



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : Microbiologie

قسم ميكروبيولوجيا

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Microbiologie Générale et Biologie Moléculaire des Microorganismes

Intitulé :

Etude de la fermentation in vitro des résidus de tomate et d'orange et de deux plantes fibreuses (carde et chrysanthème), par la flore ruminale bovine, dans différentes sources d'azote

Présenté et soutenu le

06 juillet 2015

Par

SAHLI Batoul

et

LATROUS Narimane

Jury d'évaluation :

Président: M. KADEM D.E.D, Professeur à UFM Constantine

Encadreur: M. HADDI M.L, Professeur à UFM Constantine

Examineur: Mme MIHOUBI I. Professeur à UFM Constantine

Tutrice : AGGOUN A, Doctorante à UFM Constantine

Année universitaire
2014 – 2015

Remerciement

Nos premiers remerciements s'adressent à Dieu le TOUT PUISSANT, qui nous a donné la force et le courage d'élaborer ce mémoire.

*Ensuite, nous remercions et témoignons toute notre reconnaissance au Professeur **M. HADDI M.L**, encadreur de ce mémoire, de nous avoir permis de réaliser ce stage au sein du laboratoire de « **biotechnologie microbienne** », de nous avoir accordé sa confiance, pour le temps qu'il nous a consacré tout au long de cette période, sachant répondre à toutes nos interrogations, sans oublier sa participation au cheminement de ce rapport.*

*Nous remercions **M. KADEM D.E.D**, président du jury et : **Mme MIHOUBI I.** examinatrice, qui nous ont fait l'honneur d'accepter de juger notre travail.*

Nous remercions chaleureusement tous nos enseignants de Master 2. Nous leur sommes reconnaissantes d'avoir su nous faire profiter des connaissances scientifiques relatives à la microbiologie.

*Un merci très spécial à **Melle AGGOUN A.** de nous avoir aidées à la paillasse, pour son soutien technique, sa facilité à transmettre son savoir toujours prête à répondre à nos questions avec justesse.*

*Nous remercions également **Mme LIFA M.** de nous avoir apporté son aide et de nous avoir consacré du temps ainsi que pour ses conseils et sa gentillesse.*

DÉDICACE

Au nom de dieu clément et miséricordieux

*Nous dédions ce modeste travail à nos chers parents : **Abdelali** et **Jeanne, Ali** et **Fatiha** pour leurs soutiens, patiences et leurs sacrifices durant nos études et durant ce projet.*

*A nos frères et sœurs : **Adel, Billel, Dounia, Lynda, Salwa, Mayssa Maya, Katia, Ryma, Magda, et Yasmine.** Qui n'ont cessé d'être pour nous des exemples de persévérance, de courage et de générosité.*

*A nos porches: **Rana, Housseem, Jamel, Raouf, Rym, Jalil** et le **petit Bijad.***

*A nos amis qui n'ont cessé de nous encourager et assisté dans ces moments difficiles : **Chems eddine, Badr eddine, Soheib, Amine, Manal, Ibtissem, Ahlem, Rokaya, Amel, Amina, Ikram, et Rosa.***

Table des matières

Introduction	1
Chapitre I : Recherche bibliographique	
1.- Milieu ruminal	
1.1- Description du milieu ruminal.....	3
1.2.- La flore ruminale.....	4
1.2.1.- Les bactéries.....	4
1.2.2.- Les champignons.....	6
1.2.3.- Les protozoaires	6
1.2.4.- La physiologie du rumen.....	7
2.- Source d'énergie, de carbone et d'azote	
2.1.- Source d'énergie, et de carbone pour les microorganismes du rumen	8
2.1.1.- Dégradation des glucides	8
2.2.- Source d'azote pour les bactéries	9
Chapitre II : Partie expérimentale	
2.- Matériel et méthode	
2.1.- Matériel végétal et sources d'azote.....	11
2.1.1.- Les sources d'énergie.....	11
2.1.2.- Les sources d'azote.....	11
2.2.- Préparation du matériel végétal	13
2.3.- Inoculum.....	13
2.4.- Analyse des caractéristiques de l'inoculum.....	13
2.4.1.- Analyse du pH.....	13
2.4.2.- Analyse des caractéristiques microbiologiques.....	13
2.5.- Préparation de l'inoculum.....	14
2.6.- Préparation des milieux d'incubation.....	14

2.6.1.- Réduction des milieux	16
2.7.- Préparation de la verrerie	16
2.8.- Pesée des substrats et lubrification des seringues.....	16
2.9.- Inoculation et incubation des différents milieux.....	17
2.9.1.- L'inoculation et l'incubation.....	17
2.9.2.- Calibrage des seringues.....	18
2.10.- Suivi des incubations et expression des résultats.....	19

Chapitre III : Résultat et discussion

3. - Résultat et discussion.....	21
3.1.- Analyse de la production de gaz dans les différentes sources d'azote	21
3.1.1.- L'incubation des blancs (sans apport d'énergie).....	21
3.1.2.- Production de gaz des résidus de tomates.....	24
3.1.3.- Production de gaz des résidus d'oranges	25
3.1.4.- Production de gaz des cardes	26
3.1.5.- Production de gaz des chrysanthèmes	27
3.2.- Analyse des caractéristiques de l'inoculum.....	28
3.2.1.- Mesure du pH.....	28
3.2.1.1.- pH de l'inoculum, des milieux ajustés et du mélange LR filtré et des milieux A, B, C, D et E avant fermentation.....	29
3.2.1.2.- pH après 120 h d'incubation des résidus de tomates	29
3.2.1.3.- pH après 120 h d'incubation des blancs	30
3.2.1.4.- pH après 120 h d'incubation des résidus d'oranges	32
3.2.1.5.- pH après 120 h d'incubation des cardes	33

3.2.1.6.- pH après 120 h d'incubation des chrysanthèmes	35
3.2.2.- Caractéristiques microbiologiques.....	36
3.2.2.1.- Liquide ruminal frais, tel quel	36
3.2.2.2.- Liquide ruminal filtré.....	38
3.2.2.3.- Mélange liquide ruminal filtré et milieu d'incubation.....	38
3.2.2.4.- Milieux fermentés après 120 h d'incubation	39
Conclusion.....	41
Références bibliographiques	44
Résumé.....	46

Liste des figures

Figure : 1- Rumen et réseau	4
Figure : 2- Schéma de la digestion des glucides chez les ruminants	8
Figure : 3- Schéma de la digestion des matières azotées chez les ruminants.....	9
Figure : 4- Chrysanthèmes en fleurs (<i>Chrysanthémum coronarium</i>).	11
Figure : 5- Cardes en fleurs (<i>Silybum marianuum</i>).	11
Figure : 6- Les cinq milieux en préparation sous flux de CO ₂	16
Figure : 7- Les cinq milieux inoculés avec le liquide ruminal filtré, sous flux de CO ₂	17
Figure : 8- Seringue contenant le mélange : milieu, substrat, et liquide ruminal filtré.....	18
Figure : 9- production de gaz des blancs dans les différentes sources d'azote.....	22
Figure : 10- production de gaz des résidus de tomates dans les différentes sources d'azote...24	
Figure : 11- production de gaz des résidus d'oranges dans les différentes sources d'azote...25	
Figure : 12- production de gaz des cardes dans les différentes sources d'azote.....	26
Figure : 13- production de gaz des chrysanthèmes dans les différentes sources d'azote.....	27
Figure : 14- pH des résidus de tomates dans les cinq milieux avant et après 120 h fermentation.....	29
Figure : 15- pH des blancs dans les cinq milieux avant et après la 120 h de fermentation	30
Figure : 16- pH des résidus d'oranges dans les cinq milieux avant et après 120 h de fermentation	32
Figure : 17- pH des cardes dans les cinq milieux avant et après 120 h de fermentation	33
Figure : 18- pH des chrysanthèmes dans les cinq milieux avant et après 120 h de fermentation	35
Figure : 19- Observation microscopique des bactéries Gram + et Gram - du liquide ruminal tel quel (photo a, b, c)	37

Figure : 20- Observation microscopique des bactéries Gram + et Gram - du liquide ruminal filtré.....38

Figure : 21- Observation microscopique des bactéries Gram + et Gram - du liquide ruminal filtré et milieu d'incubation (A, B, C, D, E) respectivement (photo a, b, c, d).....39

Figure : 22- Observation microscopique des bactéries Gram + et Gram – des milieux fermentés (oranges, tomates, cardes, chrysanthèmes) respectivement après 120 h de fermentation (photo a, b, c, d).40

Liste des tableaux

Tableau 1.- Composition, concentration, toxicité et prix des sources d'azote utilisées.....	12
Tableau 2.- Fiche de préparation des milieux A, B, C, D, et E (bicarbonate d'ammonium, Na-glutamate, nitrate de potassium, extrait de levure, milieu sans source d'azote ajouté).....	15
Tableau 3.- pH des milieux après ajustement	28
Tableau 4.- pH du mélange LRF et des milieux A, B, C, D et E.....	28
Tableau 5.- pH des milieux A, B, C, D et E avec les résidus de tomates comme substrat avant et après 120 h de fermentation	29
Tableau 6.- pH des milieux A, B, C, D et E avec les blancs avant et après 120 h de fermentation.	30
Tableau 7.- pH des milieux A, B, C, D, et E avec les résidus d'oranges comme substrat avant et après 120 h de fermentation..... ;;;;;;;;;;	32
Tableau 8.- pH des milieux A, B, C, D et E avec les cardes comme substrat avant et après 120 h de fermentation	33
Tableau 9.- pH des milieux A, B, C, D et E avec les chrysanthèmes comme substrat avant et après 120 h De fermentation.....	35

Liste des abréviations

ATP : Adénosine triphosphate

LR : Liquide ruminal

LRTQ : Liquide ruminal tel quel

LRF : Liquide ruminal filtré

MS : Matière sèche

GDH : Glutamate déshydrogénase

AGV : Acide gras volatil

PG : Production de gaz

Introduction

Dans certains pays et en Algérie en particulier, il est nécessaire de chercher à combler l'insuffisance de la disponibilité en fourrages et ceci par l'intégration des sous produits de l'industrie agro-alimentaire dans l'alimentation animale pour une meilleure disponibilité de produits laitiers, de viande, etc... L'objectif de notre travail consiste à analyser les caractéristiques physico-chimiques, les cinétiques d'utilisation, par la flore ruminale bovine in vitro, des résidus agroalimentaires, en comparaison avec des plantes fibreuses, cardes et chrysanthèmes, tels que les résidus d'oranges, de tomates, dans différents milieux contenant différentes sources d'azotes.

En effet, pour obtenir son énergie l'animal a besoin de source d'énergie et de carbone qu'il trouve en dégradant les glucides, les lipides, les acides organiques etc. Ces nutriments, source d'énergie sont disponibles en grande quantité dans la plupart des aliments tels que les foin, les grains et divers fourrages. En plus de la source d'énergie l'animal a besoin d'azote sous différentes : forme protéique, forme acido-aminique et sous des formes non protéique et fait plus intéressant, la flore ruminale peut utiliser des formes inorganiques d'azote pour synthétiser des acides aminés et des protéines. Il est donc intéressant de savoir si la flore ruminale utilise différentes formes d'azote. Dans ce travail, nous avons essayé de voir dans quelle mesure la flore ruminale bovine peut utiliser certaines formes organiques et inorganiques d'azote en présence de différentes sources d'énergie. Des milieux d'incubation contenant différentes sources d'azote ont été mis au point : le milieu A avec du bicarbonate d'ammonium, comme source d'azote inorganique, le milieu B avec du glutamate de sodium comme source d'azote organique et aminique, le milieu C avec du nitrate de potassium, le milieu D avec l'extrait de levure et enfin le milieu E, sans source d'azote, sert de témoin. L'incubation des résidus d'oranges, de tomates, des cardes et des chrysanthèmes dans ces derniers s'est déroulée pendant 120 h avec le liquide ruminal bovin.

*Recherche
bibliographique*

Chapitre I

1. Milieu ruminal

1.1-Description du milieu ruminal

Le rumen procure des conditions physico-chimiques pour la croissance et la reproduction des microorganismes qu'il héberge en leur fournissant une alimentation abondante et une absence d'air (oxygène) en particulier pour celles qui ont la capacité de dégrader les fibres végétales. Ce milieu se caractérise par plusieurs paramètres que nous allons décrire dans les paragraphes qui suivent.

Les paramètres physico-chimiques

- Le pH est en général entre 5.5 et 7,0. La salivation assure un pouvoir tampon par l'apport d'une grande quantité d'ions bicarbonate et phosphate. (Dusart, 2014).
- La température est constante et varie de 39 à 40°C.
- Le potentiel d'oxydoréduction : le rumen constitue un milieu fortement anaérobie avec un potentiel d'oxydoréduction négatif variant de - 250 à - 400 milliVolts.
- La pression osmotique est voisine de celle du sang. Si le milieu sanguin est hyperosmotique il y a passage d'eau du secteur vasculaire au rumen. S'il est hypo-osmotique passage d'eau du rumen au secteur vasculaire.
- La phase gazeuse se compose d'environ 60 à 70 % de CO₂ et de 30 à 40 % de CH₄.
- Les produits du métabolisme sont des acides gras volatils, de l'ammoniac. Ils sont éliminés par absorption à travers la paroi du rumen.

Les résidus alimentaires, les cellules microbiennes passent dans la partie postérieure du tube digestif. Le gaz carbonique et le méthane sont rejetés par éructation (Thivend et al, 1985).

