destroying insects.
 Folio Microbiol ; 1977 a, 22, 134 - 36

- (49) KRELINOVA, O, KIRKU, V, SKODA, J

The cellulolytic activity of some intestinal bacteria of termites Int. Biodeterior Bull ; 1977b, 13 , 81 - 87

- (50) LEE, K, WOOD, T.J

Termites and soils
N-Y Academic Press ; 1971, 1

- (51) MARTIN, M.M, MARTIN, J.S

Cellulose digestion in the midgut of the fungus growing termites
Macrotermes natalensis. The role of acquired digestive Enzymes
Physiol. Zoo (Ser. 52), 1978, 199, 1453 - 5

- (52) MAULDIN, J.K.

Cellulose catabolism and lipid synthesis by normally and abnormally faunated termites, Reticulitermes flavipes
Insect, Biochem ; 1977, 7, 27-31

- (53) MAULDIN, J.K., RICH, N.M., COOK, D.W.

Aminoacids synthesis from ¹⁴C . acetate by normally and abnormally faunated termites, Coptotermes formosanus
Insect. Biochem ; 1978, 8, 105-9

- (54) MOURARET, M.

Etude biologique des eaux du barrage d'Avame 1 en cote d'ivoire
Rapport de convention O.R.S.T.O.M., EECI, O.R.S.T.O.M , Paris, 1971

- (55) NAZARCZUCK, R.A., O'BRIEN, R.W., SLAYTOR, M.

Alteration of the gut microbiota and its effect on nitrogen metabolism intermites
Insect Biochem ; 1981, 11 , 267-75

- (56) NOIROT, C. GRASSE, I.P.
L'évolution de la symbiose chez les isoptères
Experienta ; 1959, 15, 365
- (57) NOIROT, C.
Formation of castes in the higher termites.
In "Biology of termites". Vol 1 (Eds K.Krishna and
F.M.Weesner.) ; 1969, 311-50 (academic press : New york)
- (58) NOIROT, C.
Donnée récente sur la symbiose chez les termites
champignonnistes (Macrotermitinac)
Biol.Écologie. Méditerranéenne ; 1989, 7, 123-28
- (59) O'BRIEN, G.W., VEIVERS, P.C., Mc EWEN, S.E., SLAYTOR,
M, O'BRIEN, R.W.
The origin and distribution of cellulase in the termites,
Nasutitermes exitiosus and Coptotermes lacteus.
Insect Biochem ; 1979, 9, 619 - 25
- (60) O'BRIEN, R.W., SLAYTOR, M
Role of Microorganismes in the metabolism of termites
Aust.J.Biol. Scien., 1982, 35, 239-62
- (61) POTRIKUS, C.J., BREZNACK, J.A.
Nitrogenfixing Enterobacter agglomerans isolated from
guts of wood-eating termites
Appl. Environ. Microbiol ; 1977, 33, 392- 99
- (62) POTRIKUS, C.J., BREZNACK, J.A.
Uric acid degrading bacteria in guts of termites
Appl. Environ. Microbiol ; 1980, 40, 117-24
- (63) POTRIKUS, C.J., BREZNACK, J.A.
Anaerobic degradation of uric acid by gut bacteria of
termites.
Appl. Environ. Microbiol ; 1980, 40, 125-32

- (64) POTRIKUS, C.J., BREZNACK, J.A.
Gut bacteria recycle uric acid nitrogen in termites :
A strategy for nutrient conservation.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A ; 1981, 4601-5
- (65) POTTS, R.C., HEWITT, P.H.
The distribution of intestinal bacteria and cellulase
activity in the harvester termite trinervitermes
trinervoides
Insectes. Sociaux ; 1973, 20, 215-20
- (66) POTTS, R.C., HEWITT, P.H.
The partial purification and some properties of the
cellulase in the termite trinervitermes trinervoides
(Nasutitermitinae)
Comp. Biochem. Physiol ; 1974, 47B, 317-26
- (67) PRESTWICH, G.D., BENTLEY, B.L., CARPENTIER, E.J.
Nitrogen sources for neotropical nasute termites :
Fixation and selective foraging
Oecologia (Berl) ; 1980, 46, 397-401
- (68) PRESTWICH, G.D., BENTLEY, B.L.
Nitrogen fixation by intact colonies of the termite
Nasutitermes corniger
Oecologia (Berl) ; 1981, 49, 249-51
- (69) PASMUSSEN, R.A., KHALIL, M.A.
Global production of methane by termites
in nature ; 1983, 301, 700-02
- (70) RETIEFF, L.W., HEWITT, P.H.
Digestive B-glucosidases of the harvester termite
Hodotermes mossambicus
Properties and distribution.
J. Insect Physiol ; 1973, 19, 1837-47

