

50376
1978
163

50376
1978
163

N° d'ordre : 740

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE TROISIEME CYCLE

par

Edouard CIESIELSKI

MODIFICATIONS DES FIENTES DE VOLAILLE PAR FERMENTATION



Soutenue le 19 décembre 1978 devant la Commission d'Examen

MM. J.B. GUILLAUME Président
R. TAILLIEZ Rapporteur
J.C. DERIEUX Examineur
J. KREMBEL Examineur

B.U. LILLE 1



D 030 139911 0

A MA MERE

A MON PERE

A MA FAMILLE

Ce travail a été réalisé dans le laboratoire de Technologie et des Fermentations de l'Institut Pasteur de Lille et dans le service de Microbiologie à l'Université des Sciences et Techniques de Lille I sous la direction de Monsieur le Professeur J. GUILLAUME.

Nous sommes heureux de vous exprimer ici toute notre gratitude pour nous avoir accueillis dans votre laboratoire. Nous désirons tout particulièrement vous remercier de nous avoir fait bénéficier de vos judicieux conseils et de la confiance que vous nous avez toujours témoignée tout au long de ce travail. Nous tenons à vous exprimer ici notre profond respect.

Nous remercions Monsieur R. TAILLIEZ de nous avoir aidés pour l'étude des mycotoxines et de l'amabilité avec laquelle il a bien voulu accepter de faire partie de notre jury.

Que Monsieur J. KREMBEL trouve ici l'expression de notre profonde reconnaissance d'accepter de juger notre travail et de participer à notre jury.

Nous remercions également Monsieur J.C. DERIEUX pour l'accueil avec lequel il nous a reçus pour faire partie de notre jury.

Les essais sur animaux ont été effectués avec la collaboration de Messieurs PRENSIER et LAMBERT dans le cadre de l'Institut Universitaire de Technologie de Biologie Appliquée, qu'ils en soient remerciés.

Le thème de ce travail nous a été suggéré par l'Union des Coopératives Agricoles d'Alimentation du Bétail de Château-Thierry. Nous tenons ici à les remercier ainsi que pour les précieuses informations fournies au long de cette étude.

Enfin, nous adressons nos remerciements à tous ceux dont l'amitié et l'affection nous ont soutenus et encouragés.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

| | |
|---|----|
| I Pollution due aux élevages | 1 |
| A) Epuration | 4 |
| B) Récupération..... | 5 |
| II Utilisation des fientes..... | 10 |
| A) Utilisation des fientes comme engrais..... | 10 |
| B) Utilisation des fientes déshydratées en alimentation animale..... | 11 |
| III But du travail | 13 |

MATERIELS ET METHODES

| | |
|--|----|
| I Matériels..... | 15 |
| A) Fientes..... | 15 |
| a) fientes fraîches..... | 15 |
| 1 - composition | 15 |
| 2 - facteurs de variation..... | 15 |
| 3 - quantités produites | 16 |
| b) fientes déshydratées..... | 16 |
| 1 - matière azotée..... | 16 |
| 2 - glucides..... | 17 |
| 3 - lipides..... | 18 |
| 4 - matière minérale..... | 18 |
| 5 - valeur énergétique..... | 18 |
| c) fientes utilisées pour nos travaux..... | 18 |
| B) Principaux produits..... | 19 |
| a) acide urique..... | 19 |
| b) lactosérum..... | 19 |
| C) Souches utilisées..... | 19 |
| a) souches de collection..... | 19 |
| b) souches fournies par l'U.C.A.A.B..... | 20 |
| c) souches isolées par nos soins..... | 21 |
| D) Techniques de culture..... | 21 |
| II Méthodes de dosage..... | 23 |
| A) Dosage de l'acide urique..... | 23 |
| B) Dosage de l'acide glyoxylique..... | 23 |

| | |
|------------------------------------|----|
| C) Dosage de l'acide lactique..... | 24 |
| D) Autres dosages..... | 24 |
| - NH ₄ | 24 |
| - Urée..... | 25 |
| - protéines..... | 26 |
| - sucres..... | 26 |
| - azote total..... | 26 |
| - toxines..... | 26 |

RECHERCHE DE SOUCHES CAPABLES DE CROITRE SUR L'ACIDE URIQUE 28

| | |
|--|----|
| A) Etudes sur un milieu synthétique de fientes..... | 30 |
| a) le milieu synthétique de composition proche de celle des fientes..... | 30 |
| b) recherche de souches à partir d'une terre..... | 32 |
| 1 - souches..... | 32 |
| 2 - essais des souches isolées..... | 32 |
| c) levures et moisissures de collection..... | 34 |
| 1 - différentes souches..... | 34 |
| 2 - Candida utilis..... | 35 |
| d) Discussion des résultats obtenus sur milieu syn- thétique-fiente | 36 |
| 1 - sur la présence de cristaux d'acide urique. | 36 |
| 2 - sur la méthodologie utilisée | 37 |
| B) Etudes sur milieu simple..... | 38 |
| a) le milieu simple..... | 38 |
| b) recherche de souches dégradant l'acide urique.. | 39 |
| 1 - recherche sur une terre d'épandage de fientes de canard..... | 40 |
| 2 - recherche sur une terre d'un poulailler.... | 41 |
| 3 - souches isolées de fientes..... | 46 |
| C) Détermination des souches..... | 47 |
| a) détermination des deux souches bactériennes.... | 47 |
| b) détermination de la souche de moisissure SP ₂ ... | 50 |
| D) Discussion..... | 50 |

ETUDES DES SUBSTRATS ET DE DIVERS FACTEURS DU MILIEU SIMPLE

ESSAIS D'AMELIORATION DES MILIEUX SIMPLES ET SYNTHETIQUE

| | |
|---|----|
| A) Le pH..... | 52 |
| B) Cinétique de disparition et d'apparition de produits | 53 |
| C) Etude de l'évolution des substrats les plus importants et leurs concentrations limitantes..... | 56 |
| 1 - Evolution de la concentration de l'urée... | 56 |
| 2 - Evolution de la concentration de l'acide glyoxylique..... | 56 |
| 3 - Acide urique et acide glyoxylique : leurs concentrations limitantes..... | 59 |
| a - acide urique..... | 59 |
| b - acide glyoxylique..... | 62 |
| D) Addition d'une nouvelle source de carbone..... | 63 |
| 1 - Addition d'acide lactique dans le milieu simple..... | 63 |
| a - l'acide lactique : concentrations limitantes | 63 |
| b - croissance de 3 souches sur l'acide lactique..... | 64 |
| c - conclusion..... | 65 |
| 2 - Addition de lactosérum acide dans le milieu complet..... | 66 |
| a - SP ₁ | 66 |
| b - SP ₂ | 67 |
| E) Conclusion - discussion..... | 67 |

MODIFICATION DES FIENTES PAR CULTURE DE MICROORGANISMES ET

ESSAIS SUR LES ANIMAUX

| | |
|--|----|
| I Modification des fientes par culture de microorganismes..... | 69 |
| A) Cultures sur fientes sans addition de lactosérum... | 69 |
| B) Cultures sur fientes avec addition de lactosérum... | 71 |
| 1 - SP ₁ | 71 |
| 2 - SP ₂ | 74 |
| C) Cultures successives..... | 74 |
| 1 - cultures agitées..... | 74 |
| 2 - cultures non agitées..... | 75 |
| 3 - cultures sur milieux non stérilisés..... | 76 |
| 4 - culture en masse..... | 78 |

| | |
|---|--------|
| II Essais sur animaux..... | 80 |
| A) Procédé utilisé..... | 80 |
| 1) composition de la nourriture habituelle de la souris..... | 80 |
| 2) confection des granulés..... | 81 |
| B) Etude de la toxicité du produit élaboré sur souris. | 81 |
| C) Essais d'interprétation..... | 83 |
| 1) toxicité non visible chez les témoins..... | 83 |
| 2) les mycotoxines | 84 |
| D) Conclusion..... | 85 |
| CONCLUSION GENERALE | 86 |

BIBLIOGRAPHIE

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

Pour les exploitations importantes, sans surface d'épandage possible, se débarrasser des fientes est une nécessité.

D'une façon générale, le traitement des déjections des animaux domestiques, en relation avec la taille des élevages industriels et des problèmes de pollution, est une question d'actualité et sera peut-être bientôt le facteur limitant de la concentration des élevages.

Dans cette introduction, nous étudierons d'abord le problème général des déjections animales avec leur épuration et leur récupération, puis le problème particulier qui fait l'objet de ce travail, celui des fientes de volailles.

I - POLLUTION DUE AUX ÉLEVAGES :

=====

Les élevages concentrés, spécialement ceux produisant des porcs et des volailles peuvent arriver à trop enrichir les sols lors d'épandage et ceci de façon déséquilibrée. De plus, les lisiers de porcherie pourraient arriver à provoquer, à long terme, une toxicité vis-à-vis de certaines plantes, due à la trop forte concentration en certains oligoéléments tels que le cuivre et le zinc (19) qui empêcheraient le développement des cultures futures.

Notons que l'utilisation agricole des boues de stations d'épuration des eaux industrielles et urbaines peuvent également provoquer des accidents de toxicité vis-à-vis des végétaux tels que les concentrations élevées en zinc, cuivre et bore (32), comme des animaux avec le molybdène (61) ainsi que des contaminations bactériennes et parasitaires (34). Mais dans ce cas des boues, ce n'est pas l'agriculture elle-même qui est à l'origine de la contamination. D'ailleurs, en France, en 1970, la pollution due au secteur des industries touchant l'agriculture et l'alimentation était estimée à 20 % de la pollution globale des eaux par les matières organiques (15, 49).

L'élevage diffus constitue une source de contamination des eaux surtout par l'intermédiaire des écoulements non contrôlés et des rejets directs de purin ou de jus d'ensilage. Par contre, l'incorporation traditionnelle au sol des fumiers composés de la litière de paille et des déjections de bovins et de chevaux après fermentation, ou les paturages des herbages, s'ils infléchissent les cycles biologiques n'ont pas de portée importante sur l'environnement.

Les élevages concentrés, en revanche, peuvent introduire dans les sols des surcharges considérables en azote et matières organiques. En effet, les charges polluantes des lisiers frais sont très importantes (16). Le mot lisier, ici, signifie l'ensemble des déjections animales avec litières et restes, parfois, de nourriture. Ramenées en gramme par tonne de poids vif, les charges polluantes exprimées en DBO₅ (demande biologique en oxygène pendant 5 jours) et DCO (demande chimique en oxygène) sont les suivantes, pour différents types d'animaux et de poids moyens :

| | DBO ₅ | DCO |
|------------------------|------------------|--------|
| Vaches (de 500 kg) .. | 1 814 | 7 900 |
| Porcs (de 60 kg) .. | 2 173 | 5 000 |
| Volailles (de 2 kg) .. | 3 200 | 11 696 |

La charge polluante des volailles est la plus forte des trois cas cités. Une tonne de poids vif représente de nombreuses volailles, 500 dans l'exemple.

Si nous exprimons, les résultats ci-dessus en équivalent habitant (46) sachant que la charge polluante d'un être humain de poids moyen (70 kg) exprimée en DBO est de 35, nous obtenons :

- Bovin de 500 kg : 26
- Porc de 50 kg : 3,2
- Poule de 2,5 kg : 0,24

C'est-à-dire qu'un bovin de 500 kg, pollue autant que 26 habitants.

La composition d'un lisier est, en fait, très variable avec l'espèce, l'alimentation des animaux, sa dilution et la durée de son stockage ; celui-ci pouvant faire baisser en été la DBO de 70 %, la DCO de 40 % et l'azote total de 40 % ainsi que le nombre de germes d'origine fécale (3).

Les eaux de ruissellement en provenance directe des endroits où l'on nourrit les animaux sont extrêmement polluées jusqu'à 7 g de DBO/litre et 15 g de DCO/litre. Si on prend l'exemple d'une industrie d'abattage de la volaille, celle-ci nécessite une utilisation de 600 m³/jour d'eau et une DBO de 214 kg pour le lavage des plumes, de 342 kg pour l'éviscération et de 120 kg pour le lavage des cages (53). En Europe, il semble qu'il y ait coïncidence entre les densités d'élevage et la pollution des eaux de surface (16).

Le lessivage de l'azote nitrique vers la nappe pourrait être important : le lisier de porc libère en effet une forme d'azote mieux et plus rapidement absorbée que celle du fumier (60) avec un comportement plus voisin de celui des engrais minéraux. Mais les chiffres disponibles sont encore trop peu nombreux pour que l'on puisse juger des effets à long terme du lisier sur les nappes.

Les déchets des porcs et des poulets ont une valeur alimentaire résiduelle beaucoup plus grande que ceux de l'homme, cela dépend du fait que l'usage désormais très généralisé des aliments dont les proportions de phosphate et d'azote sont supérieures à la normale (superphosphatés et superazotés) a créé une situation où l'animal ne peut utiliser toute la nourriture qu'on lui donne (9). Le mode d'alimentation n'aboutit pas à une oxydation complète et par conséquent à une destruction complète de la nourriture, surtout en ce qui concerne les substances azotées et phosphorées. Quand ces substances sont évacuées dans des lacs ou dans des cours d'eau à faible courant, elles créent, au préjudice de l'eau, des conditions favorables à "l'eutrophisation" (11) c'est-à-dire un apport surabondant de nourriture pour la flore et la faune aquatique. Il en résultera un excès de

vigueur de la végétation qui provoquera un trouble progressif des conditions de vie biologique du cours d'eau et une diminution de son pouvoir d'auto-épuration. L'oxygène ne servira plus à défendre les eaux du fleuve et du lac contre les attaques extérieures mais ne suffira même pas à couvrir la demande d'oxygène du cours d'eau.

Le phénomène dépend de la valeur nutritive résiduelle des rejets des élevages de porcs et de poulets et il faudra étudier avec beaucoup d'attention, à l'avenir, l'élimination et éventuellement même l'utilisation rationnelle de cette valeur alimentaire résiduelle.

A) ÉPURATION

Le traitement artificiel est indispensable quand l'équilibre sol-animal n'est pas possible. Deux solutions sont, à priori, envisageables, soit la destruction du maximum possible de matières polluantes en vue d'un rejet compatible avec les normes de qualité requises dans les cours d'eau, soit la transformation du déchet en un produit ayant valeur commerciale. Le choix repose en partie sur la composition du produit lui-même et en particulier sa teneur en eau ; les lisiers de porc et de veau relevant plutôt de la première méthode, celui de volaille de la seconde.

Le traitement en vue du rejet en rivière (3, 39) est relativement peu répandu car la charge polluante, très élevée sous un débit faible, rend l'opération plus difficile que pour les eaux urbaines ; d'autre part, même avec les meilleurs rendements d'épuration possibles, la charge résiduelle en matière organique, azote et phosphore, reste importante. La résistance de certains microbes pathogènes (salmonelles) rend parfois nécessaire la chloration des effluents avant leur rejet (57).

Le traitement par voie aérobie ou anaérobie est parfois précédé d'une séparation des phases solide et liquide et ne porte alors que sur la phase liquide.

Les systèmes de traitement en anaérobiose donnent des résultats satisfaisants à la condition de pouvoir régler la température, ils en sont au stade expérimental, seront coûteux en installations et exigeants en main d'oeuvre qualifiée : ils ne seront envisageables que pour de très gros élevages.

En milieu aérobie, divers systèmes sont également à l'essai :

- une épuration partielle (75 %) semble pouvoir être obtenue à relativement faible coût de fonctionnement (0,5 kwh/kg DBO éliminée) par ruissellement sur des lits bactériens relativement simples mais associés à des décanteurs.

- une épuration beaucoup plus poussée peut-être obtenue par lagunage aéré en 100 jours ; système plus dispendieux en énergie que le précédent (2 kwh/kg DBO éliminée) mais assez simple à mener.

- le recours aux systèmes classiques des boues activées appliquées aux eaux urbaines exige, pour obtenir un rendement suffisant, un dispositif de type aération prolongée, à faible charge volumique ; l'investissement est coûteux, la consommation d'énergie du même ordre de grandeur que pour le lagunage aéré et une main d'oeuvre très qualifiée est nécessaire. Pour réduire le coût d'installation, il peut être envisagé de faire fonctionner la même cuve alternativement en aération et en décantation.

Les boues constituent un volume à traiter ou à évacuer au mieux égal au tiers, parfois aux deux tiers du volume du lisier brut à traiter. La conduite de l'épuration des lisiers devient plus facile et son coût moindre, lorsque leur rejet dans les eaux urbaines est possible, éventuellement après diminution de leur charge par simple décantation ou tamisage.

B) RÉCUPÉRATION

A l'image de nombreuses industries telles que malteries, brasseries, levureries, laiteries ou conserveries dont

les déchets peuvent être utilisés (48), les lisiers peuvent également présenter les mêmes caractéristiques.

Les parties solides éliminées, dont un fort pourcentage représente des éléments de son (cellulose) éliminés tels qu'ils ont été ingérés par l'animal, peuvent être réutilisables de deux façons :

- a) comme engrais ;
- b) comme aliment du bétail.

La valeur fertilisante des lisiers est la suivante (composition en g/litre) :

| | N | P ₂ O ₅ | K ₂ O |
|---------------------------|-------|-------------------------------|------------------|
| - Porcs à l'engrais | | | |
| . sur concentré ** | 4-7* | 1,5-4 | 2,5-6 |
| . sur lactoserum | 0,4 | | |
| - Vaches laitières | 4-6 | 1 -2,5 | 2 -5 |
| - Bovins engrais (400 kg) | 5-8 | 1,5-4 | 3 -6 |
| - Veau boucherie (120 kg) | 3 | 1,2 | 2 |
| - Poules pondeuses | 10-15 | 8 -15 | 5 -8 |

* cet azote est à l'état ammoniacal pour 60 à 70 %

** concentré : aliment pour bétail.

Le tableau indique la valeur des 3 éléments essentiels des engrais N, P sous forme d'oxyde P₂O₅ et K sous forme d'oxyde K₂O. Soit en quantité moyenne par animal en kg/an.

| | N | P ₂ O ₅ | K ₂ O |
|--|-----|-------------------------------|------------------|
| - Porc (place occupée par an) | 10 | 5 | 7 |
| - Vaches laitières pendant 6 mois de stabulation | 40 | 15 | 30 |
| - Taurillon (400 kg) | 60 | 20 | 35 |
| - Poules pondeuses | 0,6 | 0,2 | 0,2 |

D'après MARTINOT (40) on trouve en fait des données très variables selon les auteurs pour le lisier de porc, notamment, BALLAY et CATROUX (3) relèvent jusqu'à 10 ‰ de N, 8 ‰ de P₂O₅ mais 4 ‰ de K₂O seulement.

Il faut signaler à propos de l'azote que tout n'est pas absorbé par la plante : 60 à 75 % seulement pour le lisier de porcins et 50 % pour le lisier de bovins sont utilisés la première année (60). Le reste contribue à l'accumulation d'azote minéralisable dans le sol. D'autre part 2/3 de l'azote du lisier frais peuvent être perdus par aéroaspersion après stabilisation (63) alors que l'enfouissement direct dans le sol récupère tout l'azote.

Le compostage est possible pour tous les lisiers, soit après leur dessiccation partielle, soit avec l'incorporation d'un support sec (paille, ordures ménagères broyées). Les solutions techniques existent, mais les problèmes de commercialisation sont difficiles.

Les traitements en vue de la récupération de produits divers comme aliment de bétail (3, 39) comprennent divers systèmes.

- la déshydratation : appliquée au lisier de poules, elle n'est économiquement possible qu'aux ateliers de plus de 15 000 pondueuses. Le produit obtenu, très riche en protéines, peut être incorporé à des rations de ruminants ou de rats. On en est encore, en ce domaine, au stade expérimental.

- les récupérations de protéines sous forme de cultures d'algues, de mouches, sont expérimentées.

- la production de protéines à partir de déchets particuliers peut être tenté. Citons deux exemples particuliers :

1°. la possibilité de réutilisation de la farine de plumes de volaille hydrolysées (10). Comme on sait, les plumes à l'état naturel sont constituées essentiellement de kératine qui est une protéine difficilement digestible. Un traitement approprié basé sur l'emploi de vapeur sous pression à température élevée provoque l'hydrolyse de la kératine en protéines plus di-

gestibles. Pour contrôler si la farine de plumes a été hydrolysée convenablement, on a fait l'étude chimique de sa digestibilité. Cette analyse, dont les résultats sont un peu différents de ceux obtenus par le calcul biologique de la digestion gastrique naturelle, est effectuée selon la méthode "pepsine, acide chlorhydrique". Une bonne farine de plumes peut représenter plus de 75 % de protéines totales digestibles.

2°. la production d'une biomasse avec des microorganismes sur la cellulose (9). Le procédé est basé sur l'utilisation de microorganismes unicellulaires isolés de souches d'arbres en putréfaction de la région Schenectady, ainsi que dans une papeterie locale et dans les geysers du Parc National Yellowstone, dans le Wyoming. L'étude est faite par le docteur W. BELLAMY des laboratoires de la Général Electric. Il s'agit de microorganismes thermophiles qui vivent à des températures de 54° C à 82° C. Il est bien connu que seuls des organismes unicellulaires peuvent se reproduire à des températures aussi élevées. Dans le cours des expériences, à peu près 140 colonies de microbes thermophiles ont été étudiées, ce qui a permis d'isoler des familles de microbes qui décomposent rapidement la cellulose, se multiplient rapidement et produisent une biomasse qui contient un haut pourcentage de protéines. Avant que ces microbes puissent être utilisés pour transformer la cellulose de rebut en un aliment et rendre ce procédé compétitif pour le bétail, il faut encore trouver le milieu le plus favorable au développement de la population microbienne et établir quelles sont les méthodes les plus convenables pour favoriser la fermentation aérobie à haute température sur une grande échelle. La récolte de la biomasse qu'on obtient ainsi, présente également des difficultés techniques. Enfin, il est nécessaire de donner au produit obtenu, riche en substances protéiques, une forme physique et des caractéristiques organoleptiques qui puissent le rendre acceptable par les animaux.

- Il existe de très rares exemples de récupérations intégrales de déchets. Citons celui d'un atelier d'engraissement de bovins en France, en Haute-Garonne, dont le lisier est, après aération, séparé en 3 fractions, la plus grossière retourne aux ensilages destinés aux bovins, la fraction riche en protéines

est granulée en vue d'aliments pour monogastriques et le résidu minéral sert de fertilisant.

Autre exemple, celui des installations d'équarissage (57) qui ont tout d'abord un but sanitaire ; elles produisent également des aliments du bétail à partir de cadavres d'animaux et de déchets. Ces installations travaillent selon le procédé HARTMANN dont les différentes étapes de travail sont les suivantes : cuisson des cadavres, stérilisation, séchage. Les traitements sont effectifs dans un agrégat nommé "destructeur", dont la capacité journalière est de 1,8 à 12 tonnes de matières premières (à savoir les cadavres).

- On peut enfin citer dans cette recherche de récupération de déchets bien que le produit ne provienne pas de l'agriculture, l'utilisation de poussière de ciment (28). Des éleveurs américains de Georgie ont décidé, en 1977, de compléter l'alimentation de leur bétail avec de la poussière de ciment en raison de sa haute teneur en calcium. Ils se sont aperçus que le bétail prenait du poids plus rapidement que de coutume. Mis au courant, le département fédéral de l'agriculture a effectué une expérience sur sept génisses dans le centre de recherche de Bettville près de Washington. Les bêtes ont avalé 400 grammes de poussière de ciment par jour en plus de leur ration normale de maïs et de foin. Elles ont grossi de 1,4 kg par jour, alors que le gain de poids normal est inférieur de moitié. Selon le centre de recherche, aucune anomalie n'a été enregistrée chez les "mangeuses de poussière de ciment" dont la viande se serait révélée de première qualité.