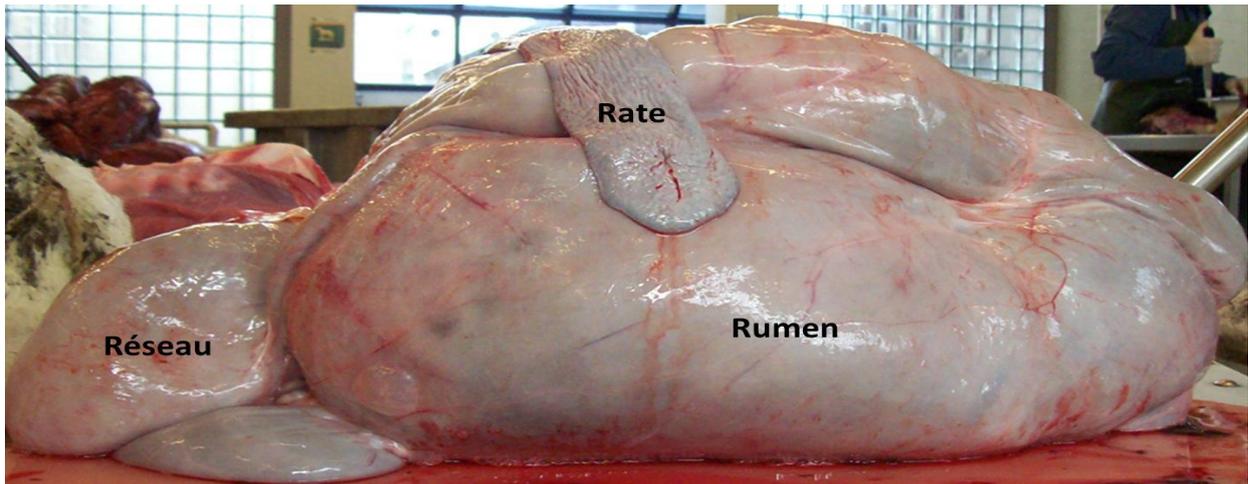


Figure: 1- Rumen et réseau (photo : Dr. A Gabriel, FMV, ULG).

1.2. – La flore ruminale

1.2.1.- Les bactéries

Les bactéries du rumen peuvent atteindre une concentration de 10^{11} cellules vivantes /ml : Elles sont les microorganismes les plus nombreux et sont indispensables pour les ruminants qui ne peuvent subsister sans elles. Plus de 200 espèces ont été isolées. La biomasse microbienne, représente selon Jouany (1978) environ 1 Kg de matière sèche chez la vache. Les bactéries du rumen ont été classées selon leur type de Gram, selon le substrat qu'elles sont capables de dégrader ou d'utiliser pour se développer ou pour produire certains métabolites. Elles sont également caractérisées par le rapport Guanine/Cytosine de leur ADN. Hungate (1966) a proposé de les répartir en bactéries cellulolytiques, amylolytiques, hémicellulolytiques, saccharolytiques, protéolytiques, méthanogènes, lipolytiques, et en bactéries utilisant les produits formés par d'autres microbes (Jouany, 1994).

1.2.1.1.- Les bactéries cellulolytiques

Les bactéries peuplent le rumen trois à quatre jours après la naissance de l'animal avec un nombre qui varie de 10^2 à 10^7 bactéries par ml. Elles présentent différentes formes :

- Des cocci comme *Ruminococcus flavefaciens* et *Ruminococcus albus*. Toutes les souches de *R. flavefaciens* et *R. albus* hydrolysent la cellulose, le cellobiose et le xylane.
- Des bacilles comme *Fibrobacter succinogenes* et *Butyrivibrio fibrosolvens*.

La plupart de ces dernières produisent des enzymes capables d'hydrolyser les hémicelluloses. Il semble que *Butyrivibrio fibrosolvans* est l'élément essentiel de la dégradation des hémicelluloses.

1.2.1.2.- Les bactéries pectinolytiques

Lachnospira multiparus (Gram positif) présente une forme de bacille incurvé. D'autres bactéries pectinolytiques comme *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Streptococcus bovis* et *Succinovibrio dextrinosolvans* sont également hébergées dans le rumen.

1.2.1.3.- Les bactéries amylolytiques

Certaines bactéries cellulolytiques sont également amylolytiques. Les espèces non cellulolytiques – *S. bovis*, *R. amylophylus*, *P. ruminicola*, *S. amylolytica* et *S. ruminantium* – comprennent de nombreuses souches dégradant l'amidon.

1.2.1.4.- Les bactéries utilisatrices de glucides simple

Un grand nombre d'espèces bactériennes ruminale sont capables de dégrader les glucides simples. Lorsque l'animal est alimenté avec des aliments riches en glucides rapidement fermentescibles, le milieu devient très acide et c'est dû à la prolifération des lactobacilles en compagnie de *S. bovis*.

1.2.1.5.- Les bactéries utilisatrices d'acides

On trouve parmi les bactéries utilisatrices d'acides certaines qui sont capables d'utiliser le lactate (bactéries lacticoxytiques) et la plupart le fermentent à un pH optimum compris entre 6 et 6,5.

1.2.1.6.- Les bactéries protéolytiques

L'activité protéolytique de la flore ruminale est faible, elle est faite par presque la moitié des espèces bactériennes ruminales.

1.2.1.7.- Les bactéries lipolytiques

Elles hydrolysent les lipides alimentaires et produisent du glycérol qui est rapidement fermenté en AGV et en acides gras libres. *Anaerovibrio lipolytica* est la bactérie la mieux connue pour son activité lipolytique.

1.2.1.8.- Les bactéries uréolytiques

Selon Wallace et Cotta 1988, deux groupes bactériens se partageaient l'activité uréolytiques, En premier, un grand nombre d'anaérobies stricts avec une activité uréasique faible : *Lactobacillus*, *Peptostreptococcus*, *Propionibacterium*, *Bifidobacterium*, *Succinovibrio*, et en deuxième lieux également un nombre nettement plus faible d'anaérobies facultatifs et beaucoup plus spécifiquement uréolytiques : *Streptococcus*, *Staphylococcus* et *Corynebacterium*.

1.2.1.9.- Les bactéries de grande taille

Leur fonction et leur métabolisme sont mal connus car elles sont peu ou pas étudiées en culture pure. Elles sont détectées microscopiquement dans le contenu ruminal et comprennent *Oscillospira guillermondi*, les ovales d'Etadie et les ovales de Quin.

1.2.2. - Les champignons

Leur concentration est estimée à 10^4 /ml. Les champignons colonisent les tissus végétaux de l'aliment 15-30 min après son ingestion par l'animal.

Ils forment du cellobiose qui sera fermenté a partir de la digestion des glucides de la paroi végétale grâce a des enzymes produites par ces derniers et peuvent aussi solubiliser les formes les plus résistantes de cellulose cristalline (les fibres de coton) et ne peuvent utiliser les pectines (Hillaite et al 1990).

En présence de champignons dans le rumen la lignine disparaît, et c'est probablement le résultat d'une solubilisation et non une dégradation (Orpin, 1983, 1984).

1.2.3. -Les protozoaires

Par rapport aux bactéries les protozoaires sont 10^4 fois moins nombreux et 20 à 100 fois plus grands en taille.

Les plus importants en nombres sont les ciliés, on distingue deux groupes : Les holotriches et les entodiniomorphes.

Les entodiniomorphes sont capables d'ingérer les particules solides des petites tailles (les grains, l'amidon, les chloroplastes, les fibres cellulosiques) et continuellement les bactéries.

Les protozoaires sont en concurrence avec les bactéries car ils participent spécifiquement au métabolisme des glucides, ils s'attaquent ainsi à tout les constituants des parois. (Jouany 1994).

1.2.4. - La physiologie du rumen

Le rumen est la poche la plus volumineuse du système digestif et représente 80 % du volume total de l'estomac chez le bovin. On distingue deux parties dans le rumen (la poche proximale et la poche distale ou caudale). La poche proximale reçoit la nourriture et la poche distale c'est là où s'effectue l'essentiel du malaxage. La poche proximale se dilate et induit des contractions qui poussent le bol alimentaire vers la poche distale où s'effectue des mouvements de va-et-vient. Un brassage important du bol alimentaire permet le passage des microorganismes et des aliments vers l'intestin où est assuré l'essentiel du processus de digestion et d'absorption. Donc le rumen est un organe dynamique, animé de mouvements de contraction qui permettent de mixer le contenu et de le pousser vers l'intestin. Par conséquent les microorganismes et les particules alimentaires subissent une vitesse de passage vers l'intestin pour une dégradation plus complète. La communauté microbienne du rumen fournit à l'animal hôte de l'énergie (sous forme d'AGV) et de l'azote sous forme de protéines microbiennes. En contrepartie, le rumen assure un environnement physico-chimique propice à la croissance de groupes microbiens actifs dans la dégradation des aliments ingérés. (Gilles, *et al.*, 2006).

2.- Source d'énergie, de carbone et d'azote

2.1- Source d'énergie, de carbone et d'azote des microorganismes du rumen

2.1.1 - Dégradation des glucides

La population microbienne du rumen grâce à un extraordinaire équipement enzymatique dégrade les constituants glucidiques (amidon, pectine, hémicellulose, cellulose), des parois végétales en oses qui sont ensuite fermentés en anaérobiose, et tire le carbone et l'énergie (ATP) qui lui sont nécessaires pour sa croissance, sa prolifération, et son entretien.

Cette dégradation est extrêmement variable : de 80 à 90% pour la fraction d'un aliment très peu lignifié (herbe jeune) à 40-50% pour une plante âgée et riche en lignine (paille).

Les produits métaboliques de cette fermentation sont un mélange d'acides organiques à courte chaîne qui sont les acides gras volatils, essentiellement acétique, propionique et butyrique et des gaz (méthane, gaz carbonique).

Les produits intermédiaires (acide lactique, succinique) sont généralement utilisés par les microorganismes au fur et à mesure de leur formation (Thivend *et al.*, 1985).

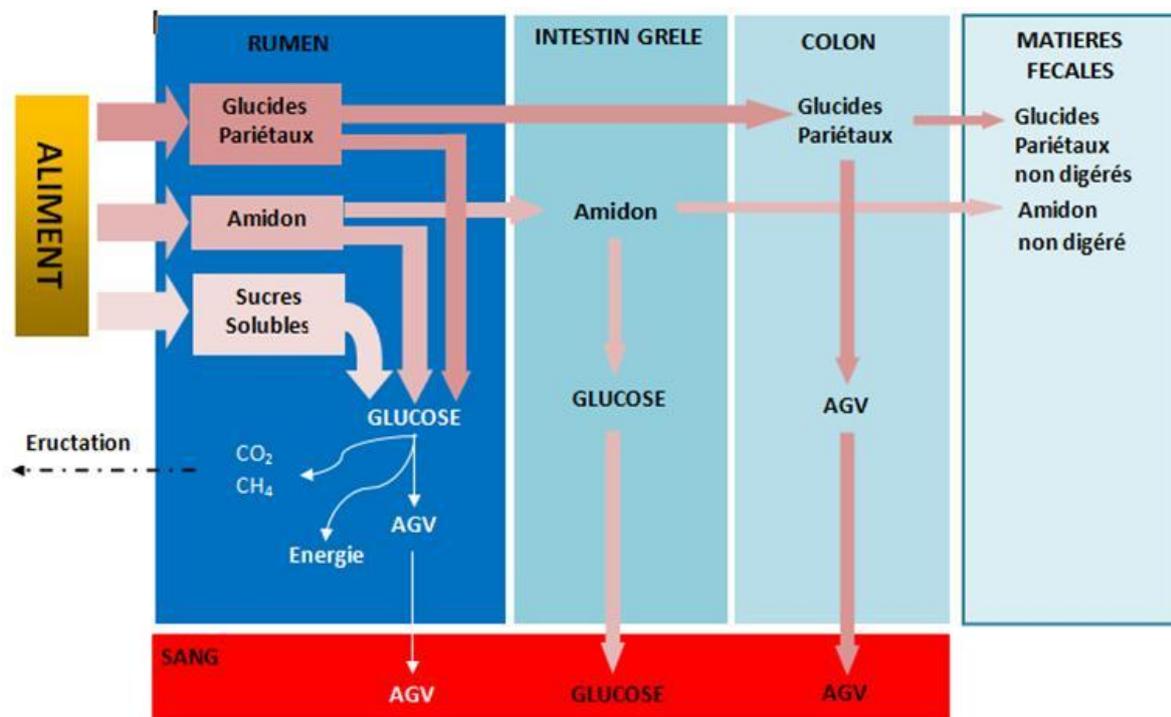


Figure : 2- Schéma de la digestion des glucides chez les ruminants (Cuvelier *et al.*, 2015).

2.2.- Sources d'azote pour les bactéries

Les aliments azotés consommés par l'animal sont dégradés au niveau du rumen par la population microbienne ruminale. Ces aliments azotés sont composés de protéines (longues chaînes d'acides aminés), de peptides, d'acides aminés et d'azote non protéique qui comprend notamment les acides aminés, les bases azotées, les amines, l'urée et l'ammoniac (NH_3). Les protéines sont transformées en acides aminés puis fermentées jusqu'au stade d'ammoniac. L'azote non protéique est directement transformé en ammoniac.

De cette dégradation on obtient une faible quantité d'énergie. Les microorganismes du rumen utilisent l'ammoniac pour synthétiser leurs propres protéines (protéines microbiennes). Cette synthèse ne peut être effectuée qu'en présence d'une quantité suffisante d'énergie obtenue à partir de la dégradation des glucides si non les matières azotées excédentaires seront éliminées sous forme de NH_3 qui est potentiellement toxique. (Cuvelier *et al.*, 2015).