- (71) ROUSSOS, S., GARCIA, J.L., RINAUDO, G., GAUTHIER, D.
Distribution de la microflore hétérotrophe aérobie et en particulier des bactéries dénitrifiantes et fixatrices d'azote libres dans la rhizosphère du riz
Ann. Microbiol (Inst. Pasteur) : 1980, 131 A, 197-207
- (72) SCHULTZ, J.E., BREZNACK, J.A.
Heterotrophie bacteria present in hindguts of wood-eating termites (Reticulitermes flavipes (Kollar)).
Appl. environ. microbiol ; 1978, 35, 930-6
- (73) SCHULTZ, J.E., BREZNACK, J.A.
Cross feeding of lactate between Streptococcus lactis and Bacteroides sp. isolated from termite hindguts
Appl. Environ. Microbiol ; 1979, 37, 1206-10
- (74) SEIFER, K., BECKER, G.
Ber chemische Abbau von laub-und Nadelholzarten durch verschiedene termiten.
Holzforschung ; 1965, 19, 105-11
- (75) SPECK, V., BECKER, G., LENG, M.
Ernährungsphysiologische Untersuchungen an termiten nach selektiver medikamentöser Ausschaltung der Darmsymbionten
Z. Angew. Zool ; 1971, 58, 475-91
- (76) THAYER, D.W.
Facultative wood digesting bacteria from the hindgut of the termite Reticulitermes hesperus
J.Gen. Microbiol; 1976, 95, 287-96
- (77) THAYER, D.W.
Carboxymethyl cellulase produced by facultative bacteria from the hindgut of the termite Reticulitermes hesperus
J.Gen. microbiol ; 1978, 106, 13-18

(78) TRAGER, W.

The cultivation of a cellulase digesting flagellate, Trichomonas Termonsidis and of certain other termite protozoa
Biol. Bull. Mar. Biol. Lab., Woods hole ; 1934, 66, 182-90

(79) VANDERWESTHUISEN, W.C., HEWITT, P.H., DUTOIT, P.S.

Amino-peptidase from the harvester termite Trinervitermes trinervoides distribution, purification, physical and chemical properties
Insect. Biochem ; 1981, 11, 311-21

(80) VEIVERS, P.C., O'BRIEN, R.W., SLAYTOR, M.

The redox state of the gut of termites.
J. Insect. Physiol ; 1980, 26, 75-7

(81) VEIVERS, P.C., O'BRIEN, E.W., SLAYTOR, M.

Digestive enzymes of the salivary glands and gut of Mastotermes darwiniensis.
Insect. Biochem ; 1982, 12, 35-40

(82) VEIVERS, P.C., O'BRIEN, R.W., SLAYTOR, M.

Selective defaunation of Mastotermes darwiniensis and its effects on cellulase and starch metabolism.
Insect. Biochem ; 1983, 13, 95-101.

(83) YAMIN, M.A.

Flagellates of the orders trichomonadida kirby, oxymonadida Grassé and hypermastigoda Grassi and foa reported from lower termites (Isoptera, Families Mastotermitidae, Kalotermitidae, Hodotermitidae, Termopsidae, Rhinotermitidae and Serritermitidae) and from the wood-feeding roach (Cryptocercus (Dictyotera : cryptocercidae).
Sociobiology ; 1979, 4, 1-119

(84) YAMIN, M.A.