- Les déchets agricoles peuvent être valoriser dans le cadre de recherches d'énergies nouvelles et de l'économie d'énergie ; la production de gaz de fumier peut présenter un regain d'intérêt par exemple.

II - UTILISATION DES FIENTES :

=====

Pour notre part, nous avons essayé d'apporter une contribution à la récupération des fientes.

Le débouché, le plus important actuellement, après déshydratation des fientes, est leur utilisation comme engrais, mais aussi, aux Etats-Unis surtout, comme complément dans l'alimentation animale.

A) UTILISATION DES FIENTES COMME ENGRAIS

La fiente de volailles déshydratée est un engrais organique trois fois plus riche en azote que le fumier de vache. Son action est lente et progressive ; cela le fait apprécier particulièrement des maraîchers, fleuristes, arboriculteurs, viticulteurs qui consentent à des dépenses importantes pour employer des produits qui livreront leur azote de façon continue pendant plusieurs années, et qui amélioreront les propriétés physiques du sol. D'autre part, du fait de leur déshydratation, l'odeur en est absente ; cela représente un avantage pour des exploitations qui se trouvent souvent à proximité des agglomérations,

On peut la considérer comme un engrais ternaire 4 - 4 - 3 ou 4 - 3 - 2, très riches en matières organiques (60 à 70 %) facilement décomposables dans le sol où elles se transforment rapidement en humus. Un engrais ternaire est un engrais chimique qui est composé des trois éléments de base nécessaires aux végétaux : azote (N) sous forme de nitrates ou de sels d'ammonium, phosphate (P) et potassium (K). Les trois chiffres désignent les proportions des trois éléments les uns par rapport aux autres avec dans l'ordre N, P et K. Outre que l'on peut considérer les fientes comme engrais ternaire, ceux-ci sont également riches en calcium, soufre, magnésium et en oligoéléments (fer, manganèse, bore, zinc, cuivre).

Nous devons citer toutefois quelques inconvénients :

- quand les déjections entrent en contact avec le sol, il se produit un important dégagement d'ammoniac, susceptible de brûler les germes et les jeunes racines des plantes ; il faut les épandre comme engrais de fond au moins 4 à 5 semaines avant les semis, et si possible par temps pluvieux.

- les déjections sont riches en calcium déconseillé pour les terrains déjà trop basiques. Par contre, cet apport non négligeable de calcium peut être intéressant sur des terrains neutres ou acides.

- l'utilisation de ces déjections peut provoquer un déséquilibre du rapport phospho-potassique. Il faut donc prévoir la fumure minérale qui rétablira l'équilibre de ce rapport.

- la teneur en chlore de ces déjections peut être en outre nuisible pour la pomme de terre.

Néanmoins, la fiente déshydratée est un engrais qui par la demande de spécialistes (maraîchers, fleuristes, arboriculteurs, viticulteurs) représente une plus value certaine. Les propriétaires de petits jardins particuliers peuvent également en profiter comme engrais organique. La fiente, un engrais peu onéreux il y a peu, a suivi malheureusement la courbe ascendante des prix.

B) UTILISATION DES FIENTES DÉSHYDRATÉES EN ALIMENTATION ANIMALE

Cette utilisation directe ne parait pas avoir une application pratique immédiate à grande échelle.

Les fientes de volailles pour l'alimentation du bétail sont actuellement interdite par la législation française.

Un certain nombre d'expériences sur différents types d'animaux ont donné les résultats suivants (ces expériences ont été surtout faites aux Etats-Unis) :

- vaches laitières

Un apport de fientes déshydratées dans la limite de 20 % des matières azotées du régime est toléré, et n'affecte

ni les qualités organoleptiques du lait, ni la santé des animaux. Au-delà, le lait présente une mauvaise odeur.

- bovins à l'engrais

Un apport modéré n'affecte ni la qualité, ni les caractéristiques des carcasses. Cependant des jeunes bovins recevant un régime avec 25 % de litière avicole réduisent leur consommation de 12 %, faisant un choix si l'homogénéité du mélange présenté n'est pas suffisante.

- ovins

La litière avicole mélangée aux céréales (orge - maïs) est bien acceptée par les brebis en gestation et les agneaux à l'engrais. Avec des taux d'incorporation de 50 % les performances zootechniques ne sont pas tout-à-fait aussi bonnes (le bilan économique est cependant positif).

- porcs

Avec des animaux d'au moins 30 kg et des régimes à 10 % de fientes séchées, le résultat économique est satisfaisant.

- volailles

Un taux de 10 % de déjections ne semble pas modifier les performances zootechniques des pondeuses.

Donc, comme on le voit, expérimentalement, les fientes de volailles séchées sont acceptées par tous les animaux ; il y a cependant une exception celle de la chèvre qui refuse la nourriture quelque soit le taux aussi faible soit-il d'incorporation des fientes.

Le produit est riche en azote, toutefois une grande partie de celui-ci n'est pas protéique et non utilisable par les monogastriques. Cette partie est sous forme d'acide urique et de sels ammoniacaux. Les autres défauts de cette "matière première" pour les monogastriques sa teneur élevée en cellulose (26) et sa faible teneur énergétique. Cependant cette faible teneur en énergie peut être intéressante dans des productions

où il est nécessaire de ralentir leur croissance.

En rapport avec la composition des fientes de volailles, l'utilisation tel quel de ce produit comme aliment du bétail semble surtout avoir de l'avenir pour des animaux capables d'utiliser l'azote non protéique et la cellulose, c'est-à-dire les ruminants.

Cependant de nombreux problèmes se posent outre ceux de la composition proprement dite (acide urique, cellulose) comme (25) :

- l'influence sur les qualités organoleptiques des produits obtenus ;
- les toxines s'accumulent à chaque passage. La réduction apparente de la pollution n'est en fait que provisoirement reportée, même si cela est sous une autre forme ;
- problèmes de stérilisation et du contrôle des germes pathogènes ;
- problèmes des résidus médicamenteux.

Sans évidemment aborder les problèmes d'ordres moraux.

En les résolvant, l'utilisation des fientes comme alimentation animale est peut-être une méthode d'avenir.

III - BUT DU TRAVAIL :

=====

Notre travail a dû faire face à plusieurs problèmes comme celui de l'élimination de l'acide urique avant d'atteindre notre but : transformer les protéines des fientes en protéines utilisables dans l'alimentation animale sous forme de biomasse sans négliger pour autant la toxicité éventuelle des souches isolées.

Notre plan général suivi a été le suivant, après l'exposition préalable des matériels et méthodes :

1) Rechercher des souches connues ou non, de levures, de moisissures ou de bactéries capables d'éliminer l'acide urique non consommable par les monogastriques. L'étude de ces souches s'est faite d'abord sur des milieux facilement utilisables techniquement.

2) Etudier les substrats et les facteurs de variation de ces milieux en essayant de les améliorer.

3) Transformer les protéines des fientes en des protéines dont la composition en acides aminés est plus riche pour en faire des aliments.

4) Etudier enfin le problème de la toxicité.

Dans l'utilisation des fientes, nous nous sommes efforcé de travailler sur celles de pondeuses sans litières, sans contact avec la terre pour éviter de nombreux métaux qui risquaient de nous gêner même en très faible quantité (62). Ce sont essentiellement les élevages industriels ou semi-industriels qui nous ont intéressés.

MATERIELS ET

METHODES

I - MATÉRIELS :

=====

A) FIENTES

a) Fientes fraîches :

1. Composition

La composition des fientes fraîches de poules est la suivante, d'après un rapport de l'U.C.A.A.B.* (mai 1973)

- Humidité..... 70 à 80 %
- Matière organique..... 24 à 16 %
- Matière minérale..... 6 à 4 %

La matière minérale se décomposant ainsi, en valeurs moyennes

- Azote (N)..... 1,2 %
- Acide phosphorique (P_2O_5)..... 1,5 %
- Potasse (K_2O)..... 0,7 %
- Chaux (CaO)..... 2,4 %
- Magnésium (MgO)..... 0,2 %

Si on compare ces derniers chiffres avec ceux correspondant au fumier de ferme type (36) :

- Azote..... 0,4 %
- Acide phosphorique..... 0,2 %
- Potasse..... 0,5 %
- Cendres..... 6 %

On constate le net gain en azote qui est multiplié par 3 et en acide phosphorique multiplié par 7,5.

Cependant, ces chiffres ne sont que des moyennes, car de nombreux facteurs de variation interviennent :

2. Facteurs de variation

- L'age de la poule :
La teneur en eau augmente avec l'age.
- L'aliment fourni pour la nourriture.
- L'environnement :

* U.C.A.A.B. : Union des Coopératives Agricoles d'Alimentation de Bétail.

Quand les températures sont élevées, les animaux boivent plus et les fientes sont plus liquides. Selon la température et la ventilation, les fientes sèchent plus ou moins vite. Selon la température, la perte en azote sous forme d'ammoniac est plus ou moins importante.

- La santé des animaux :

Certains états pathologiques comme les entérites par exemple se manifestent par des diarrhées.

- L'âge et le mode de stockage des fientes :

Les fientes restées pendant plus ou moins de temps sous les perchoirs perdent une grande partie de leur humidité.

3. Quantités produites

On obtient en moyenne 150 à 200 grammes de déjections par poule et par jour, soit 65 kg par poule et par an et environ 0,2 m³ par jour pour 1 000 pondeuses. En France, 180 000 tonnes de matières sèches de fiente de volaille sont recueillies par an (21).

b) Fientes déshydratées :

1. Matière azotée

La matière azotée totale représente une moyenne de 4 % selon le dosage effectué par la méthode de KJELDAHL, soit exprimée en protéines ($\times 6,5$) : 25 %. Les extrêmes peuvent cependant être très éloignés : variation de 18,8 % à 39 %.

Pour la matière azotée non protéique, les résultats sont peu nombreux et très variables. D'après LOWMAN et KNIGHT (37) l'azote de l'acide urique représente 43 % de l'azote totale, soit 1,82 gramme d'azote sous forme d'acide urique pour 100 grammes de fientes sèches ou 5,43 grammes d'acide urique ; chiffres supérieurs encore pour STURKIE (58), 2,1 grammes d'azote sous forme d'acide urique pour la même quantité de

fientes sèches. L'estimation pour l'azote non protéique varie de 40 à 75 % de l'azote total des fientes.

Les facteurs de variation tiennent à la teneur qualitative et quantitative de la ration des animaux, au temps et condition de conservation des fientes fraîches : les pertes sous forme d'ammoniac peuvent être importantes 37 % en deux semaines d'après YUSHOK et BEAR (64).

Les acides aminés que l'on rencontre sont les suivants d'après HODGETTS (31). Les résultats sont donnés en % des fientes sèches.

| | |
|----------------------|-------|
| - Lysine..... | 0,355 |
| - Méthionine..... | 0,110 |
| - Cystine..... | 0,025 |
| - Arginine..... | 0,036 |
| - Glycine..... | 2,340 |
| - Histidine..... | 0,210 |
| - Leucine..... | 0,560 |
| - Isoleucine..... | 0,355 |
| - Phenylalanine..... | 0,340 |
| - Tyrosine..... | 0,275 |
| - Valine..... | 0,485 |

Les résultats sont à rapprocher des résultats de l'université de Cambridge :

| | |
|-------------------|------|
| - Lysine..... | 0,48 |
| - Méthionine..... | 0,15 |
| - Cystine..... | 0,12 |

Ces résultats obtenus sur des fientes qui contenaient 39,30 % de protéines, c'est-à-dire relativement riches.

2. Glucides

Il n'y a uniquement que de la cellulose, environ 17 % avec des extrêmes à 10,5 % et 20,3 %, qui n'est pas utilisée par la volaille. La teneur en cellulose des fientes est donc étroitement liée à la teneur en cellulose de l'aliment.

3. Lipides

La quantité de lipides est faible : 3 % environ.

4. Matière minérale

La matière minérale représente 16 % en moyenne avec comme minéraux outre le phosphore (1,54 %), le calcium (4,37 %), le potassium (1,79 %) et le magnésium (0,58 %) déjà cités dans la composition, le fer (0,26 %), le manganèse (0,30 %), le cuivre (0,04 ‰), le zinc (0,60 ‰), le bore (0,008 ‰), le soufre (6,80 ‰) et le sodium (0,43 %) sous forme de chlorure de sodium (NaCl).

Les chiffres sont donnés en % de fientes déshydratées.

5. Valeur énergétique

Selon FAIRBAIN (23) la valeur énergétique des fientes serait d'environ 1100 Kcal/kg.

Des travaux australiens ont montré que l'énergie métabolisable des fientes est égale à environ 30 % de celle de la ration dont elles proviennent.

c) Fientes utilisées pour nos travaux :

Les fientes ont eu deux origines :

- l'une de poulaillers privés mais sur terre battue, ce qui représente un grave inconvénient par la présence de nombreux métaux même à très faible quantité ;

- l'autre d'un poulailler semi-industriel*. Les fientes ne sont pas mélangées à de la terre, l'élevage étant enfermé dans un grand hangar et les quantités procurables sont infinies.

* Il s'agit d'un hangar à Roncq dont l'adresse nous a été obligeamment fournie par la société DE SERRIS à Armentières.

B) PRINCIPAUX PRODUITS

- Acide urique

Un produit PROLABO purifié à environ 95 %.

- Lactosérum

Le lactosérum sec utilisé est déminéralisé et a la composition suivante :

- . Humidité..... 4,7 %
- . Protéines totales..... 12,3 %
- . Lactose..... 83 %
- . Cendres..... 2,8 %

Nous avons utilisé pour nos milieux, les produits essentiels suivants : acide glyoxylique, acide lactique et urée : tous des produits PROLABO.

C) SOUCHES UTILISÉES

- Souches de collection

Nous avons utilisé :

- . deux souches de bactéries
 - Serratia marcescens
 - Escherichia coli K₁₀
- . huit souches de levures
 - Candida pulcherima
 - Candida albicans
 - Candida tropicalis
 - Candida krusei
 - Candida utilis
 - Hansenula anomala
 - Rhodotorula glutinis
 - Saccharomyces cerevisiae A.T.C.C. 2601
- . deux souches de moisissures
 - Oïdium lactis
 - Aspergillus niger

- Souches fournies par l'U.C.A.A.B. (Union des Coopératives agricoles d'alimentation du bétail)

Ces souches ont été isolées sur les fientes et fournies, chacune dans un tube différent.

- une levure
- un mucor
- Aspergillus niger
- un geotrichum
- un penicillium
- un aspergillus groupe glaucus
- un lactobacillus

La quantité de cellules de chaque souche pour 50 grammes de fientes varient énormément. Le tableau ci-après indique l'isolement sur 6 lots différents de fiente de chacune des souches.

| Souches Lots | LEVURE | ASPERGILLUS | MUCOR | GEOTRICHUM | PENICILLIUM | LACTOBACILLUS |
|-----------------|--------|----------------|----------------|------------|------------------|------------------|
| 1 | | | $5 \cdot 10^4$ | | $4 \cdot 10^3$ | $1,2 \cdot 10^6$ |
| 2 | | | $2 \cdot 10^3$ | | $4 \cdot 10^2$ | $4,1 \cdot 10^5$ |
| 3 | 20 | $2 \cdot 10^3$ | 200 | 70 | 10^2 | $2,3 \cdot 10^4$ |
| 4 | | 10^2 | 200 | | $1,3 \cdot 10^3$ | $7,8 \cdot 10^7$ |
| 5 | | 10^3 | 20 | | 10^3 | $3,2 \cdot 10^3$ |
| 6 | 10^3 | $3 \cdot 10^3$ | 100 | | 50 | 0 |

Un exemple : dans le lot n° 3, on a isolé 20 colonies d'une levure, 2 000 d'aspergillus, 200 de mucor, 70 de geotrichum, 100 de penicillium et 23 000 d'un lactobacillus. Chaque colonie vaut une cellule.

Nous pouvons constater que le nombre de cellules est très faible. Seul pour les lactobacillus, la variation entre les lots est très grande : 0 pour le lot n° 6 à $7,8 \cdot 10^7$ pour le lot n° 4.

- Souches isolées par nos soins

Nous avons isolé des souches de trois provenances :

- . une terre à gazon,
- . une terre d'épandage de fientes de canard,
- . une terre d'un poulailler.

Les souches comme nous le verrons dans l'expérimentation, sont essentiellement de deux types : souches bactériennes (PSEUDOMONAS) et souches de moisissures (PENICILLIUM).

D) TECHNIQUES DE CULTURE

La plupart des cultures ont été faites en milieu agité sur agitateur rotatif, la température a toujours été de 30°C.

Mises à part certaines expérimentations, nous avons toujours stérilisé sous pression nos milieux à l'acide urique ou avec fientes à 105° C pendant 30 minutes.

Pour les numérations, la gélose ordinaire a été utilisée exceptés les milieux à l'acide urique que nous verrons dans l'expérimentation pour les bactéries. L'O.G.A. a été préféré pour les levures. La gélose ordinaire et l'O.G.A. ont les compositions suivantes (8) :

- Gélose ordinaire

- . peptone..... 10 g
- . extrait de viande..... 4 g
- . chlorure de sodium.... 5 g
- . agar..... 13 g q.s.p. 1 000 ml
d'eau distillée

Le pH final doit être de 7,2

- O.G.A. (gélose glucosée à l'oxytetracycline)

- . extrait de levure..... 5 g
- . glucose..... 20 g
- . agar..... 16 g q.s.p. 1 000 ml
d'eau distillée

Le pH final est de 6,8 à 7. On additionne à 100 ml de la gélose ainsi préparée 10 ml d'une solution d'oxytetracycline (Terramycine) à 1 000 µg/ml.

Nous avons conservé les souches sur le milieu à l'acide urique à 4 °C.

La souche de pénicillium que nous avons isolée, a été conservée sur le milieu de MURASHIGE et SKOOG (43 bis) dont la composition pour un litre est la suivante en grammes par litre :

| | |
|---|-------|
| - Nitrate d'ammonium (NH_4NO_3)..... | 1,65 |
| - Nitrate de potassium (KNO_3)..... | 1,90 |
| - Chlorure de calcium (CaCl_2 , 2 H_2O)..... | 0,44 |
| - Sulfate de magnésium (MgSO_4 , 7 H_2O)..... | 0,37 |
| - Phosphate monopotassique (KH_2PO_4)..... | 0,17 |
| - Ethylène diamine tétraacétate disodique (E.D.T.A. Na_2)..... | 0,037 |
| - Sulfate ferreux (FeSO_4 , 7 H_2O)..... | 0,027 |
| - Source de carbone : sucres (saccharose, glucose ou lactose)..... | 20 |

Nous avons utilisé le milieu dans cette composition qui comprend cependant en plus les microéléments suivants (en g/l)

| | |
|---|---------|
| - Acide borique (H_3BO_3)..... | 0,006 |
| - Sulfate de manganèse (MnSO_4 , 4 H_2O)..... | 0,017 |
| - Sulfate de zinc (ZnSO_4 , 4 H_2O)..... | 0,010 |
| - Vitamine K_1 | 0,0008 |
| - Molybdate de sodium (Na_2MoO_4 , 2 H_2O)..... | 0,0002 |
| - Sulfate cuivreux (CuSO_4 , 5 H_2O)..... | 0,00002 |
| - Chlorure de cobalt (CoCl_2 , 6 H_2O)..... | 0,00008 |

II - MÉTHODES DE DOSAGE :

=====

A) DOSAGE DE L'ACIDE URIQUE (12, 13, 14, 30)

Nous avons dosé l'acide urique par la méthode de CARAWAY modifiée. La réaction est basée sur la réduction du phosphotungstate de sodium en milieu alcalin. La coloration bleue formée est appréciée colorimétriquement.

A 5 ml du surnageant obtenu après centrifugation sur SORVALL RC₂ à 10 000 t/mn pendant 10 minutes, on ajoute 1 ml d'une solution à 14 % de carbonate de sodium. On mélange et après 10 minutes, on ajoute 1 ml du réactif phosphotungstique en agitant énergiquement. Après 30 minutes, on lit contre un témoin à 700 nm. La loi de BEER-LAMBERT étant vérifiée jusqu'à une concentration de 200 mg/l, on peut ainsi établir une droite d'étalonnage.

Le réactif phosphotungstique a la composition suivante :

- phosphotungstate de sodium..... 25 g
- acide chlorhydrique R.P. 5 ml
- eau distillée..... q.s.p. 250 ml

B) DOSAGE DE L'ACIDE GLYOXYLIQUE (26, 41)

Le dosage est basé sur la formation d'une phénylhydrazone à partir de l'acide glyoxylique et de la 2,4 dinitrophénylhydrazine en milieu acide. La coloration jaune qui en résulte est appréciée au spectrophotomètre.

A 1 ml du surnageant obtenu après centrifugation, on ajoute 1 ml d'une solution de 0,1 % de 2,4 dinitrophénylhydrazine dans de l'acide chlorhydrique 2 N. Après agitation et 10 minutes de contact, on lit contre témoin à 425 nm. La loi de BEER-LAMBERT est vérifiée jusqu'à une concentration de 60 mg/l.

Le spectre du 2,4 dinitrophénylhydrazine est le suivant, pour une concentration de 100 ug/l en acide glyoxylique. On voit que le maximum d'absorption est atteint pour une longueur d'onde de 425 nm.

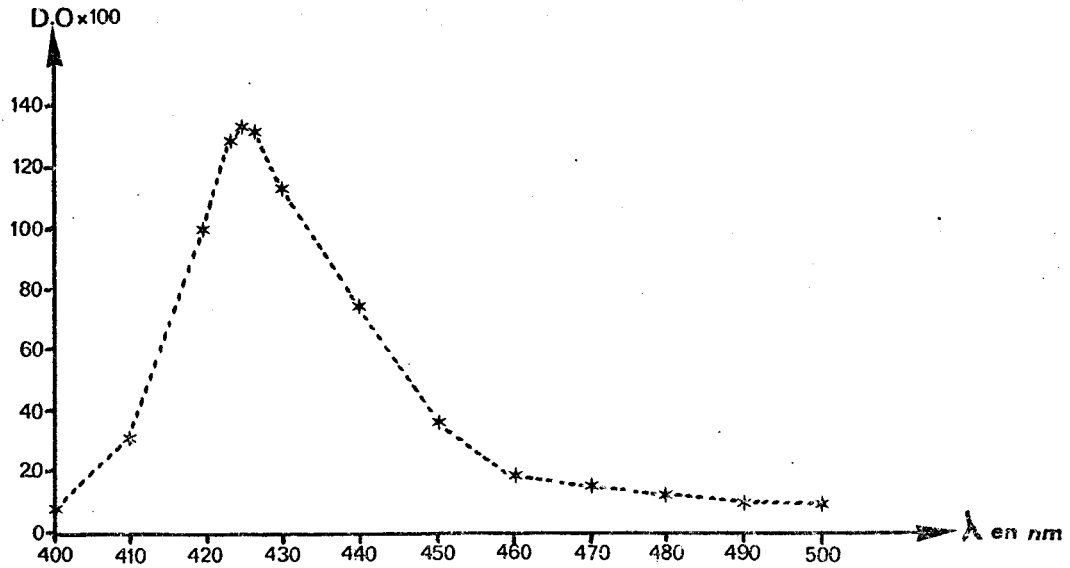


FIGURE 1

C) DOSAGE DE L'ACIDE LACTIQUE (35)

L'acide lactique est dosé par la réaction d'EEGRIVE. L'acide lactique est oxydé par le sulfate cuivrique en présence d'acide sulfurique concentré ; l'acétaldéhyde formé est alors déterminé par condensation avec la paraoxydiphényle selon la méthode de SCHAELEDERLE et HASSELMAN.