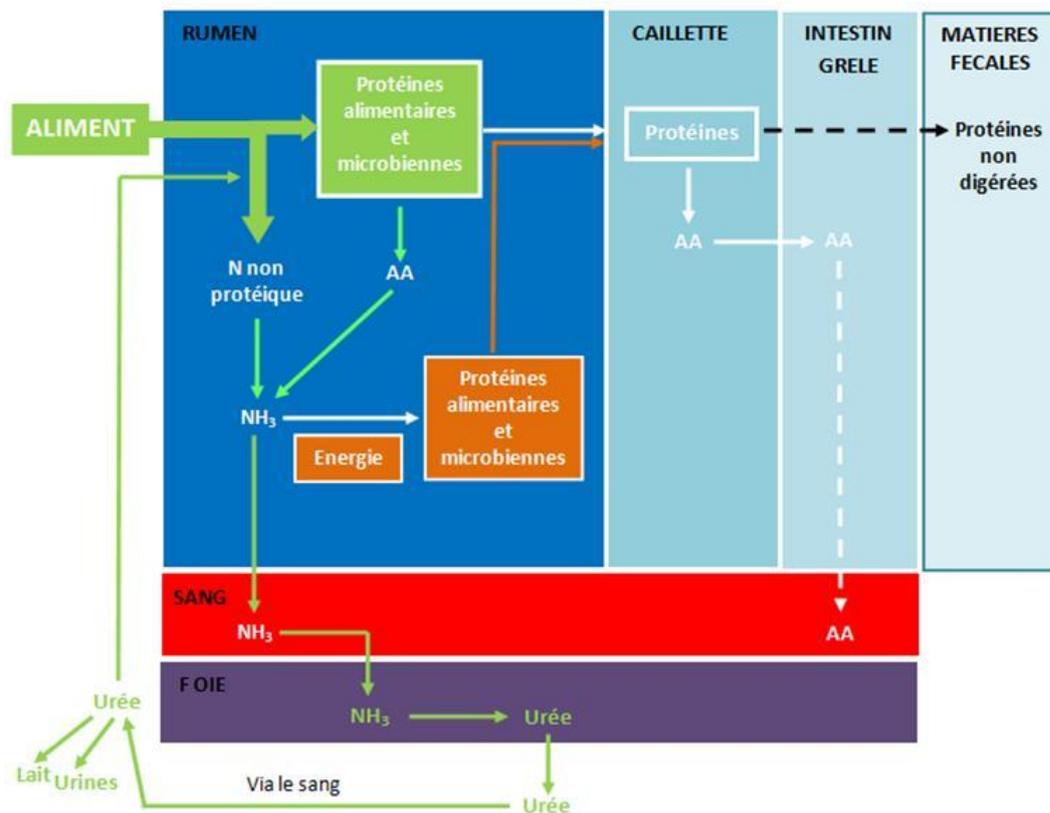


Figure : 3- Schéma de la digestion des matières azotées chez les ruminants (Cuvelier *et al.*, 2015).

Partie expérimentale

Chapitre II

2.- Matériel et méthodes

2.1.- Matériel végétal et sources d'azote

2.1.1.- Les sources d'énergie

Pour évaluer l'utilisation de différentes sources d'azote par la flore ruminale bovine en présence de différentes sources d'énergie, nous avons utilisé quatre sources d'énergie constituées par deux fourrages naturels fibreux : les chrysanthèmes (*Chrysanthémum coronarium*) et les cardes (*Silybum marianum*). Deux résidus de l'industrie agro-alimentaire ont été également utilisés comme source d'énergie: les résidus de tomates (ou déchets de la production de concentré de tomates) et les résidus d'oranges, déchets de la production industrielle de jus d'orange.



Figure : 4- Chrysanthèmes en fleurs (*Chrysanthémum coronarium*)

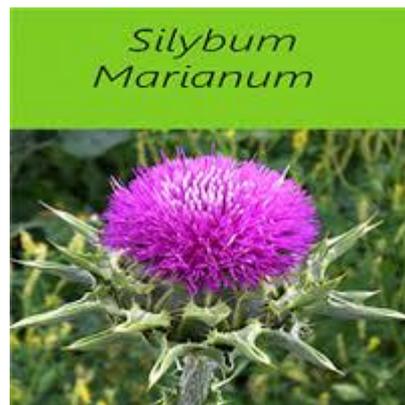


Figure : 5- Cardes en fleurs (*Silybum marianum*)

2.1.2.- Les sources d'azote

- Nous avons utilisé quatre sources d'azote différentes
- Deux sources d'azote organiques
- l'extrait de levure, forme essentiellement protéique
 - le glutamate de sodium, forme aminique
- Deux sources d'azote non organiques
- le bicarbonate d'ammonium
 - le nitrate de potassium

Tableau 1 : Composition, concentration, toxicité et prix des sources d'azote utilisées.

milieux	Composition	Concentration utilisée dans nos milieux en g/l	toxicité	Prix en Euro/Kg
Bicarbonate d'ammonium	99 % Bicarbonate d'ammonium (NH ₄ HCO ₃)	1.25	Non toxique	11.20
Na-glutamate	99 % Na-glutamate (C ₅ H ₈ NNaO ₄)	2.67	Non toxique	5.33
Nitrate de potassium	99 % Nitrate de potassium (KNO ₃)	1.53	toxique	5.61
Extrait de levure	Protéine totale.....62-73.8 %Azote total.....10-11.8 % Azote aminique.....4.5-5.8 % cendres a part le chlorure...11.5-16.0% pH (2%).....6.8-7.2% Chlorure de sodium....moins de 0.5 % Moisissure... moins de 0.6 %	1.76	Non toxique	203
Milieu sans azote		0 g/l		

2.2.-Préparation du matériel végétal

Les résidus de tomates

Préparation des résidus de tomates en suivant la procédure « hot/cold break » ci-dessous :

- Lavage des tomates à l'eau de robinet puis avec de l'eau distillée;
- Traitement des tomates selon la procédure « hot/cold break » qui consiste à mettre les tomates dans de l'eau distillée bouillie quelques secondes, en les faisant ressortir et remettre dans de l'eau distillée froide, pour faciliter le détachement de la peau.
- Pelage des tomates, réduction de ces dernières en purée avec une moulinette munie d'un disque ayant des pores de 1 mm de diamètre
- Tamisage et séchage à l'étuve réglée à 60 °C.

Les résidus d'oranges

-les résidus d'oranges sont les déchets agro-industriels obtenus après la production de jus d'oranges, Ils sont ramenés au laboratoire à partir de l'unité Onafla de Ramdane Djamel (Skikda).

2.3.- l'inoculum

Le liquide ruminal est prélevé à partir de bovins sacrifiés à l'abattoir d'El khroub (Constantine) et acheminé au laboratoire dans des thermos aseptisés. L'aseptisation des thermos se fait par lavage avec de l'eau distillée stérile additionnées d'eau de javel puis rinçage avec de l'eau distillée stérile pure, pour enlever toute trace d'eau javel et ce pour éviter d'intoxiquer les microorganismes de l'inoculum.

2.4.-Analyse des caractéristiques de l'inoculum

2.4.1-Analyse du pH

- Mesurer le pH du liquide ruminal dès son arrivée au laboratoire en utilisant un pH mètre.

2.4.2- Analyse des caractéristiques microbiologiques

L'inoculum est analysé par un examen microscopique en quatre types de frottis : liquide ruminal frais tel quel, liquide ruminal filtré à travers 2 couches de mousseline, liquide

ruminal mélangé avec les milieux A, B, C, D et E avant incubation et après 120 heures d'incubation.

- Déposer une goutte du liquide ruminal tel quel, filtré, mélangé à chaque milieu, et celle d'après incubation dans la lame correspondante à l'aide d'une pipette pasteur. Étaler l'échantillon.

- (Trois répétitions pour chaque prélèvement), puis effectuer une coloration de Gram des anaérobies selon Kopeloff, et faire l'observation microscopique. Trois lames sont utilisées pour l'étalement de chacun des échantillons suivants :

-Liquide ruminal tel quel (LRTQ)

-Liquide ruminal filtré à travers deux couches de mousseline (LRF)

-Le mélange du milieu A + LRF

-Le mélange du milieu B + LRF

-Le mélange du milieu C+ LRF

-Le mélange du milieu D + LRF

-Le mélange du milieu E + LRF

2.5.-Préparation de l'inoculum

Après la collecte du liquide ruminal, il est filtré à travers deux couches de mousseline directement dans les cinq milieux d'incubation

2.6.- Préparation des milieux d'incubation

Les milieux d'incubation comportent la source d'azote et le tampon bicarbonate. Ils sont préparés selon les fiches consignées dans le tableau 2. Un milieu de contrôle ne comportant pas de source d'azote est utilisé (milieu E) pour suivre la dégradation de la source d'énergie sans apport d'azote.

Tableau 2.- Fiche de préparation des milieux A, B, C, D et E (bicarbonate d'ammonium, Na-glutamate, nitrate de potassium, extrait de levure, milieu sans source d'azote ajouté)

	Source d'azote	Composition	Quantité		Solution réductrice	Quantité	pH
Jour avant l'inoculation	(Milieu A) NH ₄ HCO ₃ Azote minéral	-NH ₄ HCO ₃ (bicarbonate d'ammonium) MM = 79.06	628 mg			5 g 480 ml	
	(Milieu B) Na_Glutamate Azote organique (sel d'acide aminé)	-Na Glutamate MM= 187.13	1337.15 mg				
	(Milieu C) KNO ₃ Azote minéral (sel de potassium)	-KNO ₃ (nitrate de potassium) MM = 101.11	765.92 mg				
	(Milieu D) Extrait de levure Azote organique	-Extrait de levure	882.2 mg				
	(Milieu E) Pas de source d'azote	Néant					
Jour de l'inoculation					-Résaurine MM = 251.17	0.62 g	6.8 Ajusté avec NaOH 5N ou HCl 5N
					Na ₂ S.nH ₂ O (sulfure de sodium) MM=240.18 -Eau distillée	0.2 g 20 ml	
	Volume totale à préparer					500 ml	

- Remplir les flacons jusqu'à 480 ml d'eau distillée, peser les composants qui constituent chaque milieu et cela selon les fiches de préparation précédentes. Mettre un barreau magnétique dans chaque flacon et on agite jusqu'à homogénéisation. Préparer la solution réductrice (0.8 g de Na₂S dans 100 ml d'eau distillée stérile). Ajouter 20 ml de la solution

réductrice (la résazurine) dans chaque milieu le jour de l'inoculation, après un certain temps les milieux deviennent incolores donc ils sont réduits.

2.6.1.- Réduction des milieux

La stérilisation des milieux se fait dans l'autoclave pour chasser l'O₂ de ces derniers. Le barbotage sur CO₂ se fait comme suit.

La colonne de réduction contient des copeaux de cuivre. Elle est reliée à deux bouteilles de gaz, l'hydrogène et le dioxyde de carbone (H₂, CO₂). Cette dernière est chauffée, et quand le CO₂ traverse la colonne le cuivre piège l'O₂ pour former du CuO. On ouvre la bouteille d'hydrogène qui barbote dans les milieux pour enlever toute trace d'oxygène, on la ferme, puis on ouvre celle du CO₂. Les milieux sont saturés en CO₂ pour assurer l'anaérobiose.



Figure : 6- Les cinq milieux en préparation sous flux de CO₂

2.7.- Préparation de la verrerie

Utiliser 65 seringues en verre dont la capacité est de 100 ml. laver les seringues à l'eau de robinet et à l'eau de javel puis les rincer avec de l'eau distillée. Mettre ces dernières dans de l'eau distillée stérile et on ajoute 100 ml d'eau de javel. Et les rincer avec de l'eau distillée stérile et les sècher à l'air libre.

2.8.- Pesée des substrats et lubrification des seringues

Peser 0.2 g de chaque substrat dans les sabots stériles en aluminium. Transférer chaque substrat dans la seringue correspondante. Lubrifier le piston avec de la vaseline. Fermer avec des bouchons stériles en caoutchouc et les placer dans l'étuve.

2.9.- Inoculation et incubation des différents milieux

2.9.1.- L'inoculation et l'incubation

Préparer le liquide ruminal et on mesure son pH. Autoclaver le matériel y compris les milieux pour leur stérilisation. Mettre les milieux dans le bain-marie réglé à 39°C. Barboter les milieux avec du CO₂ pour empêcher l'O₂ de pénétrer. Ajuster le pH à 6,8 ±0,1 de chaque milieu sous flux de CO₂ à 39°C avec du HCl 5N ou du NaOH 5N. Ajouter 20 ml de la solution réductrice (la résazurine) dans chaque milieu, après un certain temps les milieux deviennent incolores ils sont donc réduits.



Figure : 7- Les cinq milieux inoculés avec le liquide ruminal filtré, sous flux de CO₂

Enlever 50 ml des milieux, et ajouter 50 ml du liquide ruminal filtré à travers 2 couches de mousseline dans chaque milieu à l'aide d'un entonnoir. Mesurer le pH des milieux à 39°C.

Le transfère du mélange liquide ruminal et milieu de culture vers les seringues qui contiennent les substrats se fait avec des tuyaux qui relient le mélange et la seringue à remplir et à l'aide d'une petite seringue lubrifiée avec de la vaseline.

-dans les deux essais, Transférer 20 ml de chaque mélange (milieu + liquide ruminal) dans les seringues correspondantes. Ces dernières (aseptisées et lubrifiées) contiennent les substrats qui sont les cardes, les chrysanthèmes, résidus d'oranges et résidus de tomates. Les blancs correspondent aux seringues où seul le milieu avec ou sans source d'azote et où aucun substrats n'a été introduit. Les seringues sont fermées par des bouchons en caoutchouc pour garder les conditions d'anaérobiose ensuite elles sont placées dans l'étuve réglée à 39°C. Le

suivi de la lecture se fait à intervalle de temps régulier, chaque 4 heures les premières 24 heures puis chaque 2 heures jusqu'à 120 heures avec le pied à coulisse.



Figure : 8- Seringue contenant le mélange : milieu, substrat et liquide ruminal filtré

2.9.2.- Calibrage des seringues

Il existe un certain degré de variation qui nécessite d'être pris en compte. Grâce au calibrage des seringues on maintient un certain degré de précision et on obtient une valeur déterminée.