Cellulase metabolism by the flagellate trichonympha from a termite is independent of endosymbiotic bacteria
Science (Was D.C.) 1981, 211, 58-9

(85) YOSCHINAPI, T., KNOWLES, R.

Acetylene inhibition of nitrous oxide reduction by
denitrifying bacteria
Biochem. Biophys. Res. Comm ; 1976, 79, 705-10

(86) ZIMMERMANN, P.R., GREENBERG, J.P.

21

Termites a potentially large source of atmospheric
methane, carbon Dioxide, and Molecular Hydrogen
Science ; 1982 nov, 218, 563-65

A N N E X E S

ANNEXE 2

SOLUTION MINERALE DE BALCH et al # 2

KH_2PO_4	6 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	6 g
NaCl	12 g
$\text{MgSO}_4, 7 \text{ H}_2\text{O}$	2,6 g
$\text{CaCl}_2, 2 \text{ H}_2\text{O}$	0,16 g
eau distillée	1000 ml

SOLUTION D'OLIGO-ELEMENTS DE BALCH et al.

Acide nitriloacétique	1,5 g
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	3 g
MnSO ₄ , 2 H ₂ O	0,5 g
NaCl	1 g
FeSO ₄ , 7 H ₂ O	0,1 g
CoCl ₂ , 6 H ₂ O	0,1 g
CaCl ₂ , 2 H ₂ O	0,1 g
Zn(Cl ₂) SO ₄	0,1 g
CuSO ₄ , 5 H ₂ O	0,01 g
Alk(SO ₄) ₂	0,01 g
H ₃ BO ₃ (acide borique)	0,01 g
Na ₂ MoO ₄ , 2 H ₂ O	0,01 g
Eau distillée	1000 ml

Dissoudre l'acide nitrolotriacétique avec KOH
jusqu'à pH 6,5 ;
Ajouter les minéraux ;
Ajuster le pH à 7,0 avec KOH ;
Conserver au réfrigérateur.

SOLUTION MINERALE DE BALCH et al

Biotine (vit H)	2 mg
Acide folique	2 mg
Pyridoxine HCl	10 mg
Thiamine HCl (vit B ₁)	5 mg
Riboflavine (vit B ₂)	5 mg
Acide nicotinique	5 mg
DL-pantothénate de calcium	5 mg
Vitamine B ₁₂ (cyanocobalamine)	0,1 mg
Acide p-aminobenzoïque (PHBA)	5 mg
Acide lipoïque	5 mg
Eau distillée	1000 ml

ANNEXE 5

PREPARATION DU Na_2S 20⁰/₀₀

100 ml d'eau distillée + 1/2 pastille de NaOH (pH basique conservé)

Faire bouillir sous azote (/ 10 ml d'eau pour compenser évaporation) puis tiédir au bain de glace

Ajouter 20 g de Na_2S préalablement lavé de ses impuretés

- peser 25 g environ de $\text{Na}_2\text{S}_9\text{H}_2\text{O}$ dans 1 Becher ;
- ajouter eau distillée, remuer rapidement, rejeter l'eau et sécher les cristaux sur mouchoir en papier ;
- repeser le poids devant être approximativement de 20 g.

ANNEXE 6

EAU REDUITE

A. Solution de K_2HPO_4 à 50 g/l	6 ml
Solution minérale de Balch	50 ml
$NaHCO_3$	5 g
Solution de Rézasurine	0,2 ml
Eau distillée	900 ml

faire bouillir sous azote

B. Incorporer cystéine	0,5 g
Na_2S 20 %	2,5 ml
Na_2S 2,5 %	20 ml

- C. Répartir dans la hotte anaérobie 10 ml par tube de Hungate
- Gazer les tubes sous N_2/CO_2 (80/20)
- Vérifier neutralité avec un tube témoin.