A 0,5 ml de surnageant obtenu après centrifugation, on ajoute 0,03 ml d'une solution à 4 % de sulfate cuivrique et 3 ml d'acide sulfurique concentré. Après agitation, on chauffe à 100° C pendant 5 minutes pour oxyder l'acide lactique en acétaldéhyde, puis on refroidit.

Après cette phase d'oxydation, on procède à la condensation en ajoutant 0,05 ml d'une solution à 0,75 % de paraoxydiphényle qui a la composition suivante :

- Para oxydiphényle..... 0,75 g
- Solution de soude à 2 %..... q.s.p. 100 ml

Après 30 minutes nécessaires pour le développement de la coloration, à température ordinaire, on met à 100° C pendant 90 secondes pour dissoudre l'excès de réactif. On refroidit et on lit contre témoin à 575 nm.

Pour la courbe d'étalonnage, nous avons une droite pour des valeurs inférieures à 10 mg/l.

D) AUTRES DOSAGES

- NH_4^+ :

Nous avons utilisé la méthode au réactif de NESSLER. Ce réactif est préparé de la façon suivante :

- . Solution A : - 20 grammes de iodure de potassium
- 30 grammes de iodure mercurique
- 250 ml d'eau distillée
- . Solution B : solution de soude (NaOH) à 20 %

Le réactif est le mélange de volumes égaux des solutions A et B.

A 3 ml de solution contenant au maximum 10 μg d'ions NH_4^+ , on ajoute 0,3 ml du réactif de NESSLER. La densité optique se lit à 420 nm.

- Urée :

On dose les ions NH_4^+ par le réactif de NESSLER avant et après l'action d'une uréase sur l'urée.

- Protéines :

Deux méthodes ont été utilisées :

- . celle de LOWRY (38)
- . et celle d'après KJELDAHL. Après obtention du résultat de l'azote total, on multiplie le résultat par 6,25.

- Sucres :

Nous avons utilisé le dosage à l'orcinol (43) pour les oses totaux.

- Azote total :

On utilise la méthode de KJELDAHL.

- Toxines :

(En particulier, l'acide penicillique et l'Aflatoxine B1)

Il s'agit d'une détermination sur chromatographie couche mince après extraction de la fraction concernant les toxines suivant la méthode officielle (31 bis).

L'extraction s'effectue suivant le processus : à 50 grammes d'échantillon, on ajoute un mélange de 250 ml de chloroforme, 25 grammes d'Hyflosupercel et de 25 ml d'eau. On agite pendant 30 minutes. On filtre sur papier et on prélève 50 ml de la phase chloroformique. On dépose les 50 ml sur une colonne chromatographique composée de 17,5 grammes de silice et de 5 grammes de sulfate de sodium. On élue la colonne avec 150 ml d'hexane, puis 150 ml d'éther éthylique et enfin par 250 ml d'une solution chloroforme-méthanol dont les proportions respectives sont 97 et 3. La fraction chloroformique est récupérée, évaporée à sec, analysée par chromatographie couche mince (C.C.M.).

La chromatographie s'effectue ainsi ; on reprend l'extrait par 500 µl d'une solution benzène/acétométhyle (98/2). On dépose 5, 10, 15 µl de l'extrait, et de l'Aflatoxine B1, de

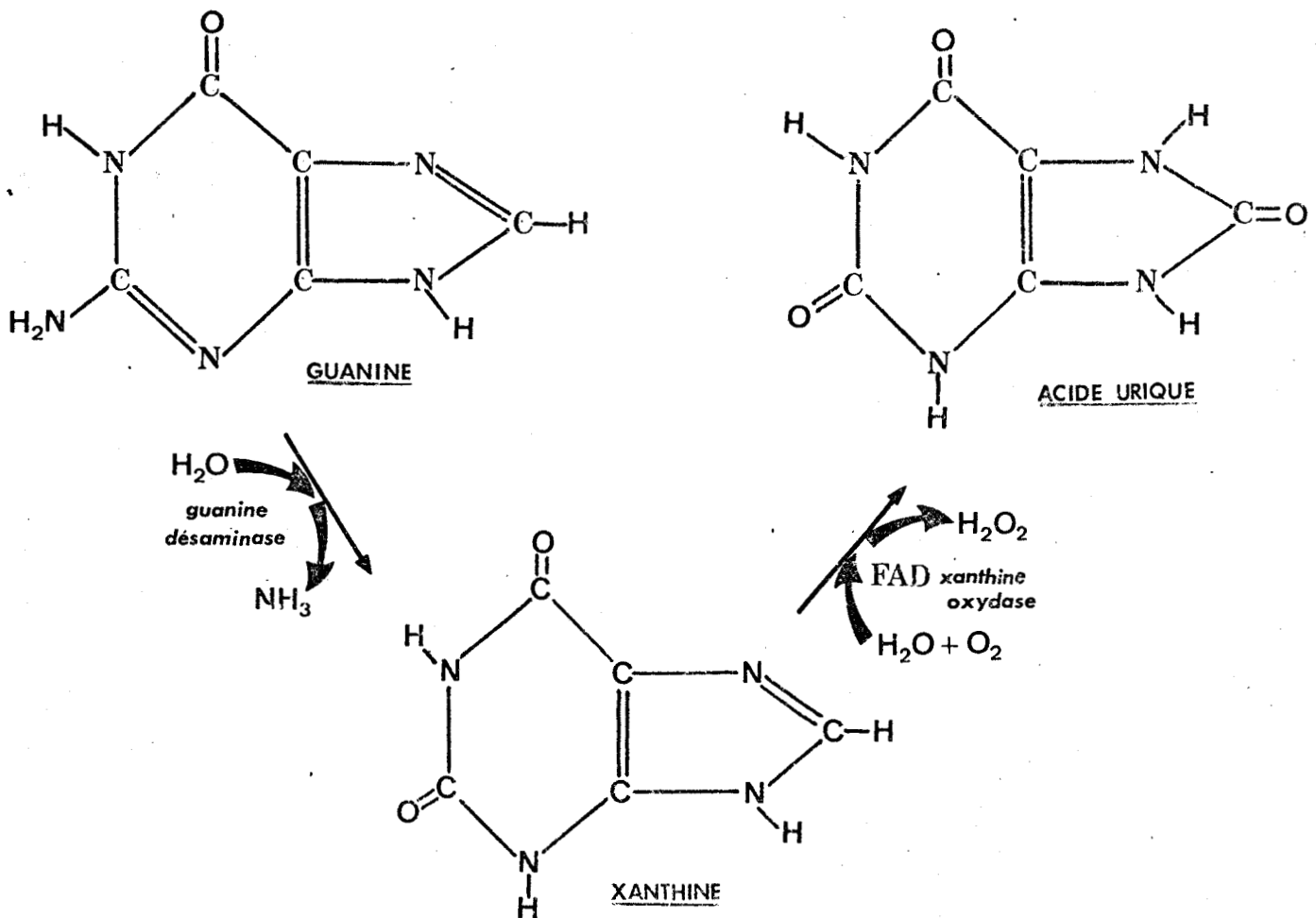
l'acide penicillique comme témoins. Le solvant d'élution est composé de : toluène / éthyl acétate / acide formique (6/3/1). La révélation se fait pour l'Aflatoxine B1 en ultra violet à 366 nm, on obtient une fluorescence bleue ; pour l'acide penicillique la pulvérisation d'acide sulfurique pur, suivie d'un passage à l'étude à 120° C durant 10 minutes, conduit à l'apparition d'une tâche brune.

RECHERCHE DE SOUCHES
CAPABLES DE CROITRE
SUR L'ACIDE URIQUE

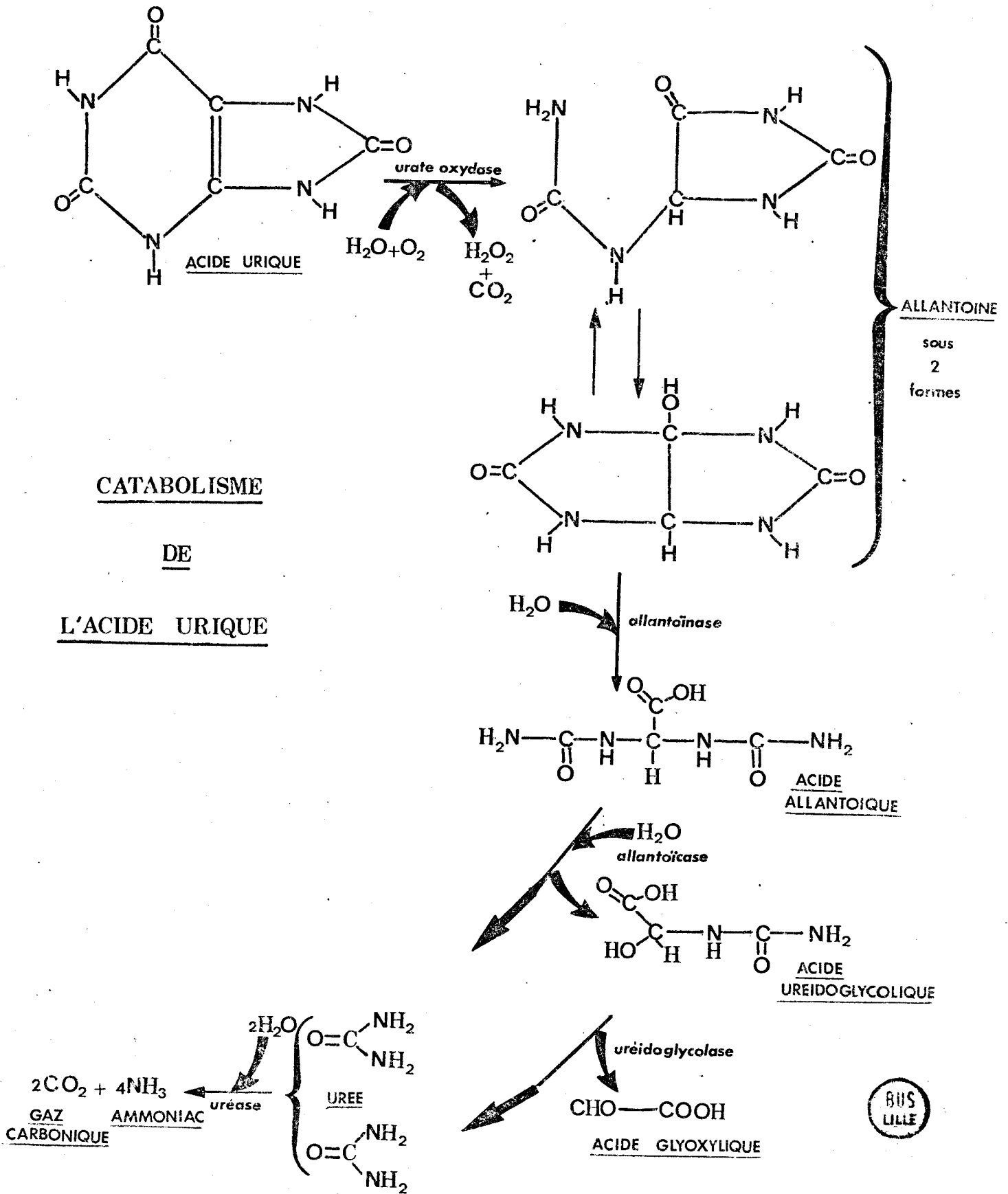
Les sources de carbone des fientes de volaille sont fournies par les protéines, la cellulose et l'acide urique. Le seul hydrate de carbone, la cellulose est très peu dégradable mais ne présente pas de caractère de toxicité ; elle peut servir soit comme produit de base dans un milieu pour une production d'une biomasse, soit comme support de boues activées.

Par contre, la présence de l'acide urique est gênante et nous nous sommes efforcé de trouver des souches bactériennes, des souches de moisissures ou de levures qui le dégradent.

L'acide urique provient de bases puriques. On peut prendre comme exemple le métabolisme de la guanine.



Le mécanisme du catabolisme de l'acide urique (42, 54) chez la plupart des microorganismes, est le suivant :



L'acide glyoxylique est, soit incorporé dans le cycle de KREBS par un by-pass au niveau de l'acide malique (29), soit donne du glycolle ou encore un semi-aldéhyde par condensation de deux de ses molécules.

L'essentiel du carbone de l'acide urique est fourni par l'acide glyoxylique et la totalité de l'azote l'est par l'urée.

Pour éviter l'accumulation dans le milieu de fermentation de l'urée et de l'acide glyoxylique produits finaux du catabolisme de l'acide urique, les souches utilisées devront avoir une triple exigence : hydrolyse de l'acide urique mais également utilisation de ses dérivées l'urée et l'acide glyoxylique.

Dans un premier temps, nous avons utilisé un milieu synthétique reproduisant les fientes en espérant trouver des souches capables de se développer convenablement en faisant disparaître l'acide urique dans les conditions proches des conditions naturelles. Nous nous sommes aperçus que sur ce milieu, dans tous les cas de croissance, l'acide urique n'était pas détruit et se cristallisait avec d'autres composants et que cela gênait l'observation des cultures. C'est pourquoi, nous sommes passés à une deuxième étape consistant à rechercher systématiquement des souches capables d'hydrolyser et d'utiliser l'acide urique en milieu simple.

A) ÉTUDES SUR UN MILIEU SYNTHÉTIQUE DE FIENTES

Nous avons utilisé dans nos recherches un milieu synthétique reproduisant et se rapprochant aussi près que possible de la composition des fientes :

- a) Le milieu synthétique de composition proche de celle des fientes.

Nous appellerons par la suite ce milieu : le milieu synthétique-fiente.

D'après le rapport de l'U.C.A.A.B. de mai 1973 sur la déshydratation des fientes de poule, nous avons établi

un milieu synthétique qui a la composition suivante, en grammes par litre :

| | |
|---|-------|
| - acide urique..... | 6 |
| - protéines (casaminoacid)..... | 4 |
| - glycocolle..... | 2 |
| - cellulose..... | 6 |
| - lipides (huile d'arachide)..... | 1 |
| - chlorure de calcium ($\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$)..... | 1,5 |
| - sulfate de calcium ($\text{CaSO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$)..... | 1,5 |
| - phosphate acide de calcium (CaHPO_4)..... | 2 |
| - sulfate de magnésium ($\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$)..... | 1 |
| - phosphate monopotassique (KH_2PO_4)..... | 0,15 |
| - phosphate dipotassique (K_2HPO_4)..... | 0,15 |
| - sulfate d'ammonium ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)..... | 0,4 |
| - phosphate biammonique ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$)..... | 0,3 |
| - chlorure de sodium (NaCl)..... | 0,3 |
| - sulfate ferreux ($\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$)..... | 0,25 |
| - chlorure de manganèse ($\text{MnCl}_2, 4\text{H}_2\text{O}$)..... | 0,2 |
| - sulfate cuivreux ($\text{Cu SO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$)..... | 0,003 |
| - sulfate de zinc ($\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$)..... | 0,05 |
| - acide borique..... | 0,001 |

q.s.p. 1 000 ml d'eau distillée. Le pH final est de 5,7. Les valeurs données sont normalement pour 100 ml, mais pour la commodité de nos études, nous avons dilué ce milieu 10 fois.

Il faut signaler un inconvénient de ce milieu, outre sa complexité ; les protéines auxquelles on doit ajouter du glycocolle. Ceci est dû à la forte dominance de cet acide aminé dans les protéines des fientes de poule. Les microorganismes utilisent tout de suite le glycocolle sans hydrolyser les protéines.

b) Recherche de souches à partir d'une terre :

1° - Souches

A partir d'une suspension de terre de gazon dans de l'eau salée, onensemence un milieu stérile dont la seule source de carbone est l'acide urique. Ce milieu essaie de rassembler les éléments minéraux de notre milieu synthétique.

| | | |
|---|------|---|
| - Sulfate d'ammonium ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)..... | 5 | g |
| - Chlorure de calcium ($\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$)..... | 5 | g |
| - Phosphate monopotassique (KH_2PO_4)..... | 2 | g |
| - Phosphate bipotassique (K_2HPO_4)..... | 2 | g |
| - Sulfate ferreux ($\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$)..... | 0,1 | g |
| - Sulfate de magnésium ($\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$)..... | 0,1 | g |
| - Chlorure de sodium (NaCl)..... | 0,1 | g |
| - Chlorure de cobalt (CoCl_2)..... | 0,05 | g |
| - Sulfate de zinc ($\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$)..... | 0,05 | g |
| - Chlorure de manganèse ($\text{MnCl}_2, 4\text{H}_2\text{O}$)..... | 0,05 | g |
| - Sulfate cuivreux ($\text{CuSO}_4, \text{SH}_2\text{O}$)..... | 0,05 | g |
| - Acide urique..... | 10 | g |

q.s.p. 1 000 ml. Le pH est de 7. La stérilisation de ce milieu s'effectue à 105°C pendant 30 minutes.

Après 48 heures d'agitation à 30°C , nous avons isolé 12 souches ainsi réparties :

- 3 moisissures ;
- 9 bactéries { 1 cocci gram +
1 cocci gram -
6 batonnets gram -

La détermination de ces souches n'a pas été effectuée.

2° - Essais des souches isolées

Sur le milieu synthétique-fiente, nous avons une croissance de souches mais à un stade de développement, généralement après 48 heures, on constate l'apparition de cristaux sous forme de paillettes.

Dans ces conditions, les observations sont faites au microscope car il est impossible de faire des mesures de densité optique.

La figure 2 donne un exemple de ce que nous observons pour toutes les cultures des microorganismes que nous avons isolés de milieux naturels.

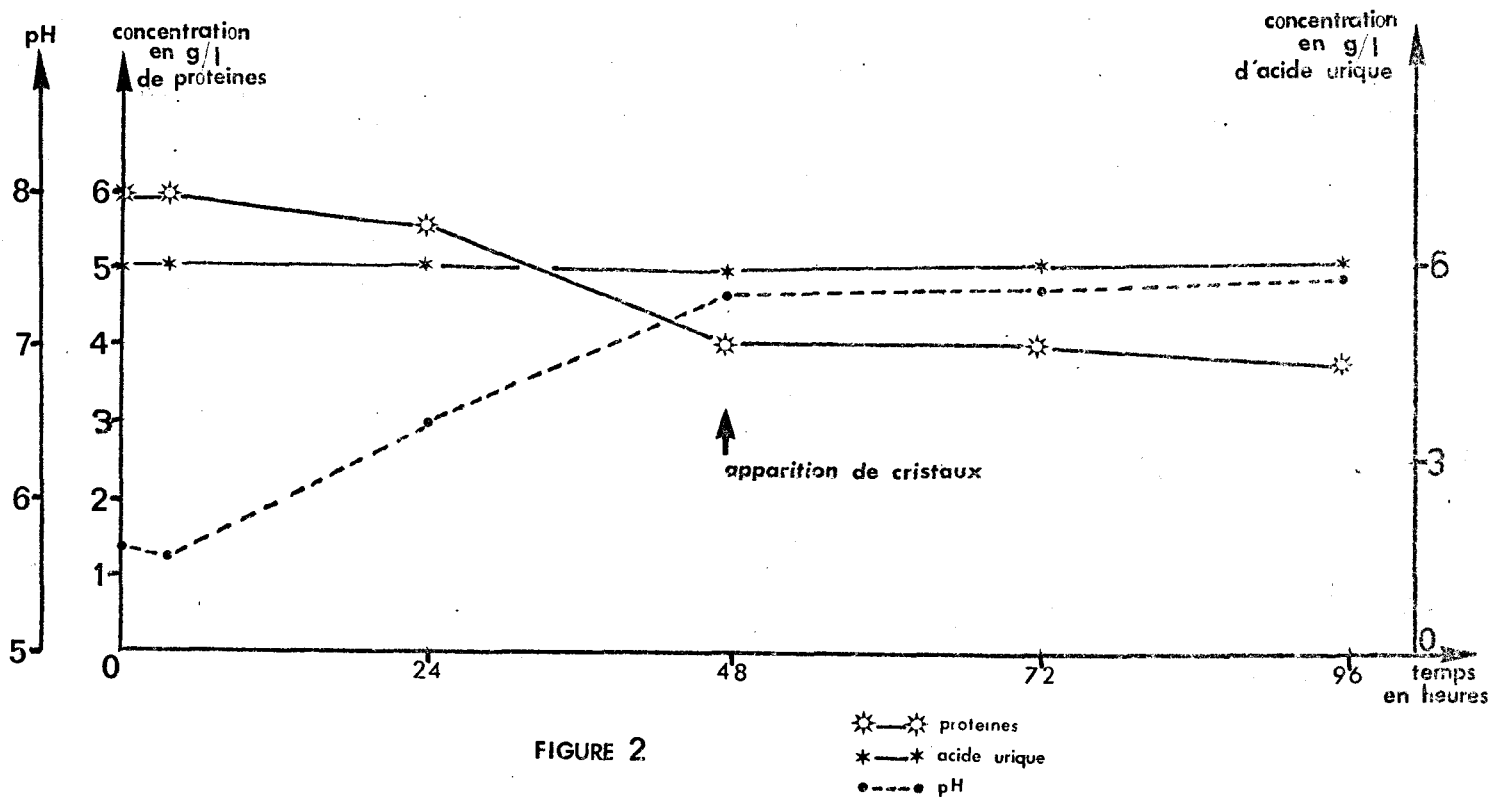


FIGURE 2

La figure 2 représente l'évolution de paramètre (pH) et composants (protéines et acide urique) du milieu synthétique lors d'une culture de moisissure isolée de la terre.

Nous avons mis 5 g/l en acide urique au départ pour notre milieu synthétique.



A noter l'évolution de la courbe de pH vers les pH basiques en concordance avec la consommation, faible cependant, des protéines (dosage par la méthode de KJELDAHL pour la concentration en azote total multiplié par 6,25 pour l'obtention de la concentration en protéines).

Si la consommation de protéines est visible, surtout les 2 grammes de glyco-colle, en revanche l'acide urique n'est guère touché. L'acide urique n'est pas un aliment de choix pour la souche : les protéines étant prioritaires.

c) Levures et moisissures de collection :

1° - Différentes souches

Sur le milieu synthétique, on ensemence différentes souches. On fait les numérations, résumées dans le tableau suivant, sur milieu O.G.A. (+ terramycine).

| Souches | Nb de cellules par ml à t = 0 | Nb de cellules par ml à t = 24 | Multipli-cation |
|-----------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|-----------------|
| - <u>Candida pulcherima</u> | 7.10^3 | $6,8.10^6$ | 971 |
| - <u>Candida albicans</u> | 3.10^4 | $3,9.10^5$ | 13 |
| - <u>Candida tropicalis</u> | 6.10^4 | $6,6.10^5$ | 11 |
| - <u>Candida krusei</u> | 4.10^5 | $4,9.10^6$ | 12 |
| - <u>Candida utilis</u> | 3.10^5 | $2,5.10^7$ | 83 |
| - <u>Hansenula anomala</u> | 4.10^4 | $1,4.10^7$ | 350 |
| - <u>Rhodotorula glutinis</u> | 3.10^3 | $3,5.10^4$ | 12 |
| - <u>Saccharomyces cerevisiae</u> | 10^3 | 0 | - |
| - <u>Oïdium lactis</u> | 13.10^2 | 16.10^2 | 1,2 |
| - <u>Aspergillus niger</u> | 2.10^2 | 0 | - |

Le Candida pulcherima : nous avons ensemencé 7.10^3 cellules par millilitre de milieu synthétique ; au bout de

24 heures, nous en comptons $6,8 \cdot 10^6$ d'où une multiplication de 971 fois par rapport au départ.