Mesurer le volume fournit comme suit :

mettre 20 ml d'eau distillée dans chaque seringue, et les mettre dans l'étuve réglée à 39° C pendant 1 heure. Avec le pied à coulisse mesurer le volume obtenu et on ajoute 2.5 ml d'eau distillée avec une petite seringue. Répéter cette opération 3 fois mais pendant 15 minutes.

Calculer le volume corrigé avec cette relation : $V \text{ (ml)} = 2.5 \times V_a / F_r$, avec V : volume corrigé, V_a : Volume absolu et F_r : facteur de correction.

2.10.- Suivi des incubations et expression des résultats

Mesurer le volume du gaz produit pendant la fermentation chaque 2 heures pendant les premières 24 heures puis chaque 4 heures jusqu'à 120 heures. Les résultats sont exprimés en ml de gaz produit en 120 h par 200 mg de MS. le volume du gaz lu est corrigé par le facteur de calibration décrit dans le paragraphe 2.9.2. La mesure se fait par un instrument appelé pied à coulisse. Le traitement des données a été effectué par le logiciel SAS (Statistical Analysis System, 2003).

Résultats et discussion

Chapitre III

3.- Résultat et discussion

3.1- Analyse de la production de gaz dans les différentes sources d'azote

3.1.1- L'incubation des blancs (sans apport d'énergie)

Sans apport d'énergie, la même flore ruminale mise dans des milieux de culture comportant cinq sources d'azote différentes réagit avec une production de gaz différente d'un milieu à un autre. Que la source d'azote soit organique ou non organique, les microorganismes du rumen sont capables de croître et de dégrader les débris alimentaires (apportés par l'inoculum filtré) et de produire du gaz. L'activité microbienne s'exerce donc dans les deux cas (azote organique, azote inorganique), sur les débris alimentaires, mais avec des courbes différentes de cinétiques différentes.

- Incubation dans le milieu E : sans source d'azote

Ce milieu, sans source d'azote ni de source d'énergie ajoutées, produit immédiatement du gaz, à partir des débris apportés par l'inoculum, avec une faible vitesse et plus que le milieu D (extrait de levure) à partir de 10 h d'incubation. Il produit plus que le milieu B, mais à partir de 20 h d'incubation ce dernier le dépasse. A partir de 30 h d'incubation le milieu C le dépasse. Par rapport au milieu D, il le dépasse à partir de 18 h d'incubation. Le milieu A produit du gaz plus que le milieu E durant toute l'incubation. La production de gaz du milieu E arrive jusqu'à 3 ml, La courbe de cette dernière est de type hyperbolique. Même si le milieu ne contient ni source d'azote ni source d'énergie ajoutées, la flore utilise les débris alimentaires et produit quand même du gaz.

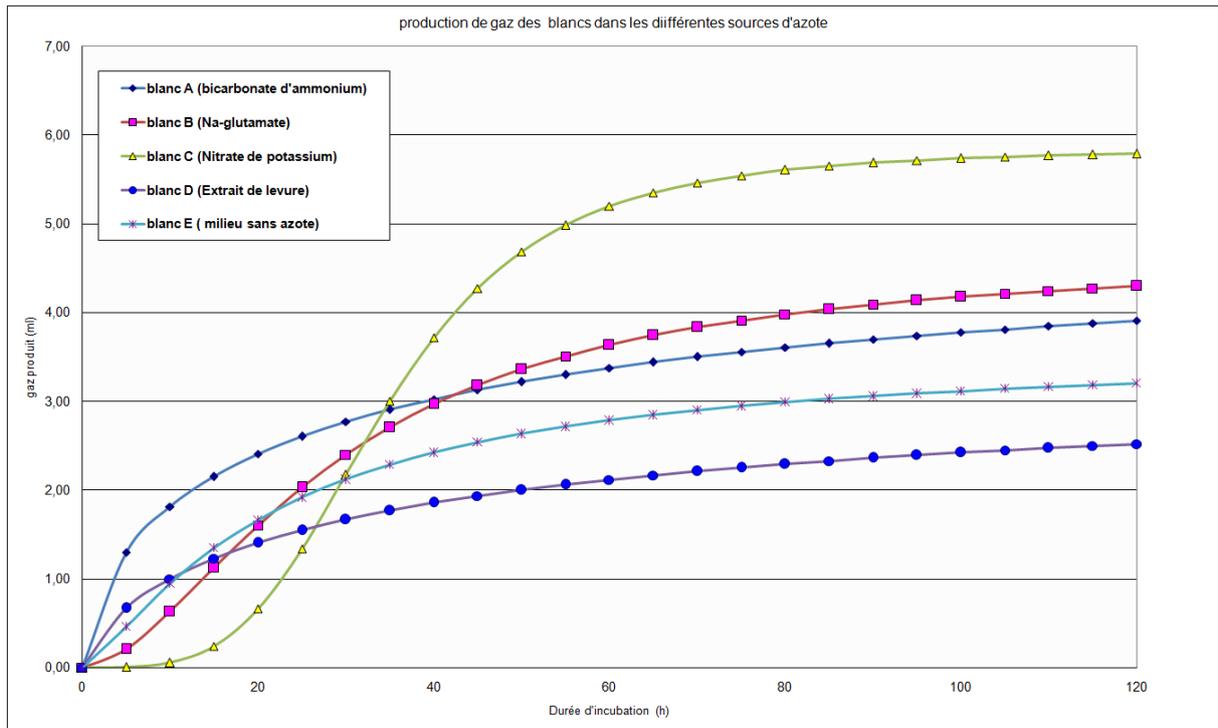


Figure : 9- Production de gaz des blancs dans les différentes sources d'azote

- **Incubation dans le milieu C : source d'azote inorganique, le nitrate de potassium**

Dans ce milieu la production de gaz ne démarre qu'après 7 à 10 h d'incubation par rapport aux autres milieux où elle est presque instantanée. A partir de 24 h le milieu C commence à produire plus que les autres milieux et au bout de 30 - 35 h d'incubation la production de gaz dépasse les autres milieux, pour atteindre un plateau situé autour de 5 ml de gaz (pour 2 ml de liquide ruminal filtré). On observe une phase de latence d'une durée de 7 à 8 h. L'aspect de la courbe est du type sigmoïde, ce qui montre que les microorganismes rencontrent des difficultés à produire du gaz au début de l'incubation, ou bien ils doivent d'abord s'adapter à la source d'azote qui est le nitrate de potassium. Une fois cette phase de latence passée, la production de gaz augmente. Cette phase de latence est très courte pour les autres milieux.

- **Incubation dans le milieu B : source d'azote organique, le glutamate de sodium**

C'est le deuxième milieu qui produit le plus de gaz que les autres (4 ml de gaz produit). Néanmoins il démarre en retard par rapport aux autres milieux puis il les dépasse : milieu D, milieu E, milieu A (à partir de 20 h, 25h, 40 h d'incubation) respectivement. On observe une courbe légèrement sigmoïde, avec une phase de latence inexistante. Les microorganismes utilisent directement le glutamate de sodium mais avec une vitesse inférieure aux milieux A,

D et E. Ceci est peut être du à la dissolution des deux molécules de glutamate et de sodium par la glutamate déshydrogénase (GDH).

- **Incubation dans le milieu A : source d'azote inorganique, le bicarbonate d'ammonium**

La production de gaz démarre instantanément par rapport aux autres milieux, et à partir de 35h d'incubation il produit moins que le milieu C (3.2 ml), puis à partir de 45 h d'incubation il est dépassé par le milieu B (3 ml). La courbe a une forme hyperbolique. Le bicarbonate d'ammonium est une source d'azote non protéique. Ce dernier se dissocie rapidement en solution aqueuse et libère des ions ammonium (NH_4^+) facilement utilisables par la flore bactérienne ruminale. Ceci donne une vitesse initiale de production de gaz très élevée par rapport aux autres sources d'azote.

- **Incubation dans le milieu D : source d'azote organique, l'extrait de levure**

Ce milieu produit le moins de gaz par rapport aux autres milieux. Il démarre tout de suite avec une vitesse moyenne par rapport au milieu E qu'il dépasse à partir de 10 h d'incubation. Il dépasse le milieu B à partir de 15 h d'incubation et dépasse le milieu C à partir de 25 h d'incubation. Le milieu A produit du gaz plus que le milieu D. la courbe de production de gaz du milieu D est de type hyperbolique. Etant donné que l'extrait de levure est riche en protéines et en peptides, les microorganismes ont besoin d'énergie pour dégrader les protéines et produire les acides aminés et les ions ammonium dont ils ont besoin, ce qui se traduit par une faible production de gaz.

3.1.2.- Production de gaz de résidus de tomates

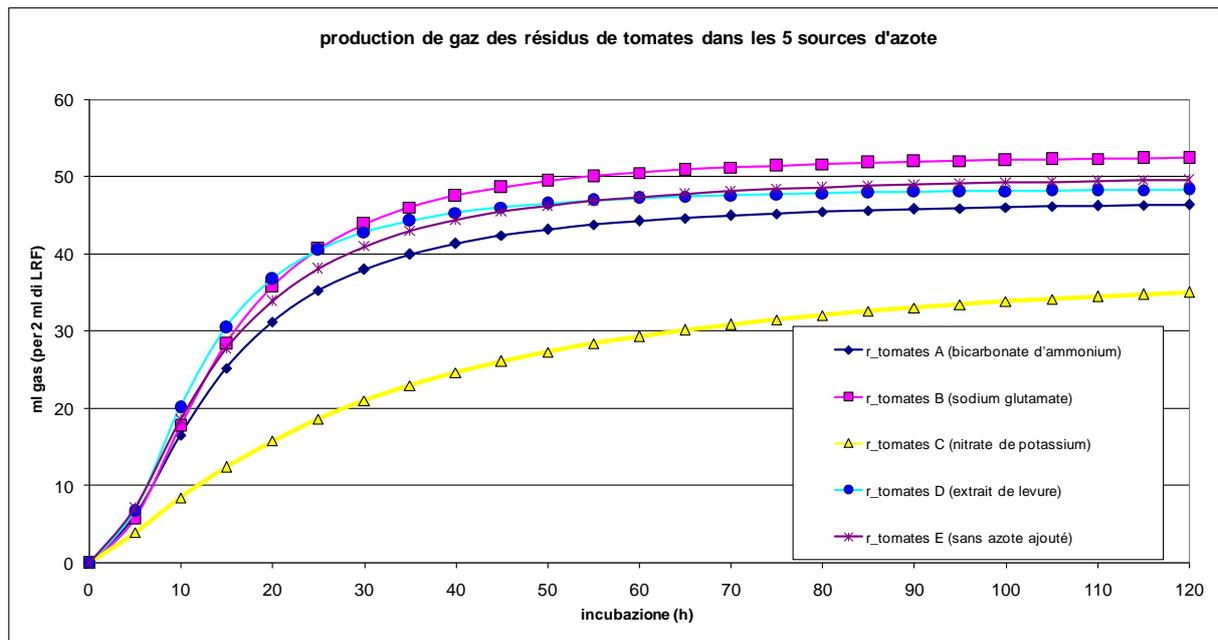


Figure : 10- production de gaz des résidus de tomates dans les différentes sources d'azote

-Les résidus de tomates est une source d'énergie qui apporte aussi la source d'azote en plus des débris alimentaires qui sont apportés par le liquide ruminal, donc elle a une forte production de gaz par rapport aux blancs, avec un maximum de 52 ml/200 mg de MS pour le milieu B (Na-glutamate) et un minimum de 35 ml avec le milieu C (nitrate de potassium). Ce dernier comme source d'azote influe négativement sur la production de gaz donc le nitrate de potassium a une cinétique aplatie et il y a moins de production de gaz par rapport aux autres milieux A, B, D et E. On observe une nette différence entre le milieu C et les autres milieux A, B, D, et E. Les courbes de cinétique de ces derniers sont semblables.