ANNEXE 7

MILIEU DE NUMERATION POUR BACTERIE CELLULOLYTIQUE

1. Ajouter

(Solt) . Solution minérale de Balch et al	50 ml
(Solt) . Solution d'oligo-éléments	10 ml
(Solt) . Solution de vitamines	10 ml
(Solt) . Solt de Fe SO ₄ 7 H ₂ O (0,2 %)	1 ml
. Solt de sélénite de Na 1,73 g/100 ml	1 ml
. Extrait de levure	2 g
. Biotrypcase	2 g.
. KH ₂ PO ₄	1,6 g/l
. Cellulose MN 300	5 g/l
. Rézasurine 0,1 %	1 ml

2. Ajuster le pH à 7,4

3. Faire bouillir sous azote

4. Ajouter agar 20 g/l

5. Chauffer pour incorporer l'agar au milieu

MILIEU NUMERATION BACTERIES HOMOACETOGENES
UTILISATRICES DE H₂/CO₂ BHA

Utiliser milieu méthanigène :

- solt de K ₂ HPO ₄ (50 g/l) # 1	6 ml
- solt sélénite de Na (1,73 g/l)	1 ml
- solt d'oligo-éléments	20 ml
- solt de vitamines	20 ml
- solt min pour BHA	50 ml
- L. cystéine HCl, H ₂ O (ss N ₂)	0,5 mg
- eau distillée QSP	1000 ml
- résazurine 0,1 %	1 ml

NB : Aucun sulfate (traces dans oligo-éléments) ;

- aucune source de C autre que H₂/CO₂ (sauf vit.)
(pas d'extrait de levure, pas de biotrypcase, pas de jus de digesteur)
- + pour pH = 7,4 : 0,5 ml NaOH 30 %/500 ml
(sinon pH # 2).

Solt min pour BHA

- KH ₂ PO ₄	6 g
- NH ₄ Cl	20 g
- MgCl ₁₂	2 g
- Eau distillée	1000 ml

NB : + L. cystéine H₂O (ss N₂ lors du dégazage O₂) ;
+ Na₂S, 9 H₂O (dans hotte, 0,1 ml (2,5 %) / 5 ml
soit 0,500 g/T.

MILIEU NUMERATION BACTERIES ACIDIFIANTES
(PRODUCTRICES DE H₂ ET AGV)

BFG GLUCOSE

ou

BUL LACTATE

- solt dans NaOH de bleu de bromothymol	12 ml
- solt de K ₂ H PO ₄ (à 6 g/l) # 1	(50 ml
ou (à 50 g/l	ou (6 ml
- solt minérale de Balch et al # 2	50 ml
- solt d'oligo-éléments	10 ml
- solt de vitamines	10 ml
- solt Fe SO ₄ , 7 H ₂ O (0,2 %)	50 ml
- solt sélénite de Na (1,73 g/l)	1 ml
- solt de NiCl ₂ (0,5 g/l)	1 ml
- Na H CO ₃ (sodium bicarbonate)	5 g
- extrait de levure (vit)	2 g
- biotrypcase (AA)	2 g

Substrat carboné

BFG Glucose	5 g
ou	
BUL Lactosee	5 g
- Jus de digesteur	500 ml
- eau QSP	1000 ml
+ L-cystéine HCl, H ₂ O	0,125 g/250 ml
+ Na ₂ S, 9 H ₂ O	0,1 ml/tube

MILIEU NUMERATION METHANIGENE

- solt de K_2HPO_4 (à 6 g/l) # 1	(50 ml
ou (à 50 g/l	ou (6 ml
- solt minérale de Balch et al # 2	50 ml
- solt d'oligo-éléments	10 ml
- solt de vitamines	10 ml
- solt $FeSO_4, 7H_2O$ (0,2 %)	1 ml
- solt sélénite de Na (1,73 g/l) (10ml)	1 ml
- solt de $NiCl_2$ (0,5 g/l)	1 ml
- Na HCO_3 (sodium bicarbonate)	5 g
- extrait de levure (vit)	2 g
- biotrypcase (AA)	2 g
- résazurine à 0,1 %	1 ml

Substrats carbonés

BMT - acétate de Na	2,5 g
formiate de Na	
gazage H_2/CO_2 1,5 atm	
ou	
BMA - acétate de Na (0,1 M)	8 g
gazage N_2/CO_2	
- Jus de digesteur	500 ml
- eau QSP	1000 ml
+ L-cystéine HCl, H_2O (sous N_2 lors du dégazage O_2)	
+ $Na_2S, 9H_2O$ à 2,5 % (dans hotte ou 0,1 ml/tube de 5 ml)	