Dans toutes les cultures dont la croissance est convenable, il se forme des paillettes en quantité importante après 48 heures. Les résultats de Candida pulcherima et de Hansenula anomala qui présentent la meilleure multiplication, n'ont pu être reproduits. Deux souches ont donné cependant des résultats concordants : Oïdium lactis dont les colonies sont difficiles à distinguer les unes des autres et Candida utilis.

En fait, aucune de ces souches ne se développent sur le milieu ayant uniquement l'acide urique comme source de carbone.

2° - Candida utilis

On fait une culture, sur le milieu synthétique se rapprochant des fientes, de Candida utilis. La numération est faite sur O.G.A. (+ terramycine). La courbe obtenue est la figure 3.

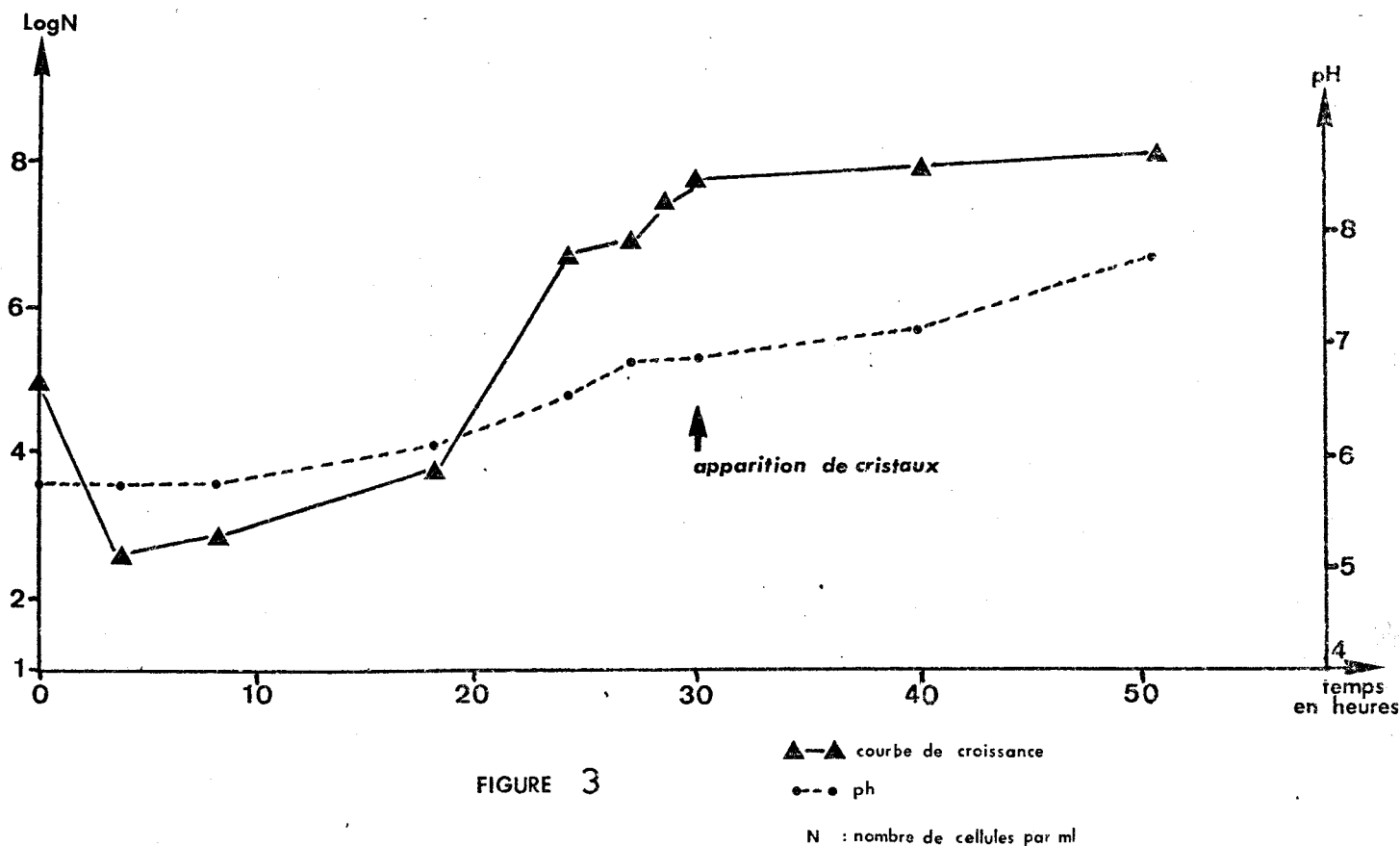


FIGURE 3

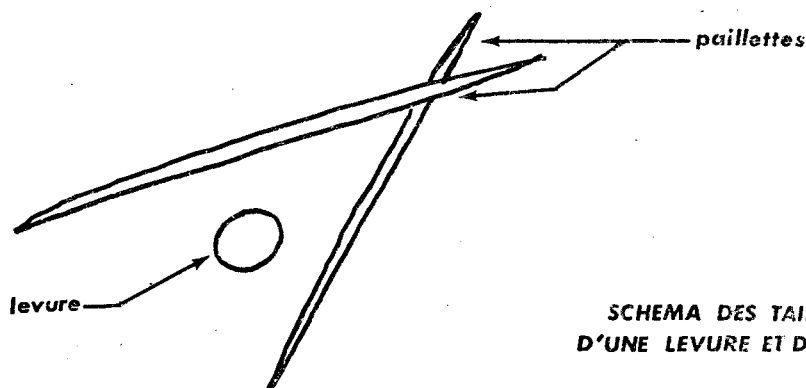
Courbe de croissance de Candida utilis.

La présence d'une lyse au départ a été constatée d'une façon générale dans les cultures de levures ; ceci correspond vraisemblablement au passage des levures d'un milieu peptoné à un milieu synthétique plus ou moins toxique.

Par rapport au temps 0, les cellules se sont multipliées environ 1 000 fois. La croissance se termine au bout de 30 heures, moment où l'on voit une accumulation de paillettes au microscope.

d) Discussion des résultats obtenus sur milieu synthétique-fiente :

1° - sur la présence de cristaux d'acide urique



SCHEMA DES TAILLES RESPECTIVES
D'UNE LEVURE ET DES PAILLETES.

Ces cristaux sous forme de paillettes sont probablement un sel d'acide urique. Cette hypothèse a été confirmée par deux expériences.

Isolement et point de fusion des cristaux.

On arrête une culture de Candida utilis sur le milieu complet peu avant l'apparition des cristaux. On filtre la culture sur papier millipore. A trois échantillons de 4 millilitres de filtrat, on ajoute respectivement :

- 1 ml d'acide chlorhydrique 0,6 N
- 1 ml d'eau distillée
- 1 ml de potasse 0,6 N

On obtient un précipité floconneux pour le 3^e cas.

Si on filtre les 3 échantillons ainsi obtenus et que l'on neutralise les filtrats obtenus, seul le milieu au départ additionné de KOH ne donne pas de réaction au dosage à l'acide urique (méthode de CARAWAY modifiée). Par contre, le contenu du filtre au précipité floconneux donne une franche coloration bleue avec le réactif au phosphotungstate de sodium.

Nous avons pris le point de fusion en utilisant un erlen rempli d'acide sulfurique que l'on chauffe lentement après avoir raccordé à celui-ci une pipette pasteur remplie de cristaux (méthode de THIOULÉ).

A 310° C, l'acide sulfurique commence à bouillir et le contenu cristallisé de la pipette n'est pas fondu, il est plutôt calciné. On obtient un résultat semblable en faisant un essai avec l'acide urique.

Comme les cristaux d'acide urique ne sont pas sous forme de paillettes, nous sommes certainement en présence d'un de ses sels de calcium. D'autre part, il faut signaler que plus le pH augmente, plus la solubilité de l'acide urique doit augmenter.

Notons enfin que si nous ne stérilisons pas le milieu avant l'ensemencement de Candida utilis, on a d'abord une croissance de bactéries puis la croissance, faible cependant, des levures. Mais tout au long de l'expérience, nous ne constatons plus la présence de paillettes. L'acide urique a donc été soit détruit, soit utilisé comme source de carbone et d'azote, soit comme source de carbone seul, soit enfin comme source d'azote par ces bactéries.

Rôle du calcium

Comme argument complémentaire, nous avons effectué une culture sur le milieu synthétique en supprimant toutefois toute source de calcium. Nous n'avons plus constaté la présence de paillettes, mais un ensemble d'agglomérats qui unissait tous les éléments insolubles du milieu.

On rencontre de semblables agglomérats dans les "accidents" de décantation (18, 50). Il y a aussi formation parfois d'agglomérat bactérien spontané lors de l'aération prolongée d'eau résiduaire (2).

2° - sur la méthodologie utilisée

La culture est difficilement suivie : nous n'avons guère que la longue technique de la numération. Le milieu contient en effet trop d'éléments insolubles : sels de calcium, acide urique, cellulose et certaines protéines, d'où l'utilité pour suivre plus aisément la croissance à l'aide de mesures de densité optique, d'un milieu simple et restant limpide.

B - ÉTUDES SUR MILIEU SIMPLE

a) Le milieu simple :

Dans le choix de ce milieu, les critères suivants ont prévalu (24, 33)

- milieu limpide,
- une seule source de carbone interchangeable,
- petit nombre d'éléments,
- milieu tamponné.

Le milieu choisi est le milieu de base MSB₁ que nous avons modifié en faisant varier les sources de carbone et d'azote.

Le milieu de base a la composition suivante, en g/l d'eau distillée :

- | | |
|---------------------------------|----------------|
| - Sulfate de magnésium..... | 0,2 |
| - Chlorure de sodium..... | 0,01 |
| - Sulfate ferreux..... | 0,1 ml à 0,5 % |
| - Chlorure de manganèse..... | 0,2 ml à 0,5 % |
| - Phosphate dipotassique..... | 18 |
| - Phosphate monopotassique..... | 2 |

q.s.p. 1 000 ml d'eau distillée.

Nous ajoutons 6 grammes d'acide urique et 2 grammes de sulfate d'ammonium comme respectivement source de carbone et source d'azote.

Le pH est de 7,6. On stérilise à 105° C pendant 20 minutes. On lit la densité optique du surnageant après une demi-heure d'attente pour permettre la décantation de l'acide urique encore présent.

Nous pouvons ajouter 15 grammes de gélose par litre pour obtenir un milieu solide qui nous servira pour 3 motifs différents :

- 1) à conserver les souches ;
- 2) de milieu de numération ;
- 3) de milieu d'isolement.

Dans ce milieu, seul l'acide urique est insoluble ; on constate alors facilement si une colonie utilise l'acide urique par la présence d'une plage de lyse.

Dans les étapes suivantes, on fera varier la composition du milieu en changeant les sources de carbone et d'azote : l'acide urique, source de carbone par l'acide glyoxylique et l'urée source d'azote, à la place du sulfate d'ammonium et de l'acide urique. L'acide glyoxylique et l'urée sont choisis car ceux sont les produits intermédiaires dans le catabolisme de l'acide urique que nous avons vu précédemment.

b) Recherches de souches dégradant l'acide urique :

Nous avons recherché les souches dans les lieux où nous avons de fortes chances de les trouver en contact avec l'acide urique, c'est-à-dire sur les terres d'épandage où les fientes peuvent servir d'engrais, et aux endroits de leur production, le poulailler.

Nous avons choisi de faire nos recherches sur 2 endroits :

- sur une terre d'épandage de fientes de canard ;
- sur une terre d'un poulailler.

Nous avons d'autre part essayé quelques souches isolées par l'UCAAB. à la surface des fientes :

- un geotrichum
- un aspergillus type glaucus
- un aspergillus niger
- un penicillium
- un mucor
- une levure

1) Recherche sur une terre d'épandage de fientes de canard

32 souches ont été isolées ; toutes sont des bactéries, de nombreuses sont de mêmes espèces. Nous les avons nommées SC (S pour souche, C pour canard).

Nous avons suivi la croissance de trois d'entre elles (SC₁, SC₂, SC₃), sur quatre milieux différents tous semblables au milieu simple, seule la source de carbone varie. Les trois souches ont été choisies pour leur comportement différent sur acide glyoxylique et acide urique lors de tests préalables.

| Milieux | Eléments | Source de carbone | Concentration en g/l |
|---------|----------|--------------------------------------|----------------------|
| 1 | | Acide urique | 3 |
| 2 | | Acide urique + ξ peptone | 3 + 0,4 |
| 3 | | Acide glyoxylique | 1,3 |
| 4 | | Acide glyoxylique + ξ peptone | 1,3 + 0,4 |
| 5 | | ξ peptone | 0,4 |

Le milieu 5 sert de témoin.

Les courbes de croissance des 3 souches SC₁, SC₂ et SC₃ sur les différents milieux sont représentés dans les figures 4, 5 et 6.

La peptone, qui sert ici de point de départ du métabolisme, n'est pas essentielle.

La souche SC₁ hydrolyse et croit sur l'acide urique utilisé en tant que source de carbone. De même, elle se développe sur l'acide glyoxylique.

La souche SC₂ croit sur l'acide urique et l'hydrolyse mais ne semble pas croître sur l'acide glyoxylique.

Il y a une très faible croissance dans tous les cas pour SC₃.

Les milieux ont été stérilisés. Dans une autre expérience de culture de SC₁, nous avons évité la stérilisation afin de vérifier si l'acide urique n'était pas en partie dégradé lors d'une stérilisation. (figure 7).

Sur un milieu contenant de l'acide urique et non ensemencé, on note la croissance de microorganismes non déterminés. D'après nos expériences et nos constatations, ce serait l'acide urique lui-même qui serait contaminé. Sur l'acide urique commercial nous avons isolé une souche qui ne s'est pas multipliée sur l'acide glyoxylique.

En conclusion, c'est surtout la souche SC₁ qui présente un réel intérêt pour la suite de cette étude, lors de la recherche sur terre d'épandage.

2) Recherche sur une terre d'un poulailler

21 souches ont été isolées dont deux sont des moisissures. Parmi celles-ci, deux souches ont été choisies après des tests préalables sur les milieux décrits ci-après :

- 1 souche bactérienne
(10⁹ cellules lors de l'isolement) (SP₁)
- 1 souche de moisissure
(SP₂ : S pour souche et P pour poules)

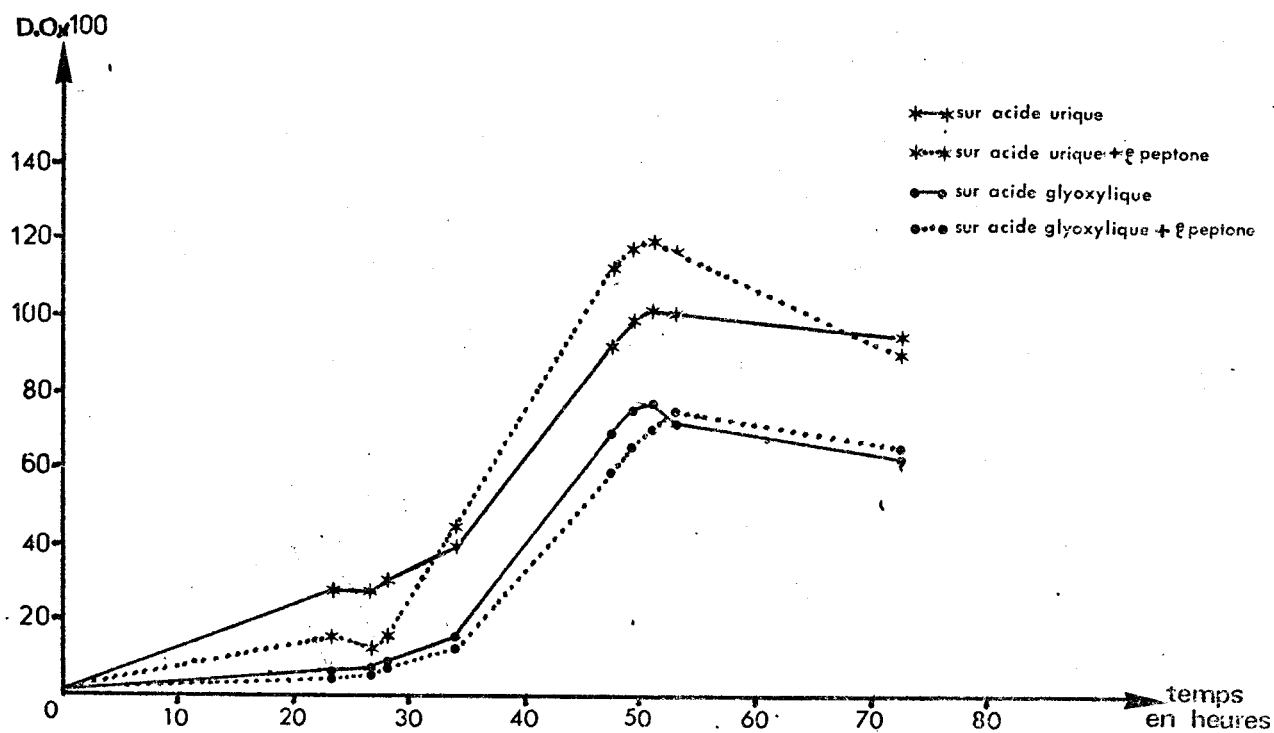


FIGURE 4

COURBES DE CROISSANCE DE SC1 SUR 4 MILIEUX DIFFERENTS.

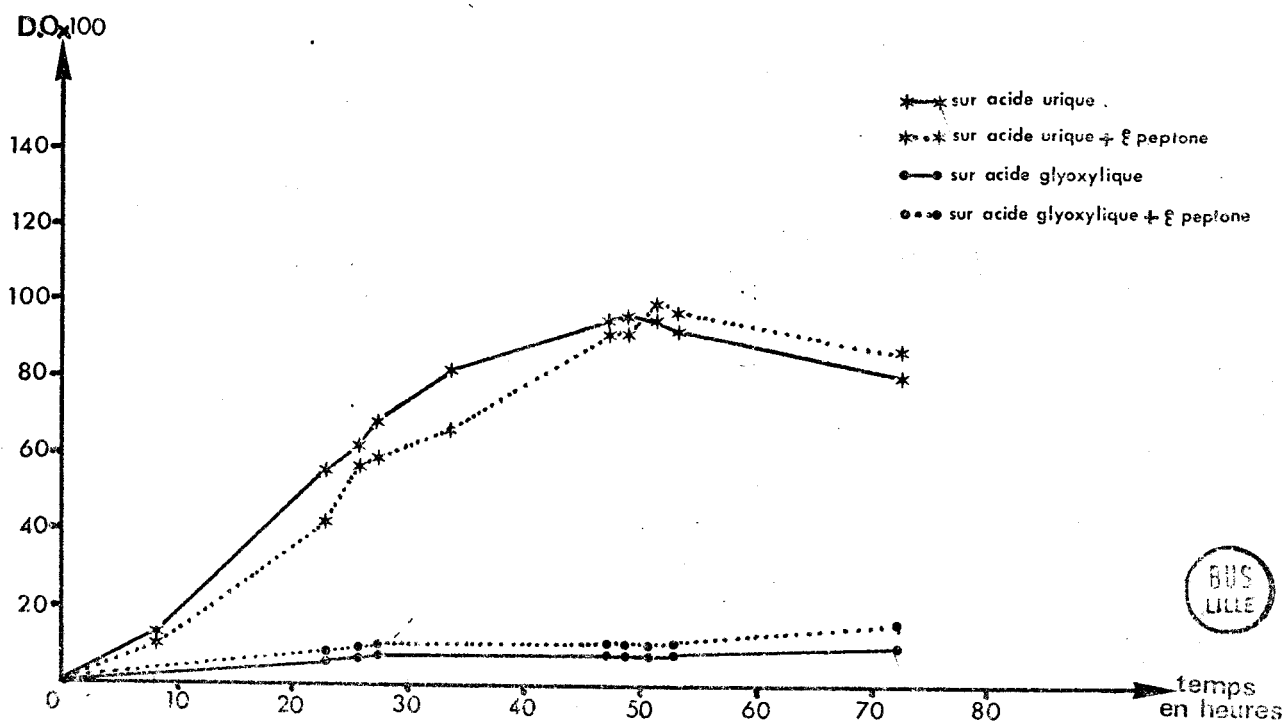


FIGURE 5

COURBES DE CROISSANCE DE SC2 SUR 4 MILIEUX DIFFERENTS.