Statistiquement la tomate dans les milieux A, B, D et E produit une quantité de gaz comparable. Donc ces sources d'azote ne sont pas toxiques, mais à la concentration de 1,53 g/l le nitrate de potassium présente une certaine toxicité. On observe que les courbes de cinétique des milieux A, B, D, et E sont sigmoïdes Alors que celle du milieu C est hyperbolique. A part le cas du nitrate de potassium l'ajout d'une source d'azote ou non ne change pas beaucoup la production de gaz donc la tomate ramène suffisamment d'azote, les sources d'azote qu'on a fournit n'apportent qu'une petite différence

- 3.1.3.-Production de gaz des résidus d'oranges

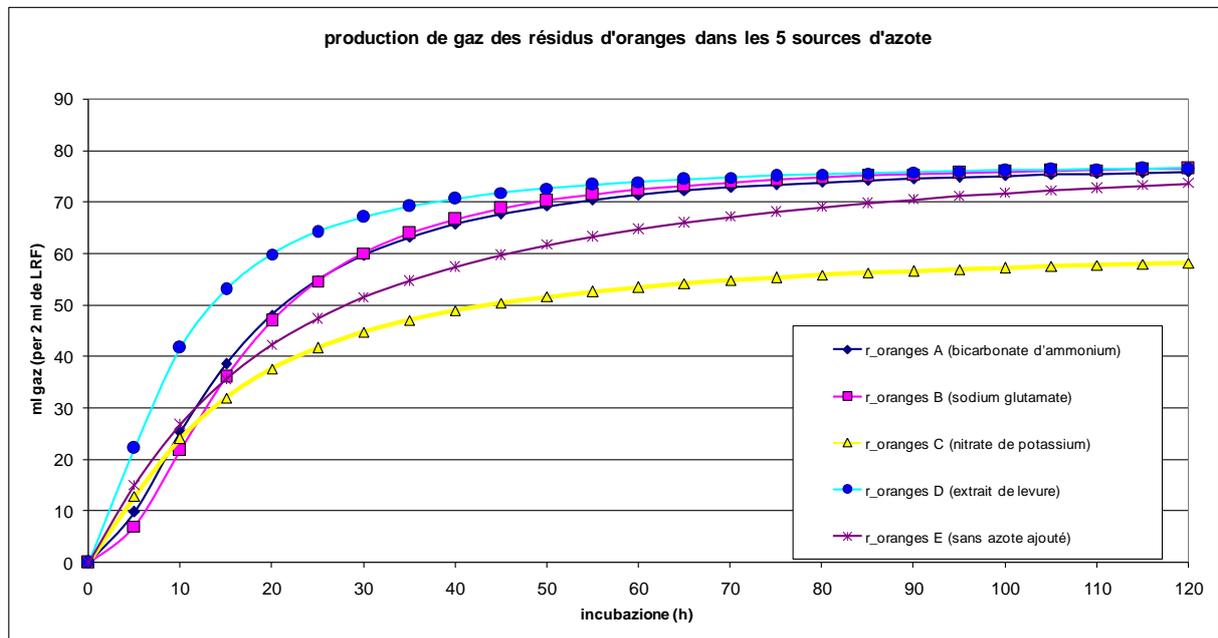


Figure : 11- Production de gaz des résidus d'oranges dans les différentes sources d'azote

La phase initiale pour les oranges ne démarre pas de la même façon dans tous les milieux. Le milieu C (nitrate de potassium) inhibe la production du gaz avec une faible quantité de 50 ml / 200 mg de MS par rapport aux autres milieux (A, B, D, E). Ces derniers produisent entre 70-80 ml. Le milieu D (extrait de levure) produit du gaz avec une grande vitesse par rapport aux autres milieux (A, B, C, E). Le milieu A (bicarbonate d'ammonium) et B (Na-Glutamate) ont des cinétiques superposées. Les courbes de cinétique de production de gaz dans les milieux A et B sont légèrement sigmoïdes alors que celles des milieux (C, D, E) sont hyperboliques. L'utilisation du nitrate de potassium peut être positif car il fait baisser la production du gaz lorsque le ruminant consomme les déchets d'orange et cela en inhibant certaines méthanogènes. L'excès de gaz de fermentation est nuisible pour le ruminant.

3.1.4.-Production de gaz des cardes

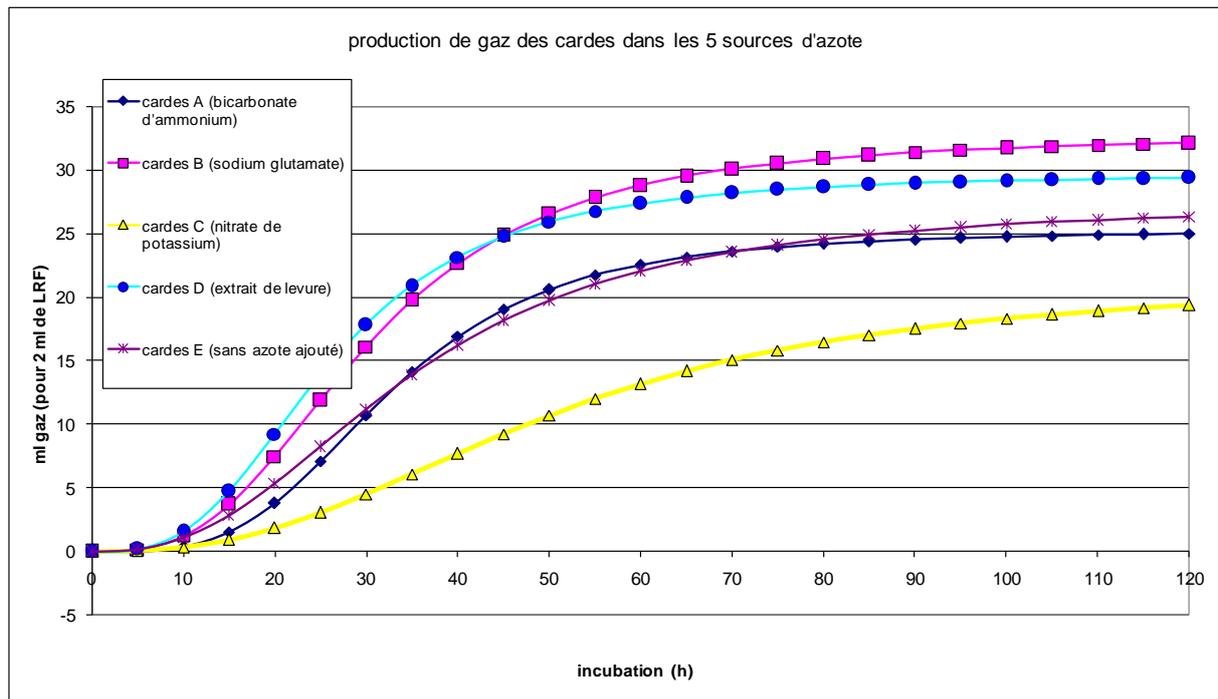


Figure : 12- production de gaz des cardes dans les différentes sources d'azote

-Avec les cardes les sources d'azote organiques donnent de meilleurs résultats que les sources d'azote non organiques (30 – 32 ml 200 mg de MS) Le milieu E, sans azote ajouté, produit plus de 25 ml/200 mg de MS. Sa courbe de cinétique est semblable à celle du milieu A (bicarbonate d'ammonium). Le milieu C (au nitrate de potassium) inhibe la production de gaz et donne la plus faible des productions (21 ml). Les courbes de cinétique de production de gaz des milieux E et A sont très semblables. Celles des milieux B et D, le sont aussi, mais celle du milieu C reste est très différente des autres. Statistiquement la courbe de cinétique du milieu C est très différente de celle du milieu B et du milieu D, mais comparable avec celle du milieu E et du milieu A. On observe que les courbes de cinétique des milieux A, B, C, D et E sont légèrement sigmoïdes, probablement à cause des difficultés qu'ont les microorganismes de l'inoculum à obtenir de l'énergie d'une plante très fibreuse comme les cardes.

3.1.5.- Production de gaz des chrysanthèmes

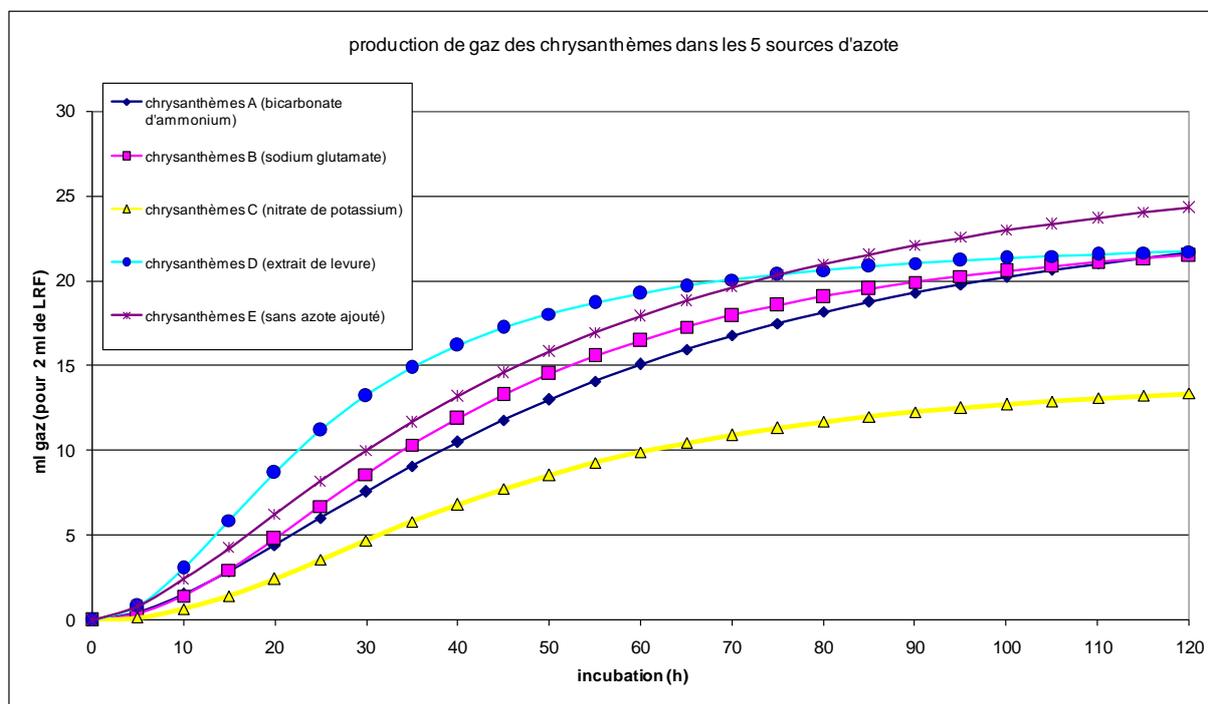


Figure : 13- Production de gaz des chrysanthèmes dans les différentes sources d'azote.

Dans la phase exponentielle, l'extrait de levure présente une vitesse de production de gaz plus élevée par rapport aux autres milieux A, B, C et E. Le milieu E, sans source d'azote, produit plus de gaz que les autres milieux jusqu'à 25 ml/200 mg de matière sèche. L'extrait de levure, le Na-glutamate, le bicarbonate d'ammonium produisent jusqu'à 22 ml / 200 mg de MS. Le nitrate de potassium inhibe la production de gaz et produit 14 ml. Les courbes de cinétique des milieux A, B, D et E sont semblables mais celle du milieu C est très différente des autres. Statistiquement les courbes de cinétique des milieux A, B, D et E sont comparables mais celle du milieu C est différente. On observe que les courbes de cinétique des milieux A, B, D et E sont sigmoïdes Alors que celle du milieu C est hyperbolique.

3.2.- Analyse des caractéristiques de l'inoculum

3.2.1.- Mesure du pH

3.2.1.1.- pH de l'inoculum, des milieux ajustés et du mélange LR filtré et des milieux A, B, C, D et E avant fermentation.

Les valeurs du pH du LR tel quel sont de : 6.12 - 6.36, ces valeurs sont supérieures à celles rapportées par (Coulibaly, Diarra 2014) qui sont de 5.65 - 5.90.

Les valeurs du pH des milieux ajustés sont reportées dans les tableaux suivants:

Tableau 3.- pH des milieux après ajustement

Milieu	pH des milieux après ajustement
Milieu A (Bicarbonate d'ammonium)	6.88 – 6.92
Milieu B (Na-glutamate)	6.89 – 6.92
Milieu C (Nitrate de potassium)	6.86 – 6.89
Milieu D (Extrait de levure)	6.80 – 6.83
Milieu E (Sans azote)	6.87 – 6.90

Les valeurs du pH du mélange LR filtré et milieu A, B, C, D et E sont de 6.86 à 7.01.

Tableau 4.- pH du mélange LRF et des milieux A, B, C, D et E.

	pH du mélange LRF + milieu	Moyenne du mélange
Milieu A	7.01 – 7.05	7.03
Milieu B	6.97 – 6.99	6.98
Milieu C	6.97 – 7.00	6.99
Milieu D	6.94 – 6.97	6.96
Milieu E	6.86 – 6.89	6.88

3.2.1.2.- pH après 120 h de fermentation des résidus de tomates

Tableau 5.- pH des milieux A, B, C, D et E avec les résidus de tomates comme substrat avant et après 120 h de fermentation.

	Milieu A (Bicarbonate d'ammonium)	Milieu B (Na-glutamate)	Milieu C (Nitrate de potassium)	Milieu D (extrait de levure)	Milieu E (sans azote)
Moyenne des pH (avant fermentation)	7.03	6.98	6.99	6.96	6.88
Moyenne des pH (après 120 h de fermentation)	7.71	7.48	7.53	7.78	7.51

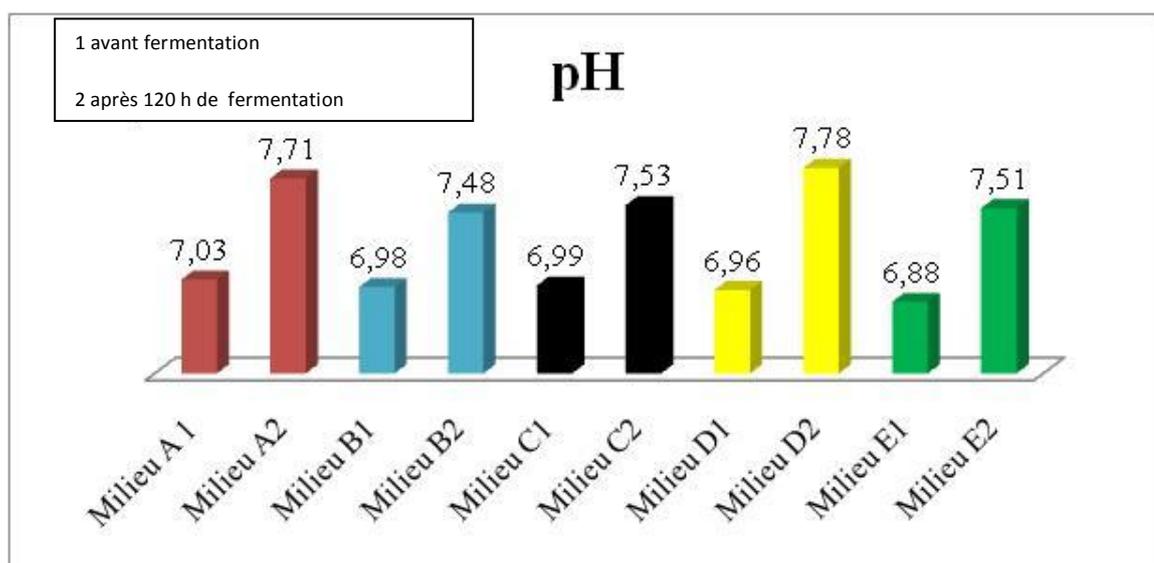


Figure : 14- pH des résidus de tomates dans les cinq milieux avant et après 120 h de fermentation

Après 120 h de fermentation le pH dans les cinq milieux A, B, C, D et E, avec et sans source d'azote et avec les résidus de tomates comme substrat est de 7.48 à 7.78, il est proche de la neutralité et a augmenté par rapport aux pH initial du mélange LR filtré et milieu A, B, C, D et E. Dans le milieu A (bicarbonate d'ammonium) le pH après 120 h de fermentation est de 7.71 et différent du pH de départ du LR filtré plus milieu A qui est de 7.03. Dans le milieu B

(Na-glutamate) le pH après 120 h de fermentation est de 7.48 et très différent du pH de départ du LR filtré plus milieu B qui est de 6.98. Dans le milieu C (nitrate de potassium) le pH après 120 h de fermentation est de 7.53 et aussi très différent du pH de départ du LR filtré plus milieu C qui est de 6.99. Dans le milieu D (extrait de levure) le pH après 120 h de fermentation est de 7.78 et très différent du pH de départ du LR filtré plus milieu D qui est de 6.96. Dans le milieu E (sans source d'azote) le pH après 120 h de fermentation est de 7.58 et différent du pH de départ du LR filtré plus milieu E qui est de 6.88. Ces résultats sont supérieurs à ceux de (Coulibaly, Diarra 2014).