MILIEU NUMERATION BACTERIES DENITRIFIANTES

Réduction dissimilatrice des
nitrates en gaz N_2 ou NH_4^+

BD Stade N_2 bloqué
ou
BPA Stade NH_4^+

- solt de $K_2H PO_4$ (à 50 g/l)	6 ml
- solt minérale de Balch et al sans SO_4	50 ml
- solt d'oligo-éléments (sans SO_4)	10 ml
- solt de vitamines	10 ml
- $Na H CO_3$	5 g
- extrait de levure	1 g
- biotrypcase	1 g
- $NaNO_3$	0,5 g
- Acétate de Na	2 g
- succinate de Na	2 g
ou	
- ac succinique	2,4 g
- jus de digesteur	500 ml
- eau distillée QSP	1000 ml

N.B. Pour pH # 7,4 = HCl 37 % : 0,5 ml / 500 ml
pas de $Fe SO_4$, pas de sélénite de Na, pas de $NiCl_2$
pas de SO_4 (sauf jus de digesteur)

N.B. Pas de Na_2S , C_2H_2 0,1 ml/tube
gazage N_2 seul 0,5 atm

ANNEXE 12

MILIEU NUMERATION POUR SULFATO-REDUCTEURS

Méthode au BeS

BSR 1 + 2) En tubes
BSR 2) KimaxSolution A

- KH ₂ PO ₄	0,5 g
- MgSO ₄ , 7 H ₂ O	2 g
- Na ₂ SO ₄ , 10 H ₂ O	1 g
- CaCl ₂ , 2 H ₂ O	0,1 g
- NH Cl	1 g
- Eau distillée	800 ml

+ substrat carboné	BSR 1 + 2 : lactate de Na à 60 % :
	6 ml (3,6 g)
	BSR 2 : acétate de Na (6 g)

Solution B

- K ₂ HPO ₄	5 g
- Eau distillée QSP	100 ml

Solution C

- Sel de Mohr	0,5 g
- Eau distillée QSP	100 ml

. Stériliser A et B à 120°C, 20 min.) milieu de
. Stériliser C par filtration) croissance
(millipore 45 u)) A + B + C = 1000 ml

Les tubes Kimax, avec 50 mg de FeS et 1 ml d'eau distillée sont stérilisés à 120°C 20 min., puis totalement remplis stérilement de milieu de croissance (trouble important) et stockés. Ce milieu se conserve plusieurs mois.

ANNEXE 13MILIEU NUMERATION POUR BACTERIES FIXATRICES DE N₂

K ₂ HPO ₄	800 mg
KHPO ₄	200 mg
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	200 mg
CaCl ₂ , 2 H ₂ O	100 mg
NaCl	100 mg
FeSO ₄ , 7H ₂ O	10 mg
Oligo-éléments	1 ml
Acide malique	4 g
Extrait de levure	100 mg
Eau distillée	QSP 1000 ml
pH	6,8
Agar	3 g

ANNEXE 14

MILIEU NUMERATION POUR ACTINOMYCETES

Amidon soluble	10 g
Caséine	0,3 g
KNO ₃	2 g
NaCl	2 g
K ₂ HPO ₄	2 g
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	50 mg
CaCO ₃	20 mg
FeSO ₄ , 7 H ₂ O	10 mg
Agar	15 mg
Eau distillée	QSP 1000 ml

Ajouter par filtration (membrane millipore de 0,45 u de diamètre) de cycloheximide ou d'actidione (solution antifongique).

COMPOSITION DES NOIRS SOUDAN B

- dissoudre 10 mg dans 75 ml d'alcool absolu,
- ajouter 75 ml d'eau.

COMPOSITION DE L'ACRIDINE ORANGE

- dissoudre 10 mg dans 100 ml de tampon phosphate 6,6 mM
pH = 6,7 (filtrer le tampon sur filtre millipore).