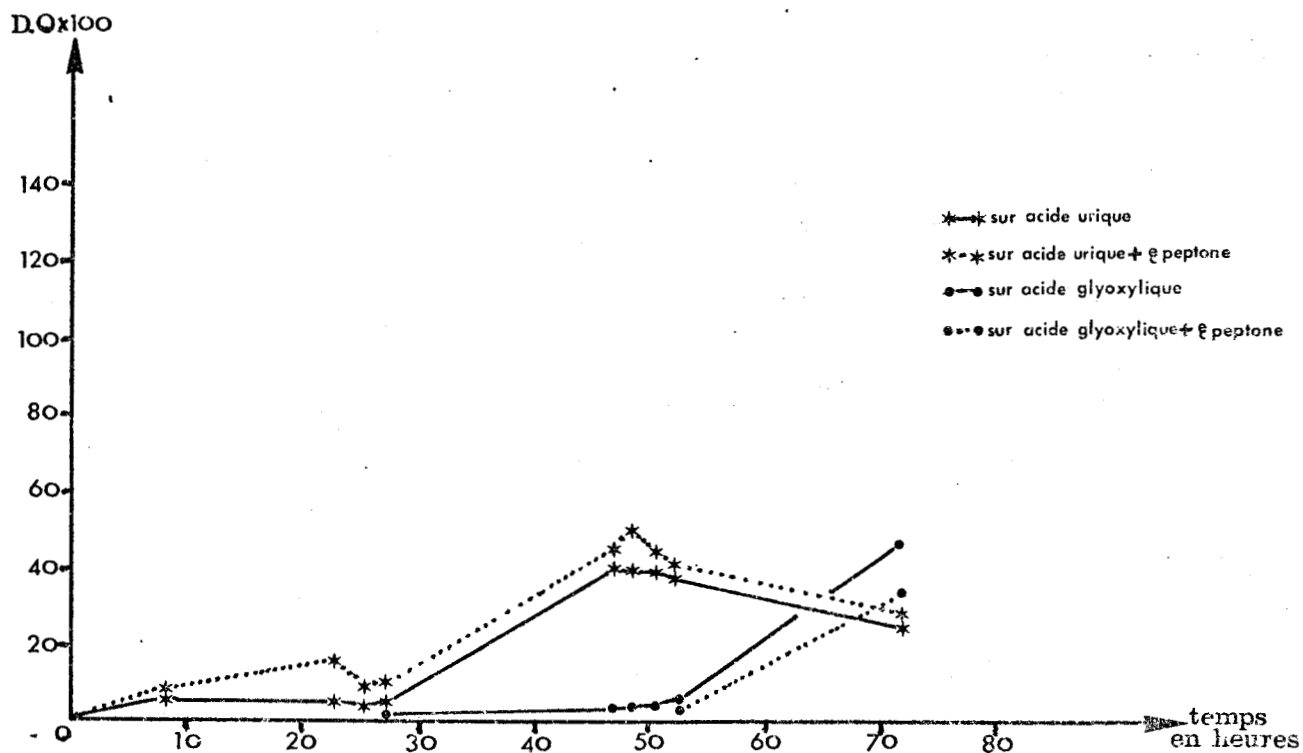


FIGURE 6

COURBES DE CROISSANCE DE SC3 SUR 4 MILIEUX DIFFERENTS

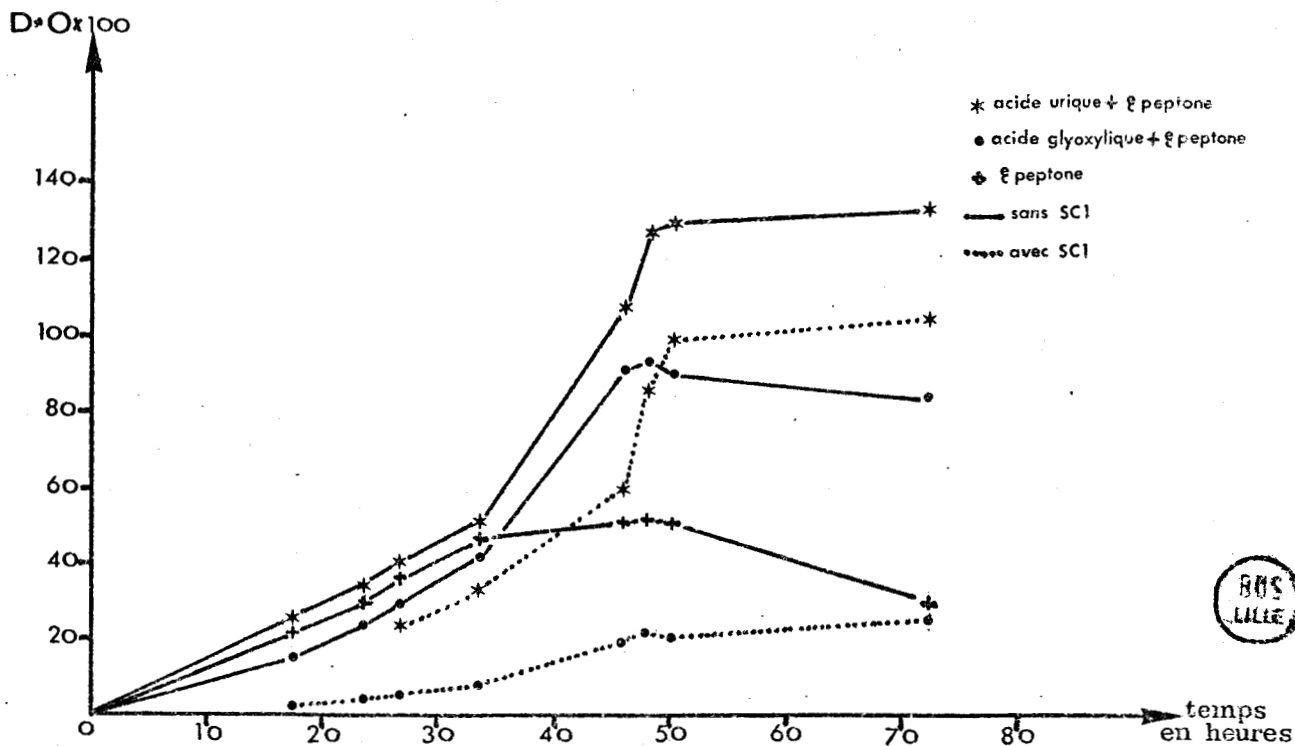


FIGURE 7

COURBES DE CROISSANCE DE SC1 SUR 3 MILIEUX DIFFERENTS NON STERILES



Pour tester SP_1 , nous avons utilisé 4 milieux ayant des sources de carbone et des sources d'azote différentes ajoutées au milieu de base MSB_1 . Le tableau suivant rapporte en g/l les valeurs des paramètres variables.

| MILIEUX | SOURCE DE CARBONE | | | SOURCE D'AZOTE | |
|---------|-------------------|-------------------|---------|--------------------|------|
| | Acide urique | Acide glyoxylique | glucose | Sulfate d'ammonium | urée |
| A | 6 | | | 2 | |
| B | 6 | | | | |
| C | | 2,8 | | 2 | |
| D | | | 3,1 | | 4,5 |

Les quantités sont données en grammes /litre.

Il faut noter que dans le milieu B, l'acide urique sert à la fois de source de carbone et de source d'azote.

Après stérilisation à $105^\circ C$, pendant 30 minutes, (l'urée du milieu D ayant été filtrée à part sur filtre millipore), on ensemence par la souche SP_1 les 4 milieux A, B, C et D après préculture sur milieu contenant de l'acide urique comme seule source de carbone.

La croissance de SP_1 aux dépens des différentes sources de carbone est nette (figure 8). Notons la faible différence de croissance sur les milieux ayant comme source de carbone l'acide urique (A et B), avec une phase exponentielle plus

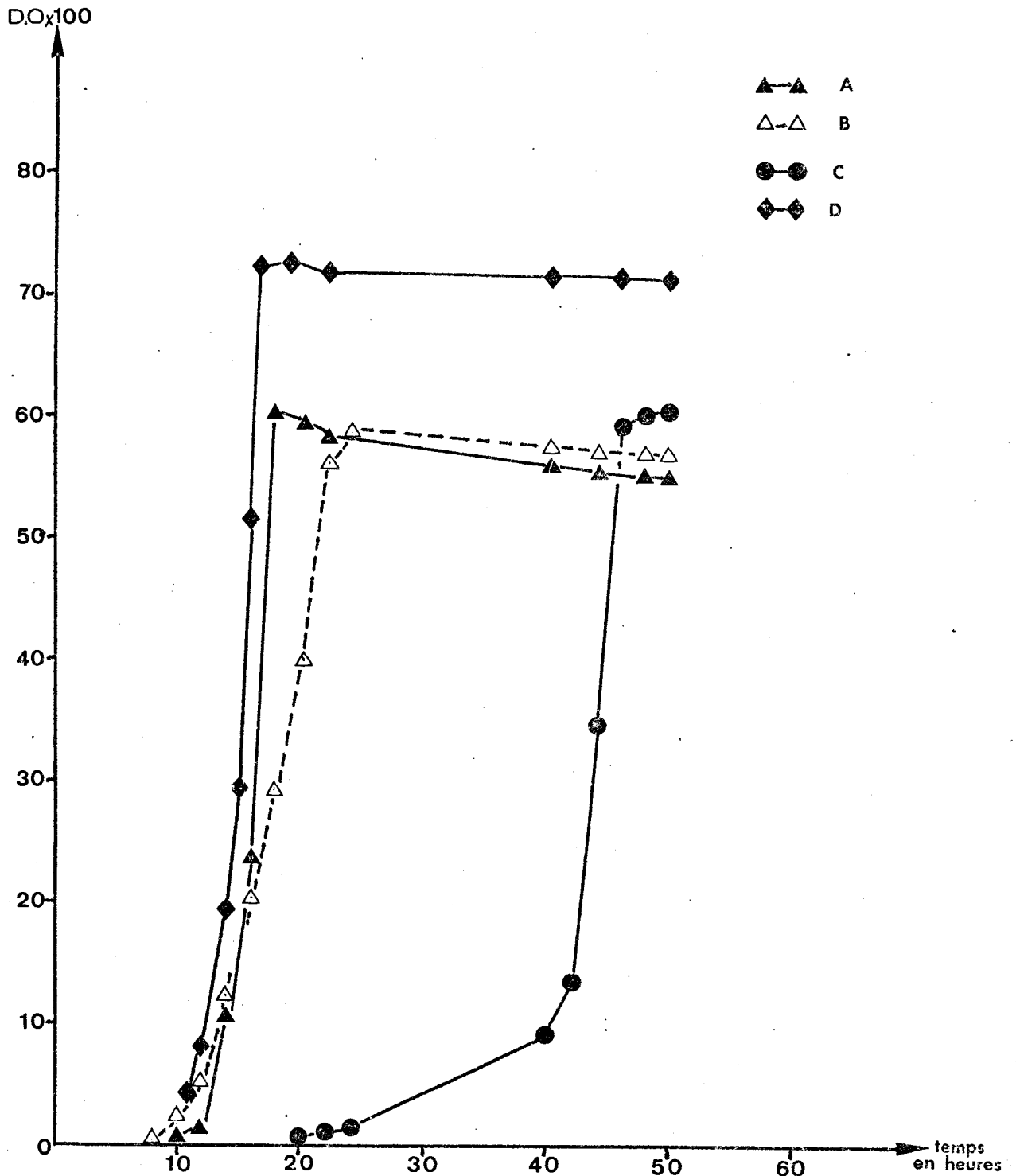


FIGURE 8

CROISSANCE DE SP1 SUR 4 MILIEUX DIFFERENTS

A: acide urique comme source de carbone

B: acide urique comme source de carbone et d'azote

C: acide glyoxylique comme source de carbone

D: urée comme source d'azote et glucose comme source de carbone



nette pour le milieu A qui a deux sources d'azote : le sulfate d'ammonium plus rapidement utilisé, parce que tout de suite disponible sous forme d'ions ammonium et l'urée contenue dans l'acide urique.

La croissance en présence d'urée est plus rapide, et l'addition de glucose comme source de carbone favorise l'obtention d'une plus forte quantité de cellules. La source glucidique est plus rapidement assimilée (1), la source azotée est plus lentement métabolisée. Le milieu D peut d'ailleurs servir de témoin pour l'ensemble de l'expérience.

La croissance sur l'acide glyoxylique est comparable à celle sur l'acide urique pour la quantité, mais nous avons l'existence ici d'un très grand temps de latence : départ réel de la croissance vers les 40 heures. Remarquons que l'on peut diminuer ce laps de temps de 7 à 10 heures en faisant une préculture sur un milieu à l'acide glyoxylique.

En résumé, nous pouvons conclure que la souche SP₁ croît sur les dérivés de l'acide urique (C et D) après hydrolyse de celui-ci (A et B).

3) Souches isolées de fientes (U.C.A.A.B.)

La souche de levure a une croissance faible. La lyse de l'acide urique est de 5 % après 2 jours et de 10 % après 6 jours.

La souche d'Aspergillus niger présente un mycélium sous forme de boules dans le milieu liquide après 7 jours de culture : 0,3 g/l, sur 3 g/l total d'acide urique, sont lysés pour l'obtention de 0,1 g/l de mycélium.

Les autres souches ne se développent pas sur notre milieu à l'acide urique. Remarquons cependant que les 6 souches isolées sur les fientes, se développent sur le milieu synthétique avec prise en masse au bout de 2 jours (apparition de paillettes).

C - DÉTERMINATION DES SOUCHES :

Après des tests préliminaires, dont certains aspects sur les boîtes de pétri remplies avec le milieu à l'acide urique sont indiqués sur la photo à la page suivante, nous sommes surtout attachés à la détermination de deux souches bactériennes (SC_1 et SP_1) et à la souche de moisissure SP_2 .

a) Détermination des 2 souches bactériennes :

Les 2 souches SC_1 et SP_1 sont des petits bacilles à gram négatif. Leurs colonies sont plus ou moins muqueuses. Ils n'ont aucune réaction avec le milieu de KLIGLER : ils ne fermentent donc ni le glucose, ni le lactose. Ils sont oxydase positif. L'ensemble de ces faits et leur provenance du sol prouvent qu'ils font partie de la famille des PSEUDOMONADACEAE ou de genres très proches.

L'ensemble des tests (8, 17, 55) résumés dans le tableau suivant ont été effectués ; ceci nous permet de conclure que les 2 souches sont très voisines l'une de l'autre et que ce sont toutes deux des PSEUDOMONAS.

LEGENDE

Boîtes de Pétri sur fond noir contenant le milieu à l'acide urique et certaines souches :

- en haut, à gauche : témoin ; gélose opaque et blanche.
- en haut, à droite : souche bactérienne SC₁ après 3 jours d'ensemencement. La croissance, le long des stries effectuées, est matérialisée par la limpidité du milieu.
- en bas, à gauche : souche bactérienne SC₃ après 5 jours d'ensemencement. L'acide urique est peu dégradé.
- en bas, à droite : souche de moisissure genre Rhizopus après 7 jours d'ensemencement. La dispersion des spores permet l'envahissement de toute la boîte. L'acide urique est presque entièrement dégradé.

| T E S T S | S C 1 | S P 1 |
|----------------------------|----------------------------|-----------------|
| - Gram | - | - |
| - Forme | petits bacilles | petits bacilles |
| - Oxydase | + | + |
| - KLIGLER | Lactose | - |
| | Glucose | - |
| | H ₂ S | - |
| | Gaz | - |
| - SUCRES (Fermentation) | Glucose | faible |
| | Lactose | - |
| | Saccharose | - |
| - Pigmentation (KING B) | - | - |
| - Urée Christensen | + ou - | + |
| - Gélose nitrate | + | + |
| - Citrate Simmons | + | + |
| - Mobilité | + (faible) | + |
| - MEVAG | oxydant | oxydant |
| - Hugh et Leifson | oxydant | oxydant |
| - Type respiratoire | Aérobie stricte | Aérobie stricte |
| - Cetolactose | - | - |
| - Indole | - | - |
| - Lactosé 10 % | bleu (-) | bleu (-) |
| - Arginine | avec huile de paraffine | - |
| | sans huile de paraffine | + (léger) |
| - Gélatine | croissance | - |
| | liquéfaction | - |
| - Cellulose (SKERMAN) | - | - |

BUS
LILLE

b) Détermination de la souche de moisissure SP₂ (5)

La souche SP₂ présente des colonies floconneuses, d'un vert gris devenant gris foncé avec l'âge. Ce changement de coloration serait dû à l'oxydation. Le revers des colonies sous la gélose est jaune sale. Ces observations ont été faites sur gélose ordinaire, le coloris variant suivant le milieu : blanc par exemple sur notre milieu à l'acide urique.

Au microscope optique, on distingue un mycélium cloisonné et la présence de phialides.

Ces caractéristiques montrent que nous sommes en présence d'un pénicillium, le Pénicillium commune.

Remarque : Outre la souche SP₂, nous avons isolé une souche de coloration grisâtre. Ses colonies envahissaient très vite toute la surface gélosée ; à leur surface on pouvait y voir des sporanges noirs. L'incrustation dans la gélose était forte.

Au microscope, outre le mycélium non cloisonné, fait de stolons (parties aériennes du mycélium) et de pseudo-racines (explication de l'incrustation), on notait la présence d'appareils sporifères perpendiculaires au plan de croissance du mycélium.

Cette souche était un rhizopus (47) qui, malheureusement "vieillissait" très mal (apparition à la surface d'un duvet stérile) sur notre milieu à l'acide urique ou perdait sa capacité de dégrader l'acide urique sur un autre milieu de conservation.

D - DISCUSSION :

Au vue de nos résultats expérimentaux, 2 souches bactériennes nous ont paru intéressantes : SC₁ et SP₁. Toutes les deux dégradent l'acide urique et se développent dessus (figures 4 et 8), mais se développent également sur l'acide

glyoxylique (figures 4 et 8), avec un temps de latence plus élevé pour SP₁ que pour SC₁ et sur l'urée (SP₁ : figure 8).

Par ailleurs, la souche de moisissure SP₂ de coloration verte, très facilement conservable, a été étudiée. Une moisissure apporte une plus grande richesse en protéines que les bactéries, dans la qualité et par conséquent est plus intéressante pour nos travaux sur les fientes.

Le tableau suivant résume l'action de chaque souche étudiée sur l'acide urique et sur deux de ses dérivés : l'acide glyoxylique et l'urée.

| Souches | Acide urique | Acide glyoxylique | Urée |
|--------------------------------|--------------|-------------------|------|
| - SC ₁ (bactérie) | + | + | + |
| - SC ₂ (bactérie) | + | - | + |
| - SC ₃ (bactérie) | + | - | + |
| - SP ₁ (bactérie) | + | + | + |
| - SP ₂ (moisissure) | + | + | + |
| - Levure (UCAAB) | - | - | - |
| - Aspergillus niger (UCAAB) | + | - | + |

Trois souches donc ressortent pour leurs propriétés concernant l'acide urique et ses dérivés; SC₁, SP₁ et SP₂.

ETUDES DES SUBSTRATS ET DE DIVERS FACTEURS DU MILIEU SIMPLE

ESSAIS D'AMELIORATION DES MILIEUX SIMPLES ET SYNTHETIQUE

Nous étudions dans ce chapitre, l'évolution des différents substrats comme l'acide urique, l'urée et l'acide glyoxylique dans nos milieux lors de la croissance des souches sélectionnées précédemment SC_1 , SP_1 et SP_2 et nous essayons d'améliorer les milieux par l'addition de produits facilement accessibles (acide lactique et lactosérum) qui apportent d'autres sources de carbone.

A) Le pH :

Nous abordons rapidement le problème du pH pour nous placer dans les conditions optimales de croissance des souches.

Dans 10 fioles d'Erlenmeyer de 500 millilitres, on introduit 100 millilitres de notre milieu simple contenant comme source de carbone 5 grammes d'acide urique. Après avoir ajusté le pH du contenu de chaque fiole à des valeurs différentes, on ensemence avec SP_1 provenant d'une préculture sur milieu simple dont le pH de départ était de 7,6.

Nous suivons l'évolution du pH, au cours du temps de chaque culture (figure 9).

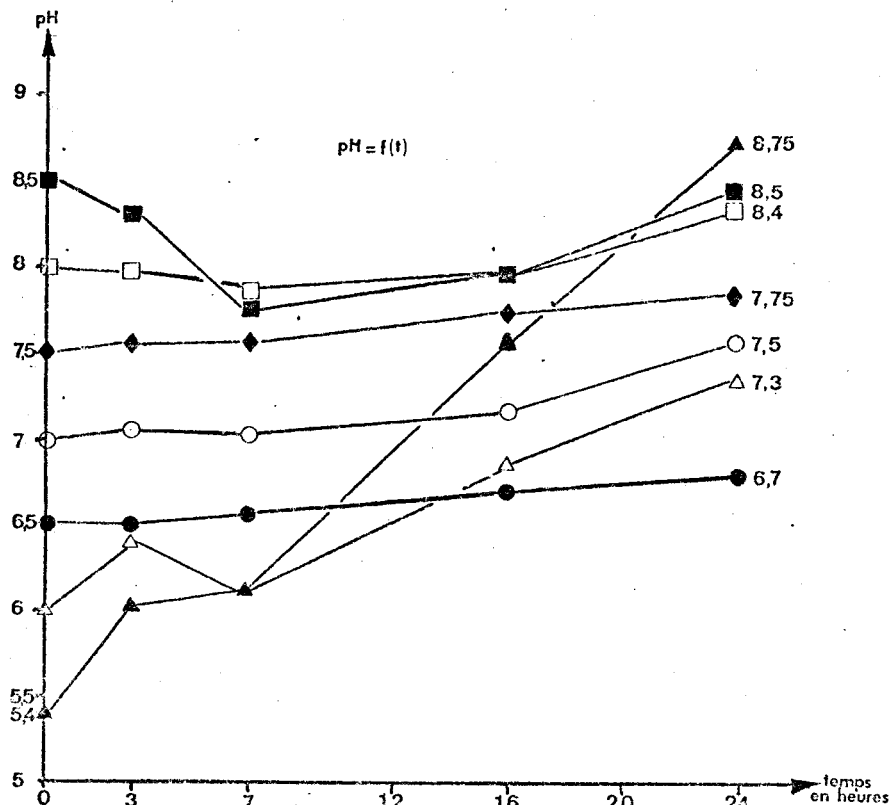


FIGURE 9

EVOLUTION DU pH LORS DE LA CROISSANCE DE SP_1 SUR MILIEUX SIMPLES
DONT LES pH DE DÉPART DE CULTURE SONT DIFFÉRENTS.

L'aspect de chaque culture est différent : précipité floconneux pour les pH basiques (8 ; 8,5 et 9), précipité plus fin laissant un surnageant totalement limpide pour les autres pH (surtout 5,4 ; 5,1 et 4,7).

Les deux pH très acides 4,7 et 5,1 ainsi que le pH de 9 ont empêché toute croissance. La croissance est plus rapide pour les pH proches de la neutralité 6,5 ; 7 et 7,5 (début de phase exponentielle au bout de 12-13 heures) que pour les autres (début de phase exponentielle au bout de 16 à 18 heures). Le milieu pour les pH neutres est bien tamponné. Par contre, il est très mal tamponné pour les pH acides 5,4 et 6. La tendance vers les pH basiques pour les fins de culture est dû à la formation de l'urée, puis de l'ammoniac après la dégradation de l'acide urique. Pour les pH trop acides, nous supposons que la libération de l'ammoniac est trop brutale et se fait en trop grande quantité dans le milieu par les bactéries qui essayent de lutter contre la trop grande acidité. Le pH est trop élevé pour les milieux de pH 8 et pH 8,5.

Pour nos expériences à suivre, nous pouvons donc utiliser le pH de 7,5 proche du pH de notre milieu simple normal : 7,6 ; cependant comme celui de 6,5 est plus approprié pour les études de moisissures, nous nous en accommoderons.

B) CINÉTIQUE DE DISPARITION ET D'APPARITION DE PRODUITS

Nous étudions l'évolution des concentrations de l'acide urique et de deux dérivées terminaux l'acide glyoxylique et l'ammoniac sous forme d'ions ammonium.

On ensemence notre milieu simple ayant pour source carbonée l'acide urique (3g/l) par la souche SC₁ à l'aide d'une öse. 100 millilitres du milieu sont contenus dans une fiole d'Erlenmeyer de 500 millilitres.

Les résultats sont donnés à la figure 10.

Il faut signaler que les échelles en abscisses des différents composés : (acide urique, NH_4^+ et Acide glyoxylique) donnés en g/l, sont différentes les unes des autres et qu'ainsi

la hauteur du pic d'acide glyoxylique en valeur absolue par rapport à la concentration en acide urique est vingt fois moins importante.

Au fur et à mesure de la croissance de SC_1 , l'acide urique est consommé. Il y a arrêt de la phase exponentielle (DO = 60) au bout de 27 heures et demie, avec la lyse complète de l'acide urique d'où la nécessité de vérifier la concentration limitante d'acide urique pour notre milieu.

Notre dosage à l'acide glyoxylique, nous révèle son apparition faible au début de la phase exponentielle (après 21 heures). L'acide glyoxylique est alors immédiatement consommé. Le délai d'environ trois heures est certainement dû à la mise en route du cycle de Krebs de chaque cellule.

La concentration en ions ammonium reste relativement constante : variation entre 0,55 g/l concentration la plus basse et 0,82 g/l pour la concentration la plus forte pour une concentration au départ de 0,7 g/l.

On peut cependant noter l'apparition des ions ammonium due à la lyse de l'urée après 23 heures. Le résultat pour les ions ammonium est difficilement interprétable vu l'existence dans le milieu de deux sources d'azote : le sulfate d'ammonium et l'acide urique et par conséquent deux origines pour les ions ammonium : le sulfate et l'urée.