3.2.1.3.- pH après 120 h de fermentation des blancs

Tableau 6.- pH des milieux A, B, C, D et E avec les blancs avant et après 120 h de fermentation.

	A (Bicarbonate d'ammonium)	B (Na-glutamate)	C (Nitrate de potassium)	D (extrait de levure)	E (sans azote)
Moyenne des pH (avant fermentation)	7.03	6.98	6.99	6.96	6.88
Moyenne des pH (après 120 h de fermentation)	7.51	7.29	7.8	7.44	7.41

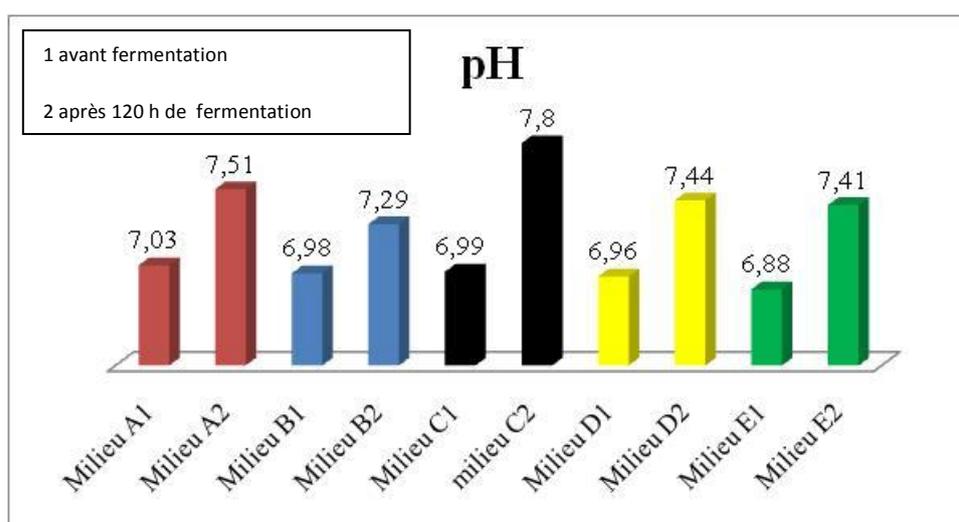


Figure : 15- pH des blancs dans les cinq milieux avant et après la 120 h de fermentation

Le pH final dans les cinq milieux A, B, C, D et E, avec et sans source d'azote et sans substrat est de 7.29 à 7.80, il est proche de la neutralité et a augmenté par rapport aux pH initial du mélange LR filtré et milieu A, B, C, D et E. Dans le milieu A (bicarbonate d'ammonium) le pH après 120 h fermentation est de 7.51, il est différent du pH de départ du LR filtré plus milieu A qui est de 7.03. Dans le milieu B (Na-glutamate) le pH après 120 h de fermentation est de 7.29, il est très différent du pH de départ du LR filtré plus milieu B qui est de 6.98. Dans le milieu C (nitrate de potassium) le pH après 120 h de fermentation est de 7.8 et aussi très différent du pH de départ du LR filtré plus milieu C qui est de 6.99. Dans le milieu D (extrait de levure) le pH après 120 h de fermentation est de 7.44, il est très différent du pH de départ du LR filtré plus milieu D qui est de 6.96. Dans le milieu E (sans source d'azote) le pH après 120 h de fermentation est de 7.41, il est très différent du pH de départ du LR filtré plus milieu E qui est de 6.88. Ces résultats sont supérieurs à ceux de (Coulibaly, Diarra 2014).

3.2.1.4.- pH après 120 h de fermentation des résidus d'oranges

Tableau 7.- pH des milieux A, B, C, D, et E avec les résidus d'oranges comme substrat avant et après 120 h de fermentation

	A (Bicarbonate d'ammonium)	B (Na-glutamate)	C (Nitrate de potassium)	D (extrait de levure)	E (sans azote)
Moyenne des pH (avant fermentation)	7.03	6.98	6.99	6.96	6.88
Moyenne des pH (après 120 h de fermentation)	6.8	6.75	6.95	6.68	6.76

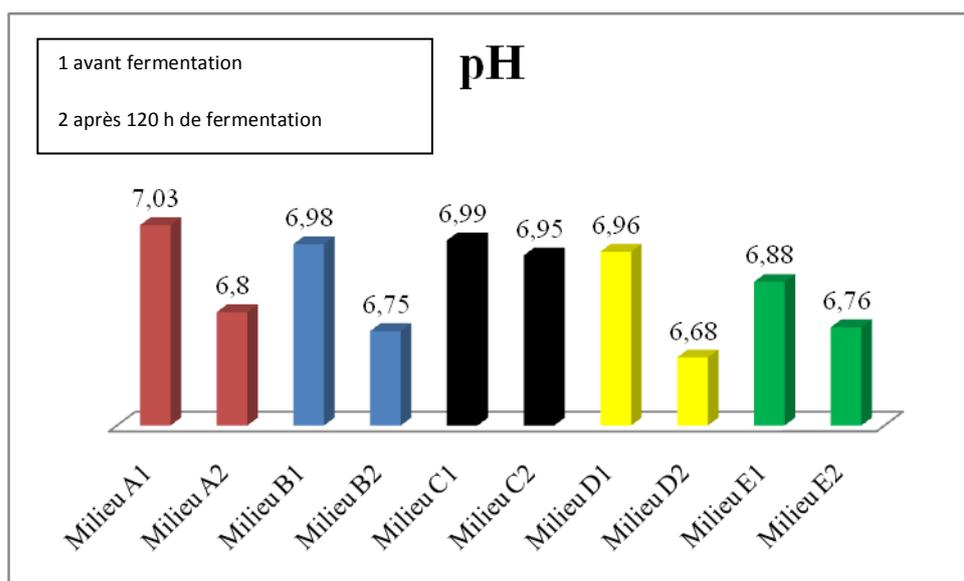


Figure : 16- pH des résidus d'oranges dans les cinq milieux avant et après 120 h de fermentation

Avec les oranges comme source d'énergie le pH final dans les cinq milieux A, B, C, D et E, avec et sans source d'azote est de 6.68 à 6.95, il est proche de la neutralité et a baissé par rapport aux pH initial du mélange LR filtré et milieu A, B, C, D et E. Dans le milieu A (bicarbonate d'ammonium) le pH après 120 h de fermentation est de 6.80, il est différent du pH de départ du LR filtré plus milieu A qui est de 7.03. Dans le milieu B (Na-glutamate) le

pH après 120 h de fermentation est de 6.75, il est différent du pH de départ du LR filtré plus milieu B qui est de 6.98. Dans le milieu C (nitrate de potassium) le pH après 120 h de fermentation est de 6.95 et aussi peu différent du pH de départ du LR filtré plus milieu C qui est de 6.99. Dans le milieu D (extrait de levure) le pH après 120 h de fermentation est de 6.68, il est très différent du pH de départ du LR filtré plus milieu D qui est de 6.96. Dans le milieu E (sans source d'azote) le pH après 120 h de fermentation est de 6.76, il est différent du pH de départ du LR filtré plus milieu E qui est de 6.88. Ces résultats sont supérieurs à ceux de (Coulibaly, Diarra 2014).

3.2.1.5.- pH après 120 h de fermentation des cartes

Tableau 8.- pH des milieux A, B, C, D et E avec les cartes comme substrat avant et après 120 h de fermentation

	A (Bicarbonate d'ammonium)	B (Na-glutamate)	C (Nitrate de potassium)	D (extrait de levure)	E (sans azote)
Moyenne des pH (avant fermentation)	7.03	6.98	6.99	6.96	6.88
Moyenne des pH (après 120 h fermentation)	7.91	7.67	7.77	7.66	7.65

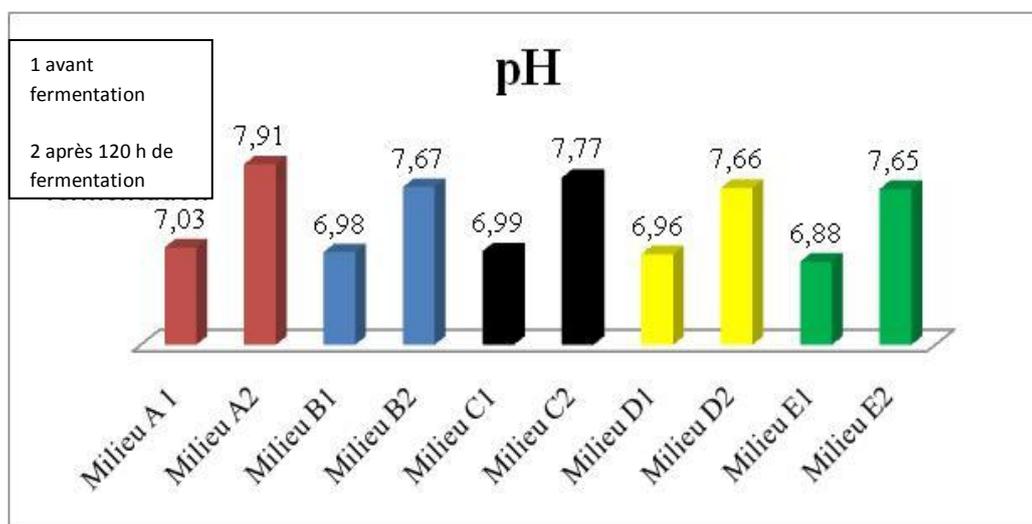


Figure : 17- pH des cartes dans les cinq milieux avant et après 120 h de fermentation

Après 120 h de fermentation le pH dans les cinq milieux A, B, C, D et E, avec et sans source d'azote et avec les cardes comme substrat est proche de la neutralité de 7.65 à 7.91 et a augmenté par rapport aux pH initial du mélange LR filtré et milieu A, B, C, D et E. Dans le milieu A (bicarbonate d'ammonium) le pH après 120 h de fermentation est de 7.91, il est différent du pH de départ du LR filtré plus milieu A qui est de 7.03. Dans le milieu B (Na-glutamate) le pH après 120 h de fermentation est de 7.67, il est très différent du pH de départ du LR filtré plus milieu B qui est de 6.98. Dans le milieu C (nitrate de potassium) le pH après 120 h de fermentation est de 7.77 et aussi très différent du pH de départ du LR filtré plus milieu C qui est de 6.99. Dans le milieu D (extrait de levure) le pH après 120 h de fermentation est de 7.66, il est très différent du pH de départ du LR filtré plus milieu D qui est de 6.96. Dans le milieu E (sans source d'azote) le pH après 120 h de fermentation est de 7.65, il est différent du pH de départ du LR filtré plus milieu E qui est de 6.88. Ces résultats sont supérieurs à ceux de (Coulibaly, Diarra 2014).