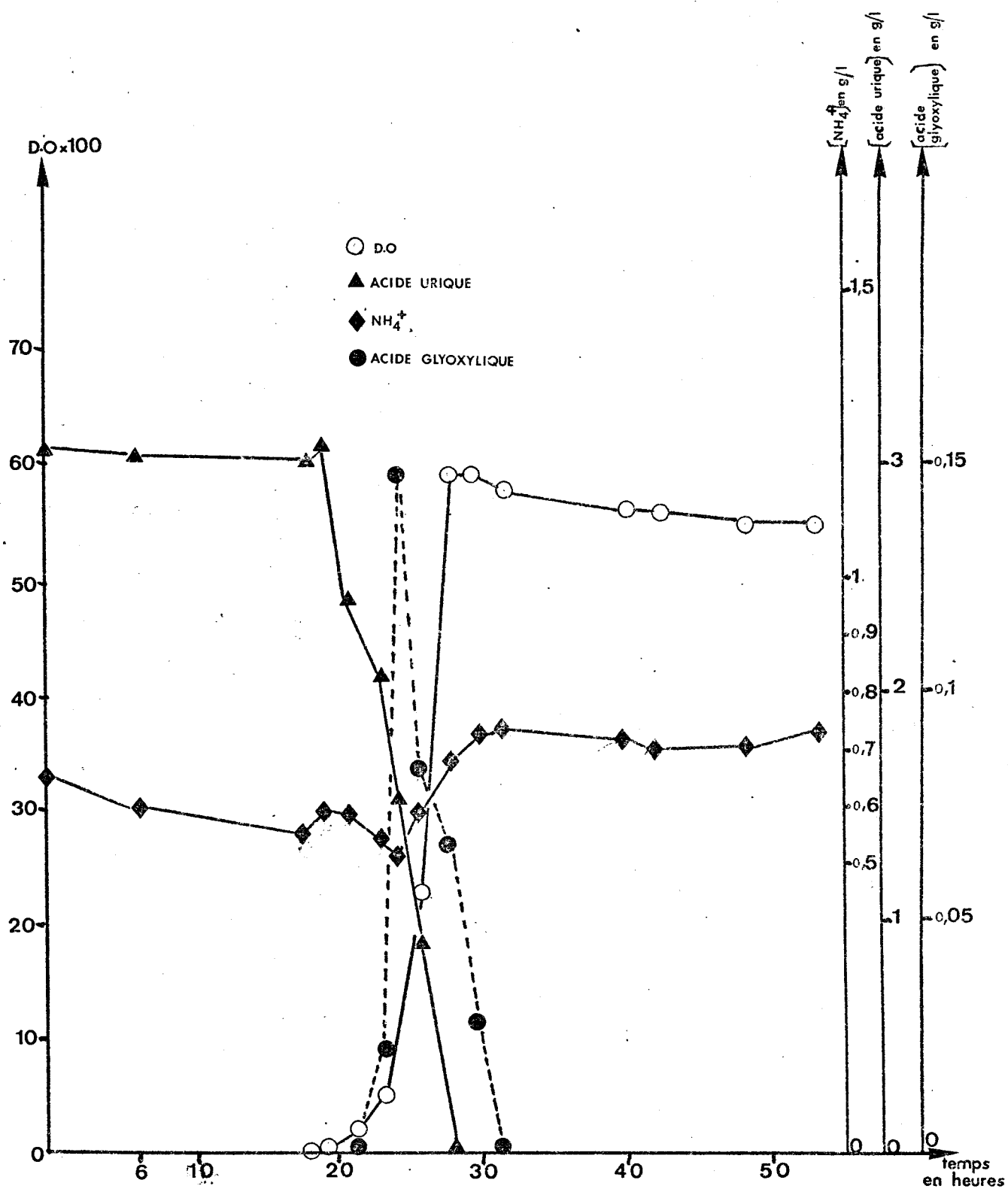


FIGURE 10

Evolution des concentrations de l'acide urique et de deux dérivés (NH_4^+ et Acide glyoxylique) au cours de la croissance de SC_1 sur le milieu simple ayant comme source de carbone uniquement l'acide urique.

c) ÉTUDE DE L'ÉVOLUTION DES SUBSTRATS LES PLUS IMPORTANTS ET LEURS CONCENTRATIONS LIMITANTES

1) Evolution de la concentration de l'urée :

Nous avons vérifié la dégradation de l'urée par la souche SP₁. La croissance est forte, mais la source de carbone (le glucose) est ici une matière trop parfaite en remplacement de l'acide urique (figure 8, courbe D).

Dans un milieu contenant l'urée comme seule source d'azote et de carbone, nous n'avons pas constaté de croissance.

Nous avons alors combiné dans un milieu simple, l'urée (4,5 g/l) comme source unique d'azote et l'acide glyoxylique (2,8 g/l) comme source de carbone. Nous avons obtenu une croissance semblable à celle de SP₁ sur un milieu ayant pour seule source de carbone l'acide glyoxylique (2,8 g/l) et comme source d'azote le sulfate d'ammonium (4 g/l) (figure 11).

L'allure générale de la courbe de consommation (figure 11 bis) de l'urée, convertie en ions ammonium (2,7 g/l au départ après l'action d'une uréase) est semblable à celle des ions ammonium provenant du sulfate d'ammonium de la figure 11. Il reste cependant, en fin de phase exponentielle 1,6 g/l d'ions ammonium, soit 2,66 g/l d'urée. L'urée est donc en excès dans notre expérience.

Nous n'avons pas trouvé d'ions ammonium libres lors de notre dosage.

L'hydrolyse de l'urée n'est pas une réaction produisant de l'énergie (56). Par son alcalinité, elle inhibe (4) les organismes non alcalino-résistants ce qui n'est pas le cas de notre souche.

2) Evolution de la concentration de l'acide glyoxylique

Les conditions de l'expérience ont été indiquées à l'évolution de l'urée. L'ensemencement est fait à partir d'une préculture sur milieu à l'acide urique.

Les résultats sont indiqués à la figure 11.

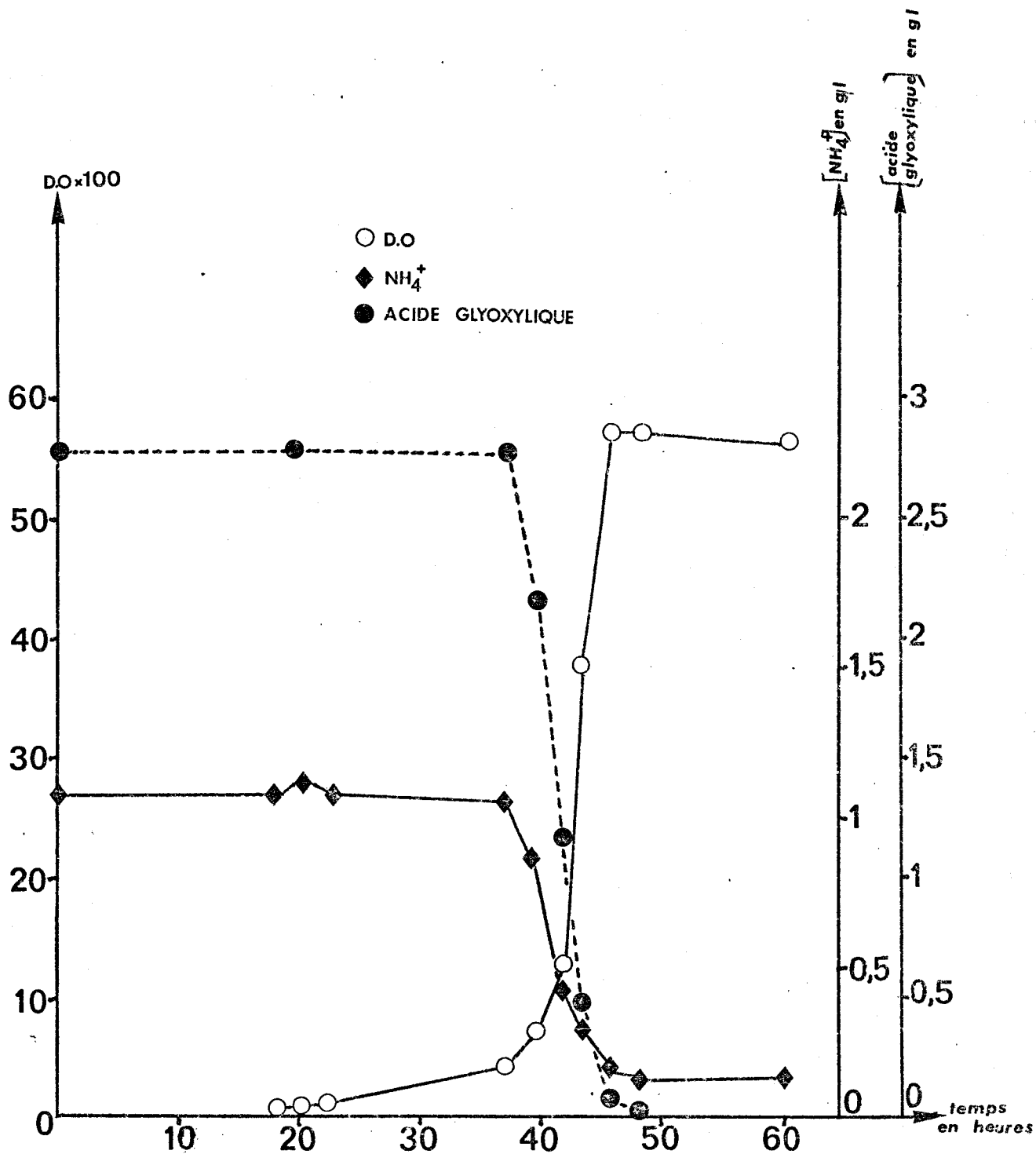


FIGURE 11

Evolution de la concentration de l'acide glyoxylique et de la concentration des ions ammonium au cours de la croissance de SP_1 sur un milieu simple avec l'acide glyoxylique comme source de carbone et le sulfate d'ammonium comme source d'azote.

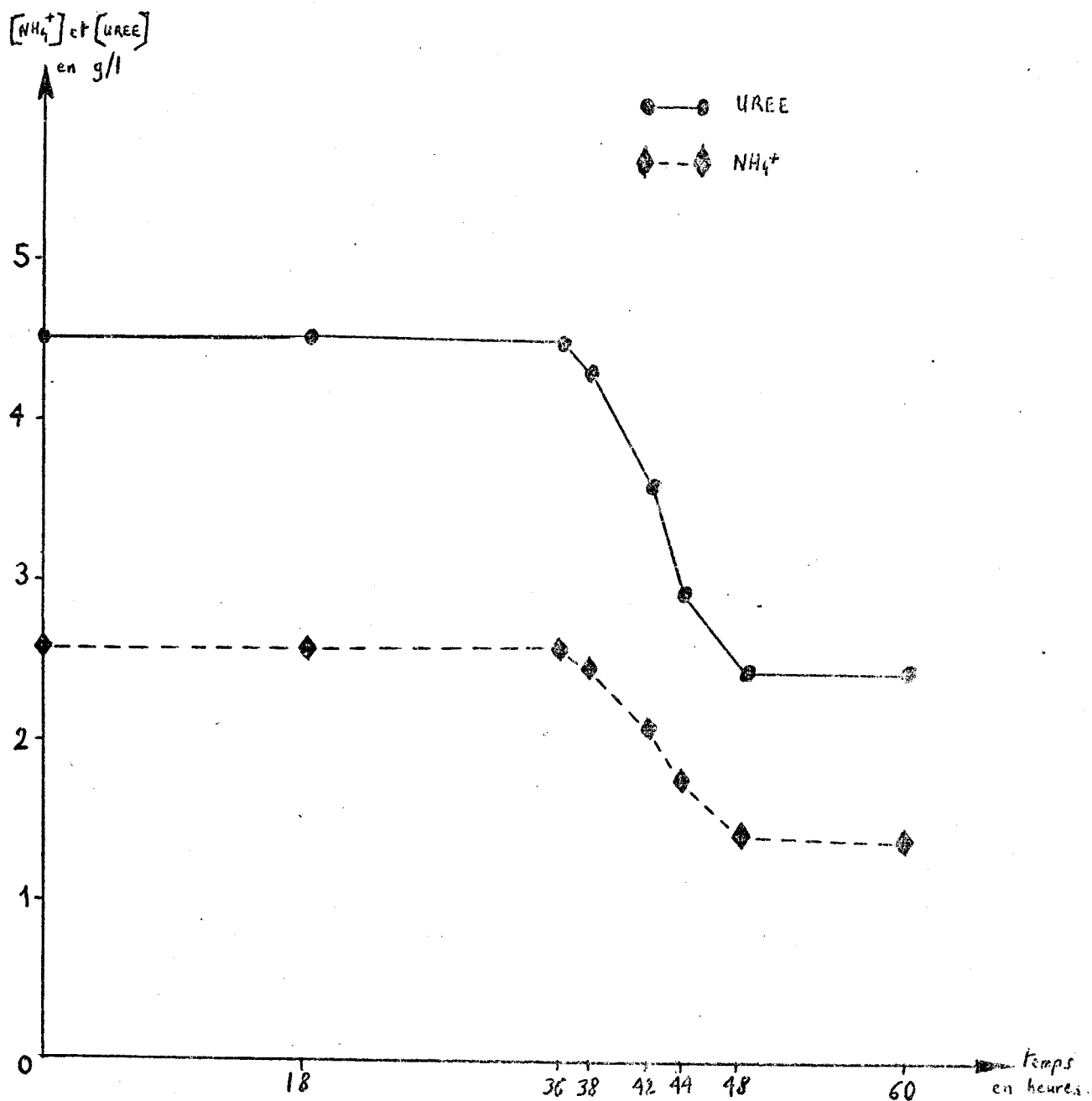


FIGURE 11 bis

Consommation de l'urée au cours de la croissance de SP_1 sur un milieu simple avec l'acide glyoxylique comme source de carbone et l'urée comme source d'azote. La courbe de consommation de l'urée correspond à celle des ions ammonium rectifiée par le calcul.



L'acide glyoxylique est entièrement consommé , alors que les 1,1 g/l d'ions ammonium contenus au départ dans le milieu, ne le sont pas totalement : il reste 0,15 g/l.

De ces résultats, il nous semble devoir apprécier dans le paragraphe suivant les concentrations limitantes des produits, surtout ceux qui apportent au milieu la source de carbone : l'acide urique et l'acide glyoxylique.

3) Acide urique et acide glyoxylique : leurs concentrations limitantes :

a) Acide urique :

On utilise le milieu simple avec des concentrations différentes en acide urique.

Nous avons utilisé deux séries de milieux que nous avonsensemencées avec SP_1 , et une autre série par SP_2 . On mesure la D.O. pour SP_1 et le poids sec pour SP_2 .

SP_1

Pour l'expérience, la première série de milieux contenus dans des fioles d'Erlenmeyer de 500 ml et représentant un volume de 100 ml, a étéensemencée par SP_1 pris à partir d'une suspension forte dans de l'eau physiologique (concentration du chlorure de sodium : 8,5 g/l). 0,1 ml de cette suspension de densité optique égale à 0,12, est mis dans chaque fiole contenant respectivement 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 et 10 grammes par litre en acide urique.

La deuxième série, estensemencée par SP_1 pris à partir d'une préculture dont la densité optique est à 0,15. Le protocole d'ensemencement est le même ensuite que pour la première série. La préculture est faite sur milieu simple contenant comme seule source de carbone l'acide urique (3 g/l) (La densité optique de 0,15 est atteinte au bout de 21 heures 30 minutes).

Nous avons mesuré la densité optique, au bout de 23 heures pour la première série et, au bout de 23 heures 30 minutes et 28 heures pour la deuxième série. Les résultats sont résumés à la figure 12.

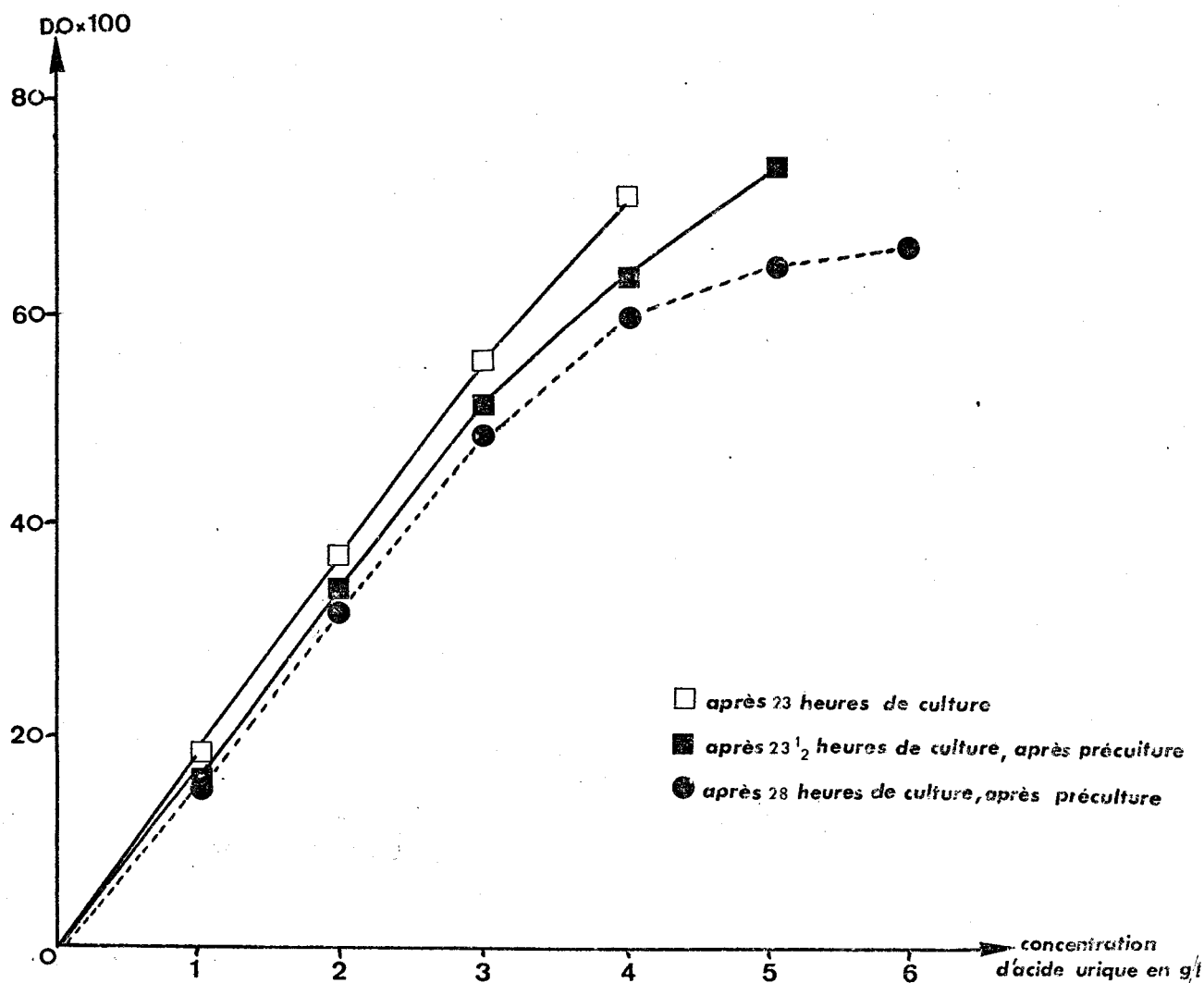


FIGURE 12

L'acide urique, concentrations limitantes pour la souche SP₁.

Après une préculture, au bout d'un même nombre d'heures, une plus forte concentration en acide urique est hydrolysée : 5 g/l contre 4 g/l après une culture directe.

Après 28 heures, les concentrations de 6 g/l sont hydrolysées. Les concentrations essayées de 10 g/l, ont été hydrolysées après 36 heures pour une densité optique de 56.

Le palier est atteint à 5 g/l dans nos conditions de travail. La densité optique diminue pour une même concentration : lyse des cellules après la fin de la croissance.

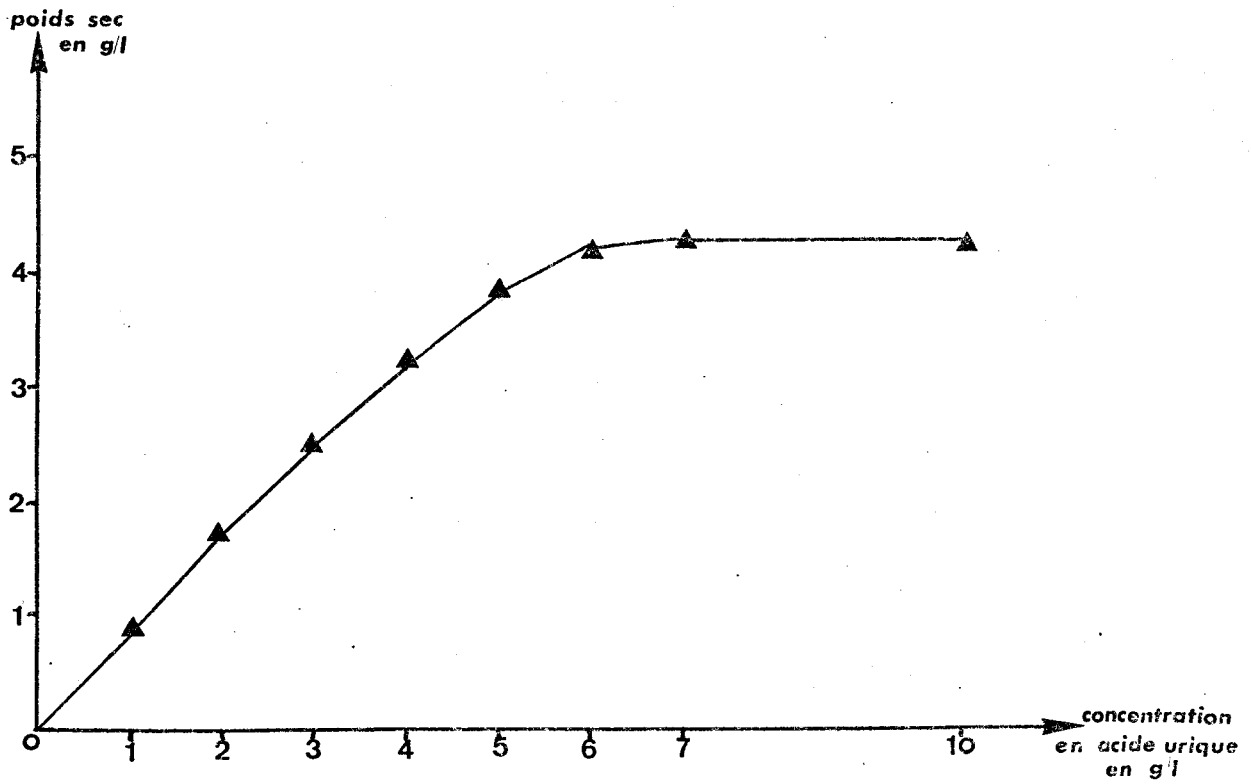


FIGURE 13

L'acide urique, concentrations limitantes pour la souche
 SP₂ après 48 heures de culture.