3.2.1.6.- pH après 120 h de fermentation des chrysanthèmes

Tableau 9.- pH des milieux A, B, C, D et E avec les chrysanthèmes comme substrat avant et après 120 h de fermentation

	A (Bicarbonate d'ammonium)	B (Na-glutamate)	C (Nitrate de potassium)	D (extrait de levure)	E (sans azote)
Moyenne des pH (avant fermentation)	7.03	6.98	6.99	6.96	6.88
Moyenne des pH (après 120 h de fermentation)	7.94	7.79	7.57	8.12	7.89

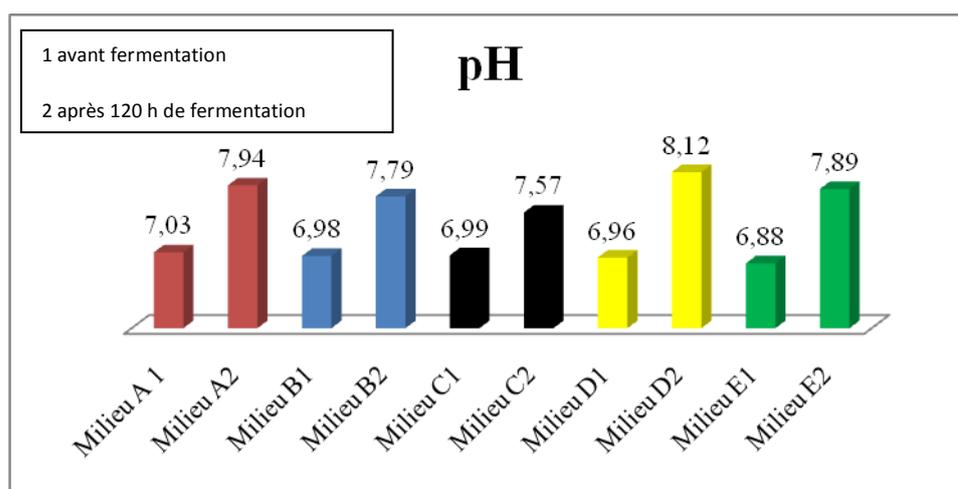


Figure : 18- pH des chrysanthèmes dans les cinq milieux avant et après 120 h de fermentation

Dans les cinq milieux A, B, C, D et E, avec et sans source d'azote et avec les chrysanthèmes comme substrat le pH après 120 h d'incubation est proche de la neutralité il est de 7.57 à 8.12 et a augmenté par rapport aux pH initial du mélange LR filtré et milieu A, B, C, D, et E. Dans le milieu A (bicarbonate d'ammonium) le pH après 120h de fermentation est de 7.94, il est différent du pH de départ du LR filtré plus milieu A qui est de 7.03. Dans le milieu B (Na-glutamate) le pH après 120 h de fermentation est de 7.79, il est très différent du pH de départ du LR filtré plus milieu B qui est de 6.98. Dans le milieu C (nitrate de potassium) le pH après 120 h de fermentation est de 7.57 et aussi différent du pH de départ du LR filtré plus milieu C qui est de 6.99. Dans le milieu D (extrait de levure) le pH après 120 h de

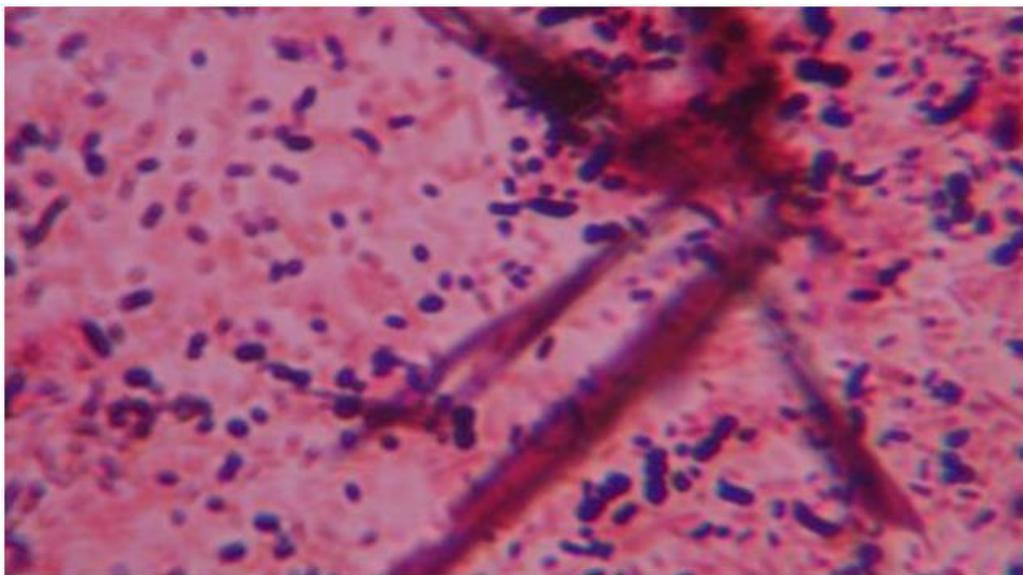
fermentation est de 8.12, il est très différent du pH de départ du LR filtré plus milieu D qui est de 6.96. Dans le milieu E (sans source d'azote) le pH après 120 h de fermentation est de 7.89, il est très différent du pH de départ du LR filtré plus milieu E qui est de 6.88. Ces résultats sont supérieurs à ceux de (Coulibaly et Diarra 2014). Le pH du mélange LR filtré plus milieu A, B, C, D et E avant fermentation est de 6,88 à 7,03 proches de la neutralité. Après 120 h de fermentation il change : avec les résidus de tomates, les cardes, et les chrysanthèmes comme substrat il augmente et même sans substrat ce dernier augmente jusqu'à 7.29 – 8.12. Mais reste proche de la neutralité. Avec les résidus d'oranges le pH baisse jusqu'à 6.68, car ils acidifient les milieux en produisant les AGV.

3.2.2.- Caractéristiques microbiologiques

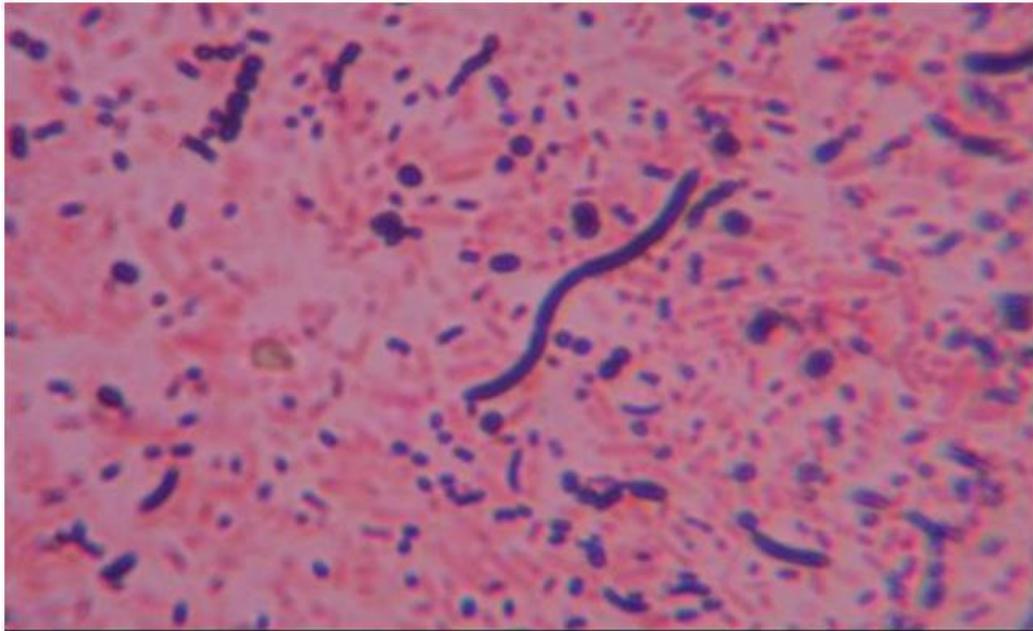
Les résultats obtenus par la coloration de Gram et l'observation microscopique (grossissement X 1000) révèlent le type de Gram, les différentes formes, et les différents modes de regroupement : isolé, diplocoque, en grain de café, en amas, en chaînette et en palissade. On observe aussi la présence de débris alimentaires.

3.2.2.1.- Liquide ruminal frais, tel quel

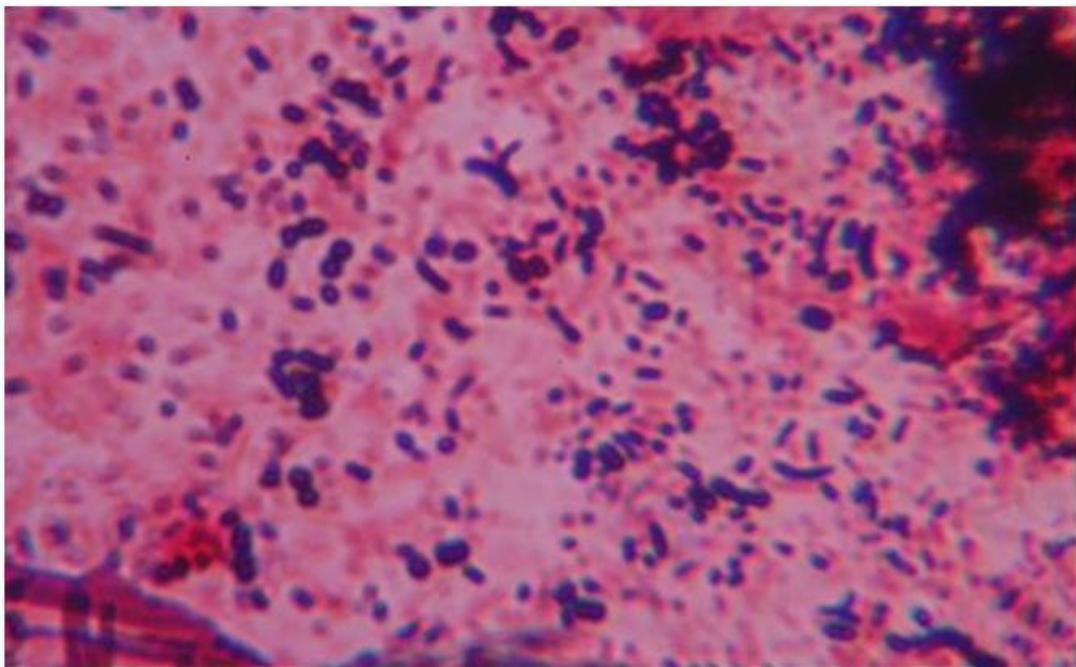
On observe une forte densité des bactéries Gram – par rapport aux Gram + avec différentes formes : chez les bactéries Gram – : bacilles, coccobacilles, coques. Chez les bactéries Gram + : spirille, bacilles, coques. Avec différents modes de regroupement : en diplocoques, en chaînettes, en amas. Et on observe aussi la présence de débris alimentaires.



a



b



c

Figure : 19- Observation microscopique des bactéries Gram + et Gram- du liquide ruminal tel quel (photos a, b, c, grossissement X 1000).

3.2.2.2 - Liquide ruminal filtré

La quantité des bactéries Gram + a baissé et celle des Gram - a augmenté. En plus de ce qui a été observés dans le liquide ruminal tel quel, on observe aussi des bactéries Gram – regroupées en grain de café.

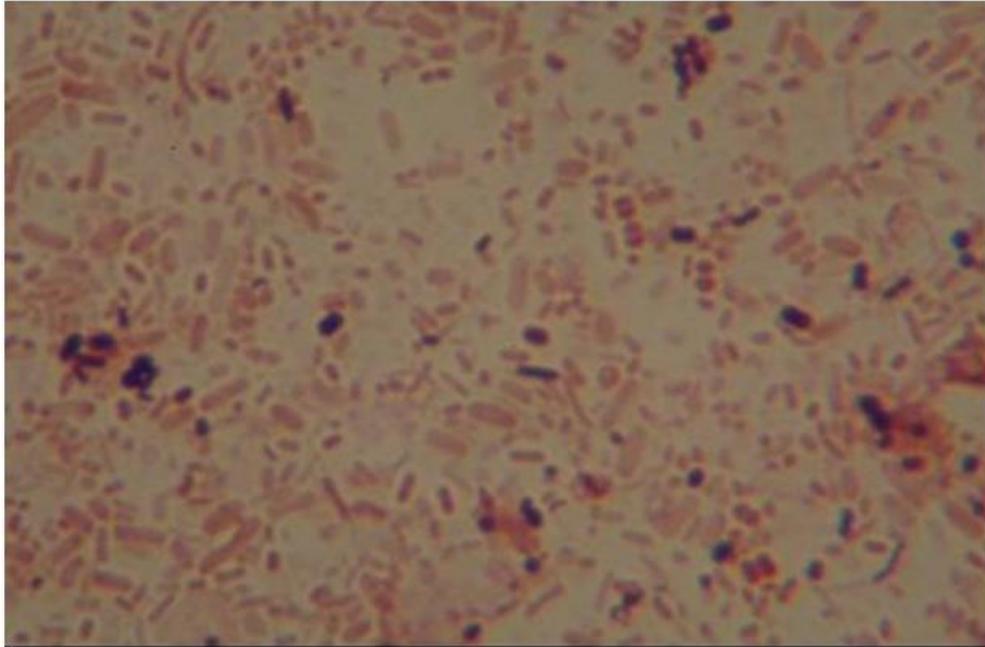
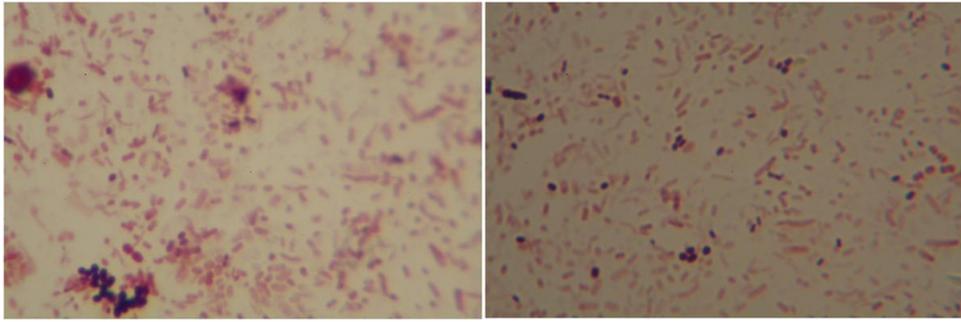


Figure : 20- Observation microscopique des bactéries Gram + et Gram - du liquide ruminal filtré (G X 1000).

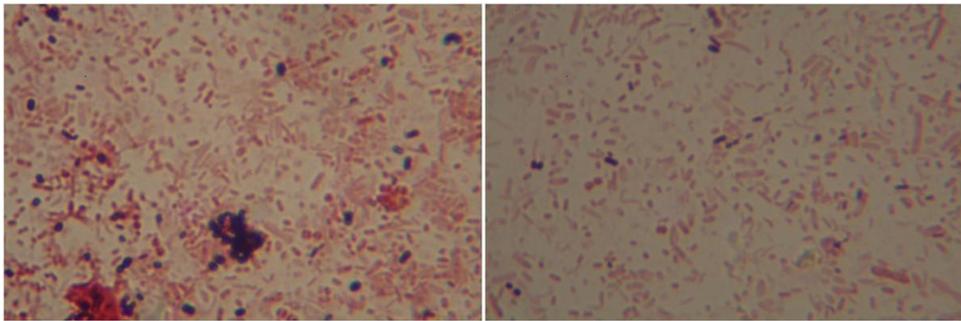
3.2.2.3.- Mélange liquide ruminal filtré et milieu d'incubation

On observe aussi dans le mélange liquide ruminal filtré avec les différents milieux d'incubations (avec et sans azote) une nette diminution des bactéries Gram + et une grande quantité des bactéries Gram –. En plus des observations précédentes, on observe aussi dans le mélange liquide ruminal filtré et le milieu E (sans source d'azote) une forme rosette Gram +. Après filtration du liquide ruminal les bactéries Gram + diminuent car elles restent attachées aux particules alimentaires.