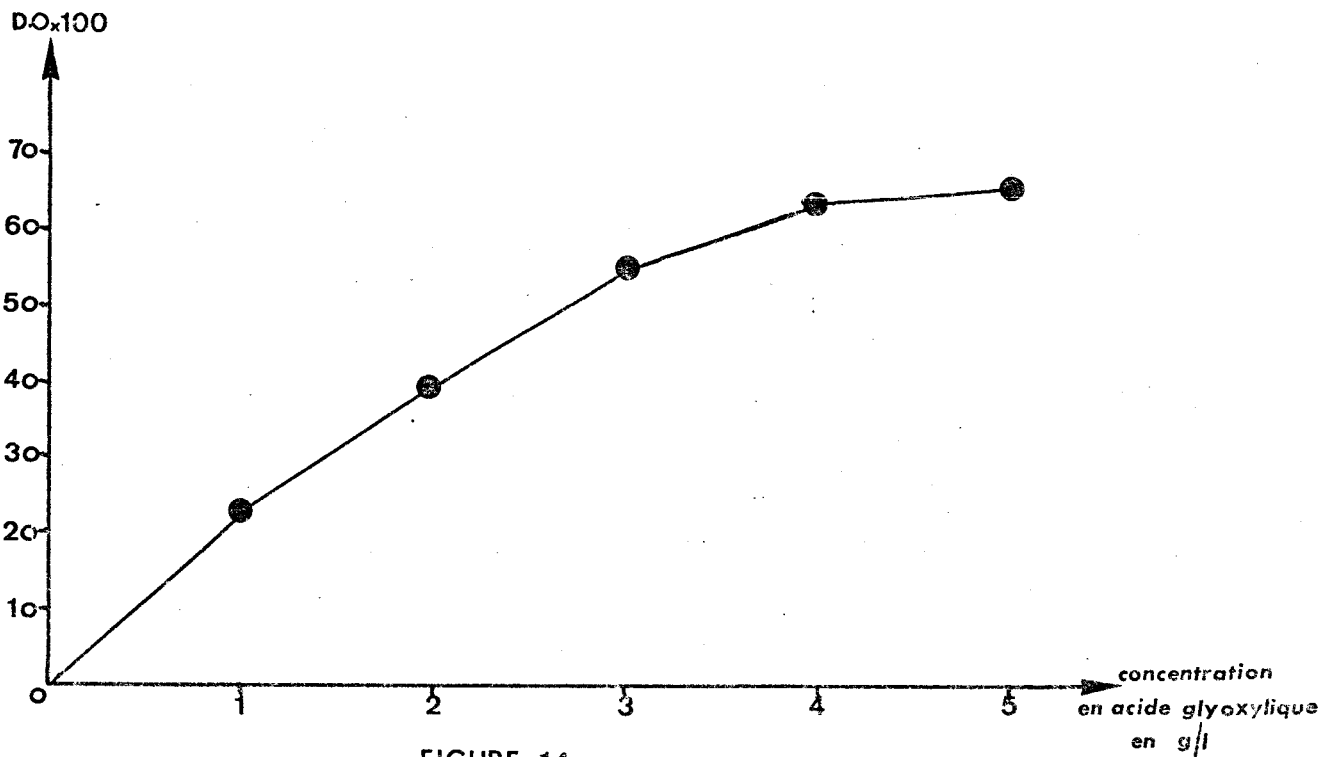


FIGURE 14

L'acide glyoxylique, concentrations limitantes pour la souche
 SP₁ après 4 jours de culture.

Par ailleurs, nous avons ajouté de l'acide urique (3 g/l) dans la fiole d'Erlenmeyer contenant le milieu avec 3 g/l en acide urique après lyse complète de celui-ci (au bout de 23 heures). Nous obtenons une densité optique de 98 pour 6 g/l d'acide urique final contre 67 pour 6 g/l d'acide urique sans additions successives.

SP₂

De même que pour la première série de SP₁, nous avons ensemencé une série par la souche de moisissure de SP₂ à partir d'une suspension faite dans de l'eau physiologique. 0,1 ml de cette suspension limpide a été placé dans chaque milieu.

Les résultats (figure 13) pour 6 g/l et 10 g/l sont la différence entre le poids sec total final et le poids de l'acide urique qui n'était pas entièrement hydrolysé : il restait 0,2 g/l pour 6 g/l au départ en acide urique et 3,9 g/l pour 10 g/l. Les poids secs sont effectués après filtration, sur le contenu du filtre.

Le dosage de l'acide urique est effectué sur le filtrat. On peut constater que le palier est atteint après la concentration de 6 g/l pour un poids sec de 4,25 g/l.

b) Acide glyoxylique :

On utilise toujours le milieu simple avec cette fois-ci l'acide glyoxylique comme source de carbone. Le protocole de manipulation est le même que pour l'acide urique : concentration croissante en acide glyoxylique.

On ensemence avec SP₁ à partir d'une suspension.

Le palier est atteint à 4 g/l après 4 jours pour la plus forte concentration (figure 14) soit une concentration plus forte, que celle de l'acide glyoxylique contenu dans l'acide urique : dans 5 grammes d'acide urique, il y a 2,20 grammes d'acide glyoxylique.

D) ADDITION D'UNE NOUVELLE SOURCE DE CARBONE

Nous avons vu que les fientes manquaient surtout de source de carbone ; seules en effet les protéines en fournissent ainsi que l'acide urique mais la concentration de celui-ci varie fortement d'un lot de fientes à l'autre : 0,1 g/l à 6 g/l. Nous venons de voir que les concentrations limitantes, dans nos conditions de travail, dans nos milieux, sont relativement peu élevées. Par ailleurs la cellulose en abondance dans nos fientes n'est pas dégradée par nos souches.

Nous avons alors envisagé d'améliorer l'apport en carbone par l'addition de produit abondant et peu onéreux comme l'acide lactique que l'on trouve facilement dans les fromageries par exemple.

1) Addition d'acide lactique dans le milieu simple :

Les études ont porté sur le milieu simple avec l'acide lactique comme source de carbone supplémentaire à l'acide urique :

a) L'acide lactique : concentrations limitantes :

Nous avonsensemencé par SP₁ une série de fioles d'Erlenmeyer dont la concentration en acide lactique va de 0 g/l à 10 g/l.

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant :

| Concentration en acide lactique (g/l) | Densité optique (x 100) | | |
|---|-------------------------|-------------|--------------|
| | + 20 heures | + 44 heures | + 115 heures |
| 0 | 38 | 37 | 35 |
| 1 | 328 | 535 | 240 |
| 2 | 348 | 500 | 530 |
| 3 | 248 | 520 | 1 046 |
| 4 | 100 | 327 | 790 |
| 5 | 0 | 0 | 0 |

Le milieu est ajusté à pH = 7 par de la soude 3 N. La concentration en acide urique du milieu est de 3 g/l. L'ensemencement est effectué à partir d'une pré-culture dont le milieu simple ne contient que de l'acide urique (3 g/l) : 0,1 ml de pré-culture dans 100 ml de milieu contenu dans des fioles de 500 ml. La densité optique de la pré-culture après 21 heures est de 27. Les milieux sont placés sur agitateur à 30° C.

Il n'y a pas de croissance sur les milieux dont la concentration en acide lactique est supérieure à 4 g/l. Au bout de 20 heures, à 4 g/l l'acide urique n'est pas totalement hydrolysé : 1,4 g/l sont restés intacts. Nous obtenons de très fortes densités optiques supérieures à 1 000 à t = 115 heures et surtout à 300 pour t = 20 heures. La concentration limite pour nos conditions de travail est située entre 3 et 4 g/l.

b) Croissance de 3 souches sur l'acide lactique :
SP₁ et SP₂

Les conditions d'ensemencements et les facteurs de culture sont les mêmes que pour l'étude de l'acide lactique; concentrations limitantes. Pour chacune des souches, nous avons pris 3 concentrations différentes en acide lactique 1,2 et 3 g/l. Les pré-cultures sont interrompues après 24 heures pour SP₁ et 40 heures pour SP₂.

Les résultats sont dans le tableau suivant :

| | Concentration en acide lactique (g/l) | Densité optique (x 100) | | | |
|-----------------|---------------------------------------|-------------------------|--------|--------|---------|
| | | + 19 H | + 22 H | + 66 H | + 139 H |
| SP ₁ | 1 | 260 | 297 | 360 | 340 |
| | 2 | - | - | 897 | 540 |
| | 3 | - | - | 810 | 660 |
| SP ₂ | 1 | - | - | 360 | 370 |
| | 2 | - | - | 730 | 730 |
| | 3 | - | - | 692 | 510 |

Les cases vides indiquent que la densité optique n'a pas été prise : l'acide n'étant pas entièrement hydrolysé.

Pour SP₂, les résultats ne sont pas très significatifs, l'homogénéité du milieu pour la prise de densité optique, n'étant pas obtenue. La densité optique 360 correspond toutefois à un poids sec de 2,12 g/l.

Rhizopus

Nous avons ensemencé notre rhizopus à l'aide d'une öse dans un milieu simple n'ayant que de l'acide lactique comme seule source de carbone. La concentration initiale en acide lactique est de 4 g/l.

Le pH est de 7. L'agitation se fait à 30° C. La stérilisation a été faite à 100° C pendant 2 heures.

Les résultats sont les suivants :

| Temps (en heure) | Poids sec (en g/l) |
|------------------|--------------------|
| + 24 | 0,18 |
| + 45 | 0,24 |
| + 68 | 0,34 |
| + 90 | 0,48 |
| + 144 | 1,22 |
| + 168 | 1,34 |
| + 192 | 1,40 |

On observe un long délai d'adaptation. Il y a nécessité d'une préculture sur l'acide lactique, pour diminuer les délais, mais la quantité obtenue reste la même.

c) Conclusion :

L'acide lactique dérive de l'acide pyruvique par l'action réversible de la lactate déshydrogénase ; par l'action de la lactate oxydase, elle donne de l'acide acétique. L'acide lactique est donc très bien placé pour être immédiatement consommé, en passant par l'acide pyruvique, carrefour important

entre la chaîne d'EMBDEN-MEYERHOFF et le cycle de KREBS via l'acétyl CoA.

Nous envisageons cependant pour notre milieu complet et pour les fientes, d'utiliser plutôt le lactosérum acide, déchet encore plus accessible matériellement et moins purifié que ne l'est l'acide lactique.

2) Addition de lactosérum acide dans le milieu complet

Nous avons ajouté 40 grammes de lactosérum déshydraté et déminéralisé par litre de milieu complet. Nous avons cependant modifié le pH du milieu, ajusté finalement à 7.

a) SP₁

Nous avonsensemencé 100 ml de ce milieu par SP₁ dans une fiole l'Erlenmeyer placé en agitation à 30° C par 0,1 ml d'une préculture effectué sur un milieu simple contenant de l'acide urique comme seule source de carbone (3 g/l).

Au bout de 35 heures, l'acide urique est hydrolysé mais le lactose n'est pas touché.

Le dosage du lactose s'effectue, après filtration du milieu, sur le filtrat pour le séparer de la cellulose insoluble que l'on hydrolyse par la suite.

La méthode de LOWRY est utilisée pour le dosage des protéines solubles du milieu.

Le nombre de bactéries passe de $9,1 \cdot 10^5$ par millilitre au départ à $2,2 \cdot 10^9$ par millilitre après 35 heures de culture.

| Composants du milieu | Concentration de différents composants du milieu en g/l | |
|----------------------|---|-----------------|
| | t = + 0 heure | t = + 35 heures |
| Protéines solubles | 10,9 | 2,1 |
| Lactose (ORCINOL) | 32,8 | 32,7 |
| Cellulose | 6 | 5,9 |
| Acide urique | 6 | 0 |

Contrairement à l'essai préliminaire sur le milieu complet, il semble que l'acide urique soit dégradé en même temps que les protéines (6 grammes du milieu, plus les 4,90 grammes du lactosérum).

La non consommation du lactose confirme les résultats obtenus lors de la détermination de la souche.

b) SP₂

Après SP₁, nous avons par ailleurs effectué un essai avec SP₂ et nous nous sommes heurté de nouveau au phénomène des "paillettes" au bout de 2 jours de culture. Les différents composants du milieu ont très peu évolué comme l'indique le tableau suivant :

| Composants du milieu | Concentration de différents composants du milieu en g/l | |
|----------------------|---|-----------------|
| | t = + 0 heure | t = + 48 heures |
| Protéines solubles | 10,9 | 9,1 |
| Lactose | 32,7 | 31 |
| Acide urique | 6 | 5,8 |

SP₂ dégrade pourtant l'acide urique et croit sur le lactose comme un essai de croissance sur le lactosérum seul (40 g/l) nous l'a montré.

E) CONCLUSION - DISCUSSION

Nous avons pu constater que la source de carbone dans les fientes est insuffisante : peu de protéines consommables, cellulose inerte ; il faut donc ajouter d'autres sources comme l'acide lactique ou le lactosérum acide.

Par ailleurs, il faut se débarrasser de l'acide urique ; l'idéal serait de le transformer en protéines. Comme nous avons vu qu'il y a souvent des formations de cristaux, influence du cathion Ca^{++} agissant sur l'acide urique, il faut se défaire de l'acide urique par l'action de notre souche de *Pseudomonas* (SP_1). Les protéines nouvelles obtenues ainsi, et les anciennes même déjà modifiées, sont transformées par l'action de notre souche de moisissure SP_2 . Les protéines de moisissure sont par essence plus riches que celles obtenues de bactéries.

Nous envisageons de faire des essais dans des conditions aseptiques ou non, agités ou non. Il faut se méfier de la déficience en azote, qui facilite une souche par rapport à l'autre (20) dans une culture mixte, improbable dans notre cas : il y a beaucoup d'azote dans les fientes mais méfions-nous cependant dans les conditions non aseptiques.

Dans les premières heures de culture, la synthèse des polysaccharides est beaucoup plus importante que la synthèse protéique (27, 52) donc il faut attendre suffisamment longtemps mais pas trop car les protéines libérées dans le milieu extracellulaire du fait de la lyse de certaines cellules peuvent provoquer l'autofloculation (44, 45, 59) avant d'ajouter SP_2 .

MODIFICATION DES FIENTES
PAR CULTURE DE MICROORGANISMES
ET ESSAIS SUR ANIMAUX

I - MODIFICATION DES FIENTES PAR CULTURE DE MICROORGANISMES

Nous avons effectué des essais de plusieurs types sans puis avec apport de sources carbonées extérieures sous la forme de lactosérum. Ces essais se font en flacons avec des milieux stériles ou non, agités ou non ; puis un essai a été fait en masse dans une cuve de fermenteur.

A - Cultures sur fientes sans addition de lactosérum

Dans cet essai de culture sur les fientes, nous avons commencé par diluer dix fois par de l'eau distillée, afin d'agiter plus facilement.

L'essai a été effectué sur deux lots différents de fientes.

Le lot n° 1 contenait 1,25 grammes d'acide urique et le lot n° 2: 0,75 grammes d'acide urique ; ces quantités sont données pour 100 grammes de matières humides.

100 millilitres de fientes diluées au pH ajusté à 7 dans des flacons de 500 millilitres ont été ensuite stérilisés à 105° C pendant 30 minutes avant d'êtreensemencés par 0,1 millilitre d'une préculture de SP₁ (le milieu de la préculture est le milieu simple contenant 6 g d'acide urique comme source de carbone).

L'expérience a consisté en une numération de SP₁ et à différents dosages sur les poternes solubles, l'acide urique et l'acide glyoxylique pour permettre de suivre leur évolution au cours de la culture (figure 15).

Au fur et à mesure de la croissance, nous avons constaté que le milieu devenait plus fluide, plus homogène.

De $2,4 \cdot 10^6$ cellules par millilitre de culture au départ, nous passons à $3,2 \cdot 10^9$ cellules par millilitre au bout de 14 heures pour aboutir à $6,8 \cdot 10^{11}$ au bout de 66 heures.

Pour l'obtention des courbes de la figure 15, les dosages ont été effectués sur le lot n° 2.

L'acide glyoxylique ne reste pas longtemps en solution dans le milieu exception faite de la faible quantité autour des 50 heures.

L'acide urique est hydrolysé totalement, plus tardivement (54 heures) que lors de nos expériences sur le milieu simple (27 heures : figure 10) ceci est sans doute dû au choix plus vaste en sources de carbone, notamment les protéines, présentes dans les fientes.

A noter, l'apparition de protéines solubles au bout de 52 heures ce qui correspond à la fin de dégradation de l'acide urique.

Nous avons une bonne croissance de SP_1 ($\times 1000$ après 14 heures) sur les fientes mais nous pouvons voir que le problème de l'acide urique s'il est important, est aussi relatif avec l'énorme variation de sa concentration d'un lot à l'autre : 1,25 grammes et 0,75 grammes pour nos deux lots et de 0,3 gramme à 6 grammes pour les résultats fournis par l'U.C.A.A.B. (Juin 1974) (résultats toujours donnés pour 100 grammes de matières humides).

B - Cultures sur fientes avec addition de lactosérum

Nous avons dilué dans des proportions plus faibles (100 grammes de fientes humides dans 5 volumes) le lot de fientes n° 2 contenant 0,75 gramme d'acide urique par du lactosérum (40 grammes de lactosérum déshydraté par litre d'eau distillée).

Après avoir ajusté le pH à 7,1, réparti dans dix flacons de 500 millilitres à raison de 100 millilitres de milieu dans chaque et stérilisé à 105° C pendant 30 minutes, nous avonsensemencé 5 flacons par 0,1 millilitre d'une préculture de SP_1 et les 5 autres flacons par 0,1 millilitre d'une préculture de SP_2 ; les précultures sont faites sur milieu simple contenant 6 grammes d'acide urique par litre.

1) SP_1

L'hydrolyse totale de l'acide urique est réalisée après 50 heures. Le lactose qui est le seul hydrate de carbone simple présent dans la culture, n'est pas dégradé après 6 jours :

nous avons vérifié que sa concentration était constante durant toute l'expérience (32,7 g/l) en effectuant des dosages sur le milieu débarrassé des constituants insolubles par centrifugation.

Le tableau suivant rapporte les nombres de cellules de Pseudomonas (SP₁) par ml de milieu, calculés après 0, 16, 50 et 144 heures de culture pour les cinq flacons ensemencés.

Nous avons calculé les moyennes correspondant à chaque intervalle de temps et établi les intervalles de confiance au risque de 5 % d'après les valeurs des écart-types.

Dans nos tests statistiques, l'intervalle de confiance est $\frac{ts}{n}$ (petits échantillons) avec n nombre de mesures réalisées pour chaque période, t coefficient de STUDENT pour (n - 1) degrés de liberté, s : écart-type

$$s = \frac{x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}{n - 1}$$

x = nombre de cellules/ml

Il est à noter que pour le temps t = 0 des variations assez importantes du nombre de cellules/ml sont observées : ceci est dû à la présence de gros grumeaux dans le milieu de culture, qui gênent considérablement les prises d'essai.

Par contre, les résultats deviennent beaucoup plus homogènes au cours de l'expérience comme le prouvent les intervalles de confiance calculés : les prises d'essai se réalisent alors plus facilement du fait de la disparition des grumeaux.

| Temps en heures | t = 0 | t = 16 | t = 50 | t = 144 |
|---|--|--|--|--|
| Flacons | | | | |
| N° 1 | 2,25.10 ⁵ 2,15.10 ⁵ 2,01.10 ⁵ | 2,95.10 ⁹ 2,72.10 ⁹ 2,75.10 ⁹ | 5,2.10 ¹² 5,0.10 ¹² 5,0.10 ¹² | 8,7.10 ¹¹ 8,6.10 ¹¹ 8,6.10 ¹¹ |
| N° 2 | 0,86.10 ⁵ 0,72.10 ⁵ 0,77.10 ⁵ | 3,48.10 ⁹ 3,39.10 ⁹ 3,41.10 ⁹ | 5,2.10 ¹² 5,0.10 ¹² 5,0.10 ¹² | 8,5.10 ¹¹ 8,5.10 ¹¹ 8,7.10 ¹¹ |
| N° 3 | 4,8 .10 ⁵ 3,22.10 ⁵ 6,2 .10 ⁵ | 3,52.10 ⁹ 3,59.10 ⁹ 3,60.10 ⁹ | 4,7.10 ¹² 4,8.10 ¹² 5,0.10 ¹² | 8,4.10 ¹¹ 8,3.10 ¹¹ 8,8.10 ¹¹ |
| N° 4 | 0,62.10 ⁵ 0,03.10 ⁵ 0,01.10 ⁵ | 3,8 .10 ⁹ 2,9 .10 ⁹ - | 5,5.10 ¹² 5,1.10 ¹² - | 8,6.10 ¹¹ 8,3.10 ¹¹ - |
| N° 5 | 2,61.10 ⁵ 2,42.10 ⁵ 2,79.10 ⁵ | 2,85.10 ⁹ 2,88.10 ⁹ 2,95.10 ⁹ | 4,7.10 ¹² 4,9.10 ¹² 4,9.10 ¹² | 8,7.10 ¹¹ 8,7.10 ¹¹ 8,9.10 ¹¹ |
| Moyenne | 2,10.10 ⁵ | 3,20.10 ⁹ | 5,00.10 ¹² | 8,59.10 ¹¹ |
| Intervalle de confiance (à P=0,05) | 0,96.10 ⁵ | 0,22.10 ⁹ | 0,12.10 ¹² | 0,10.10 ¹¹ |

2) SP₂

Les flacons ensemencés par SP₂ ont des cultures d'aspect compact après 10 jours. L'acide urique est très peu touché (0,75 g/l au départ et 0,71 après 10 jours) ; le lactose est légèrement dégradé (32,7 g/l dans le surnageant à 26,1 g/l après 10 jours). Au microscope optique, on observe la présence de paillettes.

SP₂ croît sur les fientes très facilement en surface et sans que l'on ait dilué les fientes : couche vert grisâtre de moisissure. Elle ne croît guère à l'intérieur d'où la nécessité de la culture liquide qui présente cependant une croissance très freinée par la présence de l'acide urique sous la forme certainement d'un sel.

C - Cultures successives

Sur les fientes (lot n° 2) diluées 5 fois par du lactosérum semblable aux expériences précédentes, contenues à raison de 100 ml par flacon de 500 ml, on ensemence SP₁ d'abord, puis après un certain délai, on réensemence par SP₂.

Le milieu est stérilisé au départ à 105° C pendant 30 minutes.

Nous ensemençons deux flacons ; l'un est placé en agitation à 30° C. L'autre est placé toujours à 30° C, mais sans aucune agitation.

Les délais d'ensemencement de SP₂ correspondent à la dégradation de l'acide urique par SP₁ : environ 50 heures d'après les essais précédents en agitation et 3 jours sans agitation (il reste cependant pour cet essai encore de l'acide urique 0,30 g/l soit un peu moins que la moitié).

1) Cultures agitées

L'aspect de la culture varie fortement durant la croissance d'abord de SP₁, et ensuite en fonction de la souche ensemencée.

D'aspect non homogène, grumeleuse au départ, la culture devient très liquide autour de 50 heures, pour être très épaisse, très visqueuse, très peu maniable 2 jours après l'ensemencement de SP₂.

Nous avons fait sur la culture, le bilan des protéines et des sucres au début et en fin de culture. Les résultats sont résumés dans le tableau suivant (en g/l de milieu) :

| Durée | pH | Poids sec (g/ l) | Protéines (g/l) | Sucres (g/l) |
|-----------|-----|--|--|--|
| 0 | 7,1 | 86,75 } 92,62 } 80,20 } 86,52 | 35,93 } 37,08 } 29,34 } 34,12 | 23,51 } 23,22 } 24,44 } 23,72 |
| 50 heures | 8,5 | - | - | - |
| 6 jours | 8,1 | 169,39 } 222,52 } 344,35 } 245,42 | 277,51 } 188,22 } 232,86 | 124,86 } 123,36 } 124,11 |

L'ensemble des dosages est effectué sur le culot du milieu obtenu après centrifugation.

Le dosage des protéines est fait d'après la méthode de KJELDAHL.

La méthode de dosage à l'orcinoïl est utilisée pour les sucres.

On constate la difficulté d'avoir une bonne reproductibilité de résultats tant la prise d'échantillon s'avère difficile.

En résumé, après 6 jours, le poids sec est multiplié par 2,84, les protéines par 6,82 et les sucres par 5,23.

2) Cultures non agitées

L'aspect de la culture varie très peu. Le bilan résumé dans le tableau suivant montre une faible évolution.

| Durée | pH | Poids sec (g/l) | Protéines (g/l) | Sucres (g/l) |
|---------|-----|-----------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 0 | 7,1 | 83,62 } 80,22 } 81,92 | 33,22 } 28,12 } 30,67 | 22,22 } 20,44 } 21,33 |
| 3 jours | 7,6 | - | - | - |
| 8 jours | 7,5 | 120,52 } 131,44 } 125,98 | 50,10 } 54,16 } 52,13 | 38,11 } 42,12 } 40,16 |

Le poids sec est multiplié par 1,54, les protéines par 1,70 et les sucres par 1,88.

La différence entre les deux méthodes, est nettement en faveur de l'agitation, que ce soit dans la multiplication des protéines notamment, ou dans le gain de temps.

3) Cultures sur milieux non stérilisés

Le fait de stériliser présente un gros inconvénient aussi avons-nous effectué quelques essais sans aucune stérilisation ou avec stérilisation partielle.

Nous avons pris une série de 8 flacons de 500 ml contenant chacun 100 ml de milieu semblable à celui utilisé dans l'expérience avec agitation. Seul, le lactosérum de 4 flacons a été stérilisé séparément à 105° C pendant 30 minutes. Nous avons ensuiteensemencé par SP₁, 4 flacons : deux avec du lactosérum, stérilisé préalablement.

Après avoir placé en agitation les huit flacons, on ensemence par SP₂ les 4 flacons ensemencés par SP₁ après 50 heures.

Nous avons fait le bilan biochimique résumé dans le tableau suivant. au bout de 6 jours. Le tableau indique la valeur des coefficients de multiplication observés sur le poids sec et différents composés (protéines et sucres).

Les quatre flaconsensemencés avec SP_1 ont eu l'acide urique hydrolysé au bout de 50 heures. Seul, un des flacons nonensemencés présente une légère dégradation de l'acide urique (0,64 g/l final pour 0,79 g/l au départ).

| | | Poids sec | Protéines | Sucres |
|---------------------------------------|-----|-----------|-----------|--------|
| Flacons nonensemencés | | | | |
| . Milieux avec lactosérum non stérile | { 1 | 1,27 | 1,53 | 1,77 |
| | { 2 | 1,23 | 1,50 | 1,70 |
| . Milieux avec lactosérum stérile | { 1 | 1,25 | 1,43 | 1,42 |
| | { 2 | 1,16 | 1,25 | 1,61 |
| Flaconsensemencés | | | | |
| . Milieux avec lactosérum non stérile | { 1 | 3,19 | 5,73 | 4,07 |
| | { 2 | 2,97 | 5,52 | 3,98 |
| . Milieux avec lactosérum stérile | { 1 | 2,87 | 5,34 | 3,87 |
| | { 2 | 2,89 | 4,40 | 3,22 |

Le fait de stériliser le lactosérum au départ n'apporte guère de modification ; notons cependant une multiplication légèrement plus forte dans les cas de non stérilité.

Le lactose est très peu dégradé, dans les milieux nonensemencés (la dégradation est d'environ 5 % dans chaque cas).

On peut donc conclure à l'inutilité de la stérilisation pour l'obtention d'une bonne multiplication des protéines mais le problème de la toxicité de ces protéines du à leur origine se pose.

4) Culture en masse

Nous avons voulu faire un essai, en grande quantité et qui peut se faire très facilement sans moyens excessifs.

La fermentation se fait sur 2 kg de fientes dilué au 1/5 dans du lactosérum donc un volume final de 10 litres dans une cuve de fermenteur de 20 l avec un apport d'air sous forme de bullage qui permet un brassage de tout le milieu (6) (22) et qui remplace l'agitation. Nous n'avons pas fait de stérilisation préalable. La cuve de fermenteur a été close avec un filtre pour la sortie de l'air pour empêcher une contamination de l'atmosphère ambiante.

Le lactosérum contient 300 grammes de lactosérum déshydratée pour 8 litres d'eau distillée, soit 37,5 g/l.

Après 4 heures de bullage, on ensemence par SP_1 et après 7 jours, nous avonsensemencé par SP_2 . La fermentation a été arrêtée au bout de 21 jours.

Comme la fermentation n'a pas été régulée pour la température, il faut noter une forte variation de 12° C minimum à 20° maximum et une température relativement basse dans l'ensemble.

Les résultats sont les suivants, faits au début et en fin de fermentation.

| | Début | Fin |
|---|--------------------------|---------------------|
| - pH | 6,9 | 7,6 |
| - Volume de culture | 10 litres | 7 litres |
| - Poids sec total des matières insolubles | 1,900 kg soit 190 g/l | 1,730 kg 247 g/l |
| - Protéines totales (KJELDAHL) | 76,95 g/l | 95,55 g/l |
| - Sucres totaux | 75,45 g/l | 97,65 g/l |

Nous avons constaté une augmentation du nombre de cellules bactériennes ; à $t = 0$, nous avons 10^5 cellules/ml pour avoir 10^{11} cellules/ml au bout de 43 heures et après 12 jours, il y a apparition de mycelium que nous avons observé au microscope optique.

L'acide urique, dont le taux était très faible au départ : 0,6 g pour 100 grammes de fientes humides avait été totalement hydrolysé au bout de 43 heures.

Les résultats sont à rapprocher de ceux obtenus dans les essais sur milieux non stériles et non agités : le poids sec est multiplié par 1,3, les protéines par 1,23 et les sucres totaux par 1,29. Ils sont cependant inférieurs; cela est du à priori à la non régulation de la température, car nos essais précédents ont toujours été accomplis à 30° C.

II - ESSAIS SUR ANIMAUX

Le nouveau produit obtenu a été testé sur des souris. Nous avons effectué différents essais en incorporant à leur nourriture habituelle des proportions variables de fientes modifiées pour en apprécier la toxicité éventuelle.

A - Procédé utilisé :

Nous avons essayé de confectionner un granulé avec notre produit ou avec des fientes, se rapprochant de celui de la nourriture normale de la souris. La nourriture sous forme de granulés permet à la souris de grignoter convenablement.

1) Composition de la nourriture habituelle de la souris

La nourriture de la souris se présente sous forme de granulés ; ceux que nous avons utilisé, avaient la composition suivante :

- . Maïs, blé, issues de céréales
- . Tourteaux de soja
- . Farine de poisson
- . Levures, graisses animales
- . Mélasse, lactosérum
- . Farine de luzerne
- . Composé minéral

Soit en composés biochimiques de base

- | | | |
|-----------------------------------|-----|---|
| . Matières protéiques brutes..... | 21 | % |
| . Matières grasses..... | 3,5 | % |
| . Matières cellulosiques..... | 5 | % |

| | | |
|--|----|---|
| . Matières minérales..... | 8 | % |
| . Humidité..... | 14 | % |
| . Vitamines "A" u.i 1 000 000 pour cent Kg | | |
| . Vitamines "D" u.i 300 000 pour cent Kg | | |

2) Confection des granulés

Après avoir émietté les granulés, nourriture habituelle des souris, nous avons ajouté à la poussière obtenue, une proportion variable soit de notre produit, soit de fiente. Le mélange est alors homogénéisé. Nous ajoutons un peu d'eau et nous formons des petites boules rappelant les granulés du départ. Nous séchons dans une étuve à 30° C pendant 24 heures. Les nouveaux granulés ne s'émiettent pas grâce à la gomme arabique contenue dans la nourriture habituelle de la souris qui maintient tous les éléments ensemble.

B - Etude de la toxicité du produit élaboré sur souris :

Les essais ont consisté à faire ingurgiter, mélangées à la nourriture habituelle, les fientes non traitées pour un lot de témoin et des fientes fermentées par des animaux d'expérimentation. Les essais se font dans des cages, à métabolisme pour rat, spécialement aménagées. Le poids de chaque souris est d'environ trente grammes .

Nous résumons dans le tableau suivant différents symptômes :

| | Lot avec nourriture normale | Lot témoin avec fientes (10 %) | Lot, nourriture avec produit incorporé | | | |
|------------------------|-----------------------------|--------------------------------|--|---|--------------|--|
| | | | 1 % | 10 % | 10 % stérile | 80 % |
| Durée de l'essai | 1 mois | 1 mois | 18 jours | 5 jours | 10 jours | 5 jours |
| Symptômes visibles | comportement normale | comportement normale | tremblements perte de poils | tremblements perte de poils inerte très assoiffées | | 3 souris mortes 1 inerte 1 normale |
| Symptômes non visibles | - | formule sanguine inversée | pas de septicémie | | | - |

Le taux d'incorporation des produits est indiqué par les pourcentages ; chaque souris recevait 30 grammes de granulés tous les 2 jours.

La nourriture a toujours été entièrement consommée sauf pour le lot à 80 % où les souris ont fait pas mal de rejets.

Nous avons prolongé les essais jusque l'apparition de symptômes visibles sauf pour les lots témoins où la durée de 1 mois nous a semblé raisonnable.

Plusieurs remarques sont à ajouter à notre tableau :

. Dans le lot témoin nourri avec une proportion de fiente l'une des souris a mis bas au bout de trois semaines, 12 souriceaux parfaitement vivants sans comportement anormal. Il n'y a pas de perte de poids pour l'ensemble des souris du lot par rapport aux témoins.

. La souris normale dans le lot nourri avec notre produit incorporé à 80 % survit en dévorant les cadavres de celles

qui sont mortes.

. Le produit ajouté n'avait pas été stérilisé, on pouvait penser qu'il s'agissait d'une toxique infection ; nous avons alors effectué un essai avec notre produit stérilisé à 105° C pendant 30 minutes dans un autoclave. Ce nouveau paramètre a simplement retardé l'apparition des symptômes visibles de 5 jours.

. La dissection de souris, des lots à 1 %, 10 % et 10 % stérile de notre produit incorporé à la nourriture n'indique pas de septicémie.

. L'analyse d'un frottis sanguin sur une souris du lot témoin nourrit avec des granulés à 10 % de fientes, révèle une inversion de formule.

. Si nous rendons une nourriture normale aux souris malades des lots 1 %, 10 %, nous constatons une récupération rapide de leur vitalité. Les souris sont de nouveau bien vivantes ; s'il y a donc une toxicité du produit, celle-ci n'est pas irréversible.

C - Essais d'interprétation :

1) La toxicité non visible chez témoins dont la nourriture contient de la fiente, pose un problème au niveau de la formule sanguine qui est inversée.

| | Souris nourries avec fientes | Souris témoins |
|-----------------------------|---------------------------------|----------------|
| Polynucléaires neutrophiles | 33 % | 33 % |
| Polynucléaire éosinophiles | 0 % | 6 % |
| Polynucléaires basophiles | 0 % | 0 % |
| Grands lymphocytes | 9 % | 8 % |
| Petits lymphocytes | 58 % | 42 % |
| Monocytes | 0 % | 11 % |

Le nombre de leucocytes apprécié au faible grossissement est identique.

En ce qui concerne l'étude hématologique, une appréciation sur frottis des globules blancs et une formule leucocytaire ont été réalisées.

Les résultats obtenus pour les souris témoins et les souris nourries avec les fientes non traitées sont pratiquement identiques. La formule est inversée par rapport à celle de l'homme adulte mais un enfant a aussi une formule inversée. Pour conclure, il faudrait connaître l'âge des souris.

2) Les mycotoxines :

Comme nous avons utilisé parmi les souches une moisissure, nous avons pensé que la toxicité serait due à des mycotoxines.

La méthode utilisée pour cette recherche est décrite dans les matériels et méthodes. Les toxines éventuelles que nous avons essayé de détecter ont été l'acide pénicillique puisque nous

sommes en présence d'un Penicillium commune (SP₂), et l'Aflatoxine B₁ toxique parfois présente également chez les penicillium.

Les résultats ont été négatifs. Nous n'avons pas trouvé de concentration suffisante pour provoquer de toxicité aiguë au seuil des techniques utilisées. La toxicité chronique n'a pu être étudiée nécessitant une expérimentation sur des générations successives d'animaux. Nous avons par ailleurs trouvé trace d'un Penicillium candidum sur notre produit.

D - Conclusion

Il y a certains facteurs toxiques présents dans les fientes qui sont accentués avec la fermentation. Il se pose toujours le problème de la provenance des fientes et de leur fraîcheur.

CONCLUSION GENERALE

Notre travail consistait à transformer les protéines des fientes en protéines utilisables dans l'alimentation animale sous forme de biomasse.

Les souches capables de fournir cette biomasse ou de modifier les fientes, après les avoir recherchées sur un milieu synthétique de composition proche de celle des fientes, nous les avons sélectionnées essentiellement sur des milieux simples à l'acide urique après nous être heurté à des problèmes complexes comme celui des cristaux.

Les deux souches retenues : une souche bactérienne Pseudomonas (SP₁) et une moisissure Penicillium commune (SP₂) l'ont été au départ uniquement en fonction de l'acide urique. Et de ce fait bien que nos essais de croissance sur les fientes soient positifs, ces souches ne sont peut être pas idéales pour le but que nous nous étions assigné. La destruction de l'acide urique a été le but initial ce qui éliminait toute une gamme de souches plus intéressantes en fonction de la qualité de leurs protéines comme les levures. Les essais effectués sur des souches de collection ont été négatifs.

Nous avons par ailleurs essayé d'enrichir les fientes par l'apport de nouvelles sources de carbone : l'acide lactique ou le lactosérum. Ce dernier produit a eu notre préférence pour sa facilité d'obtention.

Les essais de fermentation des fientes par deux inoculum successifs des deux souches SP₁ et SP₂ ont été encourageants expérimentalement sur des petites quantités en flacons d'Erlenmeyer et également en culture en masse, en cuve de fermenteur quoique à un degré moindre : il y a eu une multiplication plus faible pour les protéines par exemple.

Il existe une certaine toxicité comme le prouve nos expériences sur l'animal de laboratoire qu'est la souris, de notre produit final. Cette toxicité plutôt que de nos souches, les recherches de toxines négatifs et l'apparition de troubles chez l'animal même après stérilisation de notre produit semblant le prouver, proviendrait de la qualité des fientes utilisées. Il est probable que nous ayons une accentuation de certains facteurs présents dans les fientes au cours de la fermentation.

Dans l'avenir, une étude systématique de tous les facteurs de variation des fientes et une approche plus poussée des micro-éléments et des microorganismes parasitants doivent être envisagées.

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

- 1) ADAMSE A.O.
Bacteriological studies on dairy waste activated sludge.
Thesis H. Veenman en Zonen N. V, Wageningen (1966).
- 2) ARDEN E., LOCKETT W.T.
Experiments on oxydation of sewage without the aid of filters.
J. soc. chem. ind. London (1914) 33 1122
- 3) BALLAY D., CATROUX G.
Possibilités de limitation des nuisances et des pollutions dues
aux élevages porcins.
Ann. Agron. (1974) 25 351-381
- 4) BARMAN TH.E.
Enzyme Handbook (1969) 2 648
Springer Verley Berlin, Heidelberg, New-York.
- 5) BIGUET J., ANDRIEU S. et COCHET G.
Les moisissures communes des produits alimentaires.
Cours CERBA . Insitut Pasteur de LILLE(1976) 1-9
- 6) BROUZES P.
Précis d'épuration biologique (1973)
Ed. Technique et Documentation . Paris.
- 7) BURNETT W.E. and DOUDERS N.C.
"Microbiological and chemical changes in poultry manure
associated with decomposition and odor generation"
Animal waste management (1969) 271-291
- 8) BUTTIAUX R., BEERENS H., TACQUET A.
Manuel de techniques bactériologiques (1969) 65, 346
Flammarion.
- 9) CANUTI A.
"Valeur alimentaire des résidus de l'élevage des poulets et
des porcs"
Symposium sur les eaux résiduaires des industries agricole

et alimentaire. Budapest (Hongrie) (10-13 mars 1970) 455-461.

10) CANUTI A.

Technica Molitoria anno XX (15 septembre 1969) 21 23

11) CANUTI A.

"Alanni asjetti del problema della acque superficiali in provincia di Cremona"

Recensito in Acque industriale Inquinamento (FAST) anno XI (novembre 1969) 8 18

12) CARAWAY W.T.

Ann. J. Clin. Path. (1955) 25 840

13) CARAWAY W.T. and MANABLE H.

Clin. chemistry (1966) 12, 18

14) CARAWAY W.T.

Standard methods of chimical chemistry (1963) 4 239

15) CASAYS L., SURUN J.

Les eaux usées des industries agricoles et alimentaires. Techniques et Sciences Municipales (1967) octobre 10

16) C.E.E.

Conséquences écologiques de l'application des techniques modernes de production en agriculture. Commission des communautés Européennes. Dir. gén. Agriculture (1974) n° 137

17) CHARPENTIER Melle

Principaux microorganismes cellulolytiques. Annales indust. Past (1968) 181 530

18) C.I.I.A.

12ème symposium sur les eaux résiduaires d'industries agricoles et alimentaires. Budapest mars 1970. (1971) Ed D.W Junk N.V La Haye.

- 19) COPPENET M.
L'épandage de lisier de porcherie. Ses conséquences agronomiques.
Ann. Agronom. (1974) 25, 403,423
- 20) DIAS F.F., DONDERO N.C., FINSTIEN M.S.
"Attached growth of Sphaerotilus natans and mixed populations
in a continuous flow apparatus".
Appl. Microbiology (1968) 16-1191
- 21) DUMON R.
Recueil de medecine alimentaire
Mars 1973 149 n°3, 337
- 22) ECKENFELDER W.W.
L'eau dans l'industrie (1973)
Entreprise moderne d'Editions. Paris.
- 23) FAIRBAIN
Valeur énergétique des fientes déshydratées.
Déshydratation des fientes de poules (mai 1973) 9
- 24) FASMAN G.D. and NIEMANN C.
"A reinvestigation of the kinetics of the urease catalysed
hydrolysis of urea.
I. The activity of urease in the presence of sodium and
potassium phosphate"
J. Ann. Chem. Soc(1951) 73 1646.
- 25) FERRANDO A.
Laboratoire coopératif n° 96 (mai, juin 1974)
- 26) FRIEDEMANN T.E., HANGEN G.E.
J. Biol. Chem (1943) 147,415.
- 27) GAUDY A.F, ENGELBRECHT R.S.
Quantitative and qualitative shock loading of activated sludge
systems.
Journal of water pollution control federation (1961) 33, 800

- 28) GIRAUDO A.
L'art de recycler les protéines
Le Monde (15-16 janvier 1978)
- 29) GREENBERG D.M.
Metabolic pathways (1969) III 113, 194
- 30) HENRY R.J., SOBEL C. et KING J.
Ann. Clin. Path. (1957) 28, 142.
- 31) HODGETTS
Les acides aminés des protéines de fientes.
Déshydratation des fientes de poules mai 1973 (1971) 7
- 31 bis) JOURNAL of the Association of Official Analytical Chemist.
J.A.O.A.C. (1968) 51, 2, 485-488.
- 32) JUSTE C.
Les oligoéléments dans les boues provenant des stations
d'épuration des eaux usées urbaines.
Acad. Agr. France (1974) 975-982
- 33) KATZ et COWANS
Direct potentiometric study of the urea-urease system.
Biochim. Biophys. Acta (1965) 107, 605
- 34) LECLERCQ H.
Pollutions marines et pollutions des eaux usées douces.
Rev. Intern. Océanogra. Med. (1971), 24, 155-170.
- 35) LECOQ R.
L'acide lactique dans les vins
Manuel d'Analyses Alimentaires et d'Expertises Usuelles.
(1965) 1 56-57 Ed. Doin, Deren et Cie.
- 36) LECOQ R.
Fumiers et Tourteaux. Engrais.
Manuel d'Analyses Alimentaires et d'Expertises Usuelles.
(1965) 2 1035

37) LOWMAN B.G., KNIGHT D.W.

A note on the apparent digestibility of energy and protein in dried poultry excreta.

Animal Production (Août 1970) 12, 526

38) LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. and RANDALL R.J.

Protein measurement with Folin phenol reagent.

J. Biol. Chem. (1951) 193, 265-275

39) MARTINOT R.

Problèmes posés par l'implantation des bâtiments d'élevage.

Protection contre les nuisances et pollutions, et intégration du paysage.

Rapp. C.T.G.R.E.F. Bur. Et. Bât. Ruraux (1976)

40) MARTINOT R.

Lisiers : caractéristiques, stockages, évacuation.

Minist. Agric. Bur. Et. Bât. Ruraux (1976)

41) METHODS in Enzymology

Dosage de l'acide glyoxylique.

(1957) 3 273-276

42) METHODS in Enzymology

Catabolisme des bases puriques.

(1957) 4 636

43) MONTREUIL J. et SPIK G.

Microdosage des glucides.

Monographie n° 1. Fac. Sciences, Lille (1963) 21-31

43 bis) MURASHIGE J. and SKOOG F.

A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture.

Physiol. Plant. (1962) 15 473-497

44) NISHIKAWA S., KURIYAMA M.

Studies on mucilage in activated sludge.

Journal of Fermentation Technology (1968) 46 5, 381

- 45) NISHIKAWA S., KURIYAMA M.
Nucleic acid as a component of mucilage in activated sludge.
Water Research (1968) 2 811
- 46) OKEY R.W., RICKLES P.E.
The conceptual design of an economically feasible animal waste disposal scheme.
In relation ship of agriculture to soil on water Pollution.
Cornell. Univ. Conf. on Agricultural Waste Management (1970) 85-97
- 47) PARAY T.J. et PAWSEY R.K.
Principles of Microbiology for students of food technology (1972)
- 48) PERRIN C.
Les eaux usées des Malteries et Brasseries
Symposium sur les eaux résiduaires des industries agricoles et alimentaires. Budapest, Hongrie. (10-13 mars 1970) 507-514
- 49) PICARD J.
Coût de la lutte contre la pollution pour les collectivités et pour les entreprises
A.S.T.E. Bordeaux (1973)
- 50) PIPES W.O.
Bulking of activated sludge.
Advances in applied Microbiology (1967) 9, 185
- 51) PODGORSKA J.
Epurations des eaux usées provenant des établissements des services publics en Pologne, travaillant par système HARTMAN.
Symposium sur les eaux résiduaires des industries agricoles et alimentaires. Budapest, Hongrie (10-13 mars 1970) 520
- 52) RAO B.S., GAUDY A.F.
Effect of sludge concentration on various aspects of biological activity in activated sludge.
Journal of water pollution control federation (1966) 38, 794

- VII
- 53) ROSEN G.D. et TONSETH E.J.
Productions of proteins and fats from food and industrial
waste waters.
Symposium sur les eaux résiduaires des industries agricoles
et alimentaires. Budapest, Hongrie (10-13 mars 1970) 241
- 54) SIMON P. et MEUNIER R.
Microbiologie industrielle et génie biochimique
Masson et Cie (1970) 180
- 55) SKERMANN
Le milieu à la cellulose
The genera of Bacteria, 228
- 56) STANIER R.Y., DOUDOROFF M. and ADELBERG E.A.
The microbial world (1963) 445-536
Published by Prentice Hall
- 57) STRAUCH D.
Veterinary hygienic aspects of land spreading and transport
of manure.
Seminar on Landspreading of manures, Modène (1976)
2, 257-270
- 58) STURKIE P.D.
Azote non protéique des fientes
La déshydratation des fientes de poules, mai 1973 (1965) 6
- 59) TENNEY M. W. et VERHOFF F. H.
Chemical and autoflocculation of microorganisms in biological
waste water treatment.
Biotechnology and Bioengineering (1973) 15, 1045
- 60) TUNNEY H.
Fertilizer value of animal manures.
Seminar on Landspreading of manures, Modène (1976)
vol II, 175-188.

61) UNDERWOOD E.J.

Trace elements in human and animal nutrition (1971) 544
3ème Ed. Acad. Press. New York London.

62) VARNER J.E.

The enzymes (1960) 4, 274
Academic Press.

63) VASSEUR J.

Epandre les déjections sans créer de nuisances.
L'élevage (1974) N°HSF 16, 43-45.

64) YUSHOK et BEAR

Condition de conservation des fientes fraîches.
Déshydratation des fientes de poules, mai 1973 (1973) 7