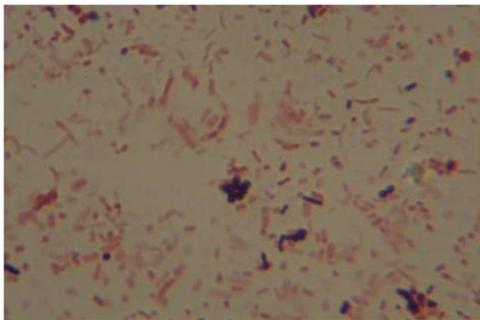
a

b



c

d

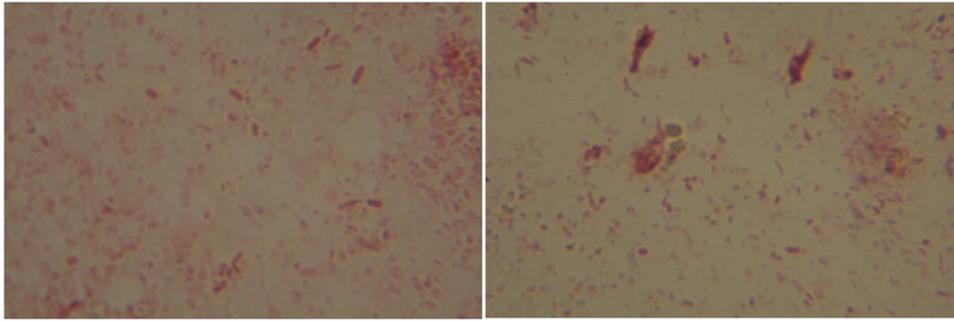


e

Figure : 21- Observation microscopique des bactéries Gram + et Gram - du liquide ruminal filtré et milieu d'incubation A, B, C, D et E, respectivement. (photo a,b,c,d et e, G X 1000).

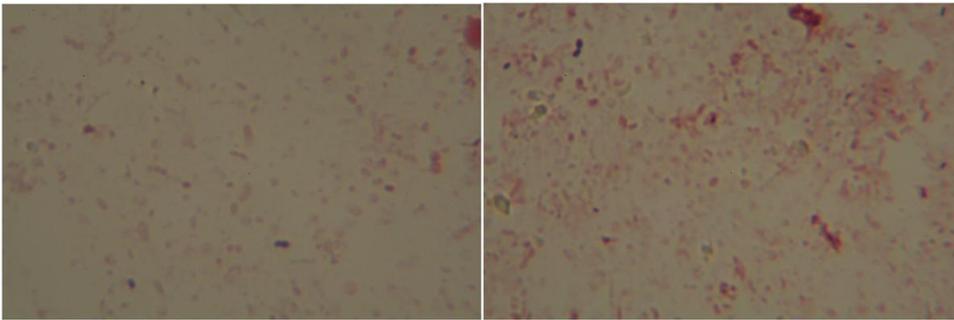
3.2.2.4.- Milieux fermentés après 120 h de fermentation,

On observe dans les milieux fermentés après 120 h d'incubation une nette diminution des bactéries Gram -, et presque une absence total des bactéries Gram +.absence de débris alimentaire



a

b



c

d

Figure : 22 - Observation microscopique des bactéries Gram + et Gram – des milieux fermentés (oranges, tomates, cardes et chrysanthèmes, respectivement) après 120 h de fermentation (photos a, b, c et d, G X1000).

Conclusion

Conclusion

Dans notre travail, nous avons essayé de voir dans quelle mesure la flore ruminale bovine peut utiliser certaines formes organiques et inorganiques d'azote en présence de différentes sources d'énergie. En analysant la production de gaz, les caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques de la flore ruminale bovine on peut conclure que cette dernière utilise toutes les formes d'azote en absence des substrats source d'énergie. Toutefois le volume de cette production est 10 à 15 fois plus faible qu'avec les différentes sources d'énergie. Avec le glutamate de sodium la production de gaz démarre tard et atteint 4,2 ml. Pour le bicarbonate d'ammonium, la production de gaz est de 4 ml, la dissociation rapide de ce dernier en solution et la libération d'ions ammonium (NH_4^+), permet à la flore bactérienne ruminale de l'utiliser facilement. Ceci se traduit par une vitesse initiale de production de gaz très élevée par rapport aux autres sources d'azote. La production de gaz la plus basse avec 2.5 ml correspond à l'extrait de levure. L'extrait de levure est riche en protéines et en peptides, les microorganismes ont besoin d'énergie pour le dégrader et produire les acides aminés et les ions ammonium dont ils ont besoin, ce qui se traduit par une faible production de gaz.

Les résidus agroalimentaires, source d'énergie principalement, ont la plus forte production de gaz dans tous les milieux, que la source d'azote soit sous forme organique ou inorganique. La production de gaz est de 70 à 80 ml/200 mg de MS pour les résidus d'oranges avec toutes sources d'azote et aussi, sauf avec le nitrate de potassium ils produisent environ 50 ml. Car le nitrate de potassium inhibe l'activité de certains groupes bactériens comme les méthanogènes. Pour les résidus de tomates la production est plus basse : 52 ml avec toutes les sources d'azote mais seulement 35 ml avec le nitrate de potassium. Pour les plantes fibreuses dans les mêmes milieux et avec les mêmes sources d'azote ou même sans apport d'azote la production est faible. Ceci pourrait être du à leur composition riche en fibres difficiles à dégrader. Pour les cardes avec les formes d'azote organiques il ya plus de gaz produit (30 à 32 ml) qu'avec les formes d'azote inorganiques et sans azote (25 ml). Par contre, avec le nitrate de potassium (source d'azote inorganique) la production est faible (21 ml). Les chrysanthèmes incubés sans source d'azote ajoutée, produisent plus qu'avec l'apport d'azote (25 contre 21 ml). Avec le nitrate de potassium, la production de gaz des chrysanthèmes n'est que de 14 ml.

La flore ruminale produit des AGV qui acidifient le milieu et font baisser le pH. C'est le cas des résidus d'oranges, pour lesquels le pH après 120 h de fermentation baisse jusqu'à 6,68. Lorsque la quantité d'AGV produite est importante, la quantité du tampon bicarbonate ne suffit pour stabiliser le pH qui finit par baisser. L'observation microscopique a révélé que l'inoculum utilisé était dominé par la présence des bactéries Gram négatif et surtout après filtration vu que les bactéries Gram positif sont restées attachées aux grosses particules alimentaires (>50 µm).

Les bactéries ruminales utilisent différentes formes d'azote organiques et inorganiques, seul le nitrate de potassium, source d'azote inorganique a eu un effet négatif sur la production de gaz dans tous les cas de figure. Ce résultat peut être utilisé positivement dans la limitation de production d'excès de gaz issus de la fermentation des résidus agro-alimentaires riches en substances facilement fermentescibles.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- 1-Amokrane S. 2010. Etude des prétraitements microbiologiques des résidus agroalimentaires lignocellulosiques en vue de leur valorisation en alimentation animale, Mémoire de magister. Université Constantine 1, p 12.
- 2- Coulibaly et Diarra, 2014. analyse de la cinétique de fermentation *in vitro* des résidus de tomates et d'oranges et de plantes fibreuses, dans différentes sources d'azote selon un model logistique , Mémoire de master. Université Constantine 1.
- 3- Cuvelier, Hornick, Beckers, Froidmont, Knapp, Istasse, Dufsane. 2015. L'alimentation de la vache laitière Physiologie et Besoins, Centre Wallon de Recherches Agronomiques, Université de Liège, p 26-28.
- 4- Dusart C. 2014. La digestion ruminale mise en place d'un modèle d'étude *in vitro* à long terme en culture batch : doctorat sciences vétérinaire présentée et soutenue publiquement devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse, p 28.
- 5- Gilles R., Anctil M., Plumier J., Baguet F., Charmantier G., Péqueux A., Sébert P. 2006. Physiologie animale. Premier édition. Éditions de Boeck université, p 269-271.
- 6-Hillaire-Marcel, C., Rochon, A., et équipage scientifique.1990. Cruise report and on-board studies, CSS Hudson 90-13.
- 7-Hungate R.E., 1966. Livre, The rumen and its microbes. Acad. Press, New- York and London.
- 8- Jouany J.P., 1978.Contribution à l'étude des protozoaires ciliés du rumen : leur dynamisme, leur rôle dans la digestion et leur intérêt pour le ruminant. Th. D'Etat, Univ. Clermont II.
- 9- Jouany J.P. , 1994. Les fermentations dans le rumen et leur optimisation. INRA Productions Animales, p 208-209.
- 10- Orpin G. 1983 / 1984. The role of ciliate protozoa and fungi in the rumen digestion of plant cell walls. Animal Feed Science and Technology 10, 121-143.
- 11- Thivend P., Fonty G., Jouany J.P., Durand M., Gouet P. 1985. Le Fermenteur rumen. *Reprod. Nutr. Dévelop*, p733-742 -743.

Résumé

Summary:

Our purpose consists to understand how the bovine rumen flora can use organic and inorganic forms of the nitrogen in the presence of different sources of energy. During this study, we effectuated the cinetic study of the fermentation in vitro of tomatoes and oranges residues in addition to fiber plants, in different nitrogen sources even without nitrogen. This is among the incubation of these latter with the rumen liquid in media that contains different nitrogen sources, medium A (ammonium bicarbonate, mineral nitrogen), medium B (Na-glutamate, organic nitrogen), milieu C (potassium nitrate, mineral nitrogen), medium D (yeast extract, organic nitrogen) and medium E (medium without nitrogen source). The results show that oranges residues product more gas with 70-80ml/200mg of MS, followed by tomatoes with 52ml/200mg of MS, then chards with 30-32ml/200mg of MS and finally chrysanthemums with 25ml/200mg of MS. In these five media the pH is measured before the fermentation with near values to neutrality, and after the fermentation the pH increases in media that contain tomatoes residues pH=7.78, fiber plants pH=7.94, except for oranges residues that decreases pH=6.68, due to production of volatif fatty acids.

The microbiological analysis of the bovine rumen flora revealed a dominance of Gram-bacteria compared with Gram+ and a diminution of these latter after 120H of incubation in different media.

ملخص:

يتمثل الهدف من دراستنا في فهم إلى أي مدى تستطيع ميكروبات كرش الأبقار استعمال بعض الأشكال العضوية واللاعضوية للآزوت بوجود مختلف مصادر الطاقة. خلال هذا العمل، قمنا بالدراسة حركية التخمر في المختبر لبقايا الطماطم والبرتقال بالإضافة إلى نبتتين ليفيتين، في مختلف مصادر الأزوت وحتى دون الأزوت. ذلك من خلال تفريخ هذه الأخيرة مع سائل الكرش في الوسائط التي تحتوي على موارد مختلفة للآزوت: وسط أ (بيكاربونات الأمونيوم، أزوت معدني)، وسط ب (Na-غلوتامات، أزوت عضوي)، وسط ج (نترات البوتاسيوم، أزوت معدني)، وسط د (مستخرج الخميرة، أزوت عضوي) ووسط هـ (وسط دون مصدر أزوت). تبين النتائج أن بقايا البرتقال تنتج غاز أكثر بـ 70-80 مل/200 مغ MS، تليها بقايا الطماطم بـ 52 مل/200 مغ MS، ثم السلق بـ 30-32 مل/200 مغ MS وفي الأخير الأبقان بـ 25 مل/200 مغ. قدر pH في هذه الأوساط الخمسة قبل التفريخ بقيم قريبة من الحياد. بعد التفريخ يزيد pH في الأوساط التي تتضمن بقايا الطماطم $pH=7.78$ والنباتات الليفية $pH=7.94$ ، ماعدا تلك الخاصة ببقايا البرتقال أين ينخفض $pH=6.68$ بسبب إنتاج أكبر ل AGV. تبرز الدراسة الحيوية لميكروبات كرش الأبقار سيطرة بكتيريا غرام- بالنسبة لبكتيريا غرام+ ونقص هذه الأخيرة بعد 120 سا من التفريخ في أوساط مختلفة.

Nom : Sahli	Nom : Latrous	
Prénom : Batoul	Prénom : Narimane	Date de soutenance : 06 juillet 2015
Thème : <i>Etude de la fermentation in vitro des résidus de tomates et d'oranges et de deux plantes fibreuses (cardes et chrysanthèmes), par la flore ruminale bovine, dans différentes sources d'azote</i>		
Résumé <p>Notre but a consisté à comprendre dans quelle mesure la flore ruminale bovine peut utiliser certaines formes organiques et inorganiques de l'azote en présence de différentes sources d'énergie. Au cours de ce travail, on a procédé a l'étude de la cinétique de fermentation <i>in vitro</i> des résidus de tomates et d'oranges ainsi que deux plantes fibreuses, dans différentes sources d'azote et même sans apport d'azote. Ceci à travers l'incubation de ces derniers avec le LR dans des milieux qui contiennent différentes sources d'azote : milieu A (bicarbonate d'ammonium, azote minéral), milieu B (Na-glutamate, azote organique), milieu C (nitrate de potassium, azote minéral), milieu D (extrait de levure, azote organique) et le milieu E (milieu sans source d'azote). Les résultats montrent que les blancs qui sont sans source d'énergie produisent une faible quantité de gaz qui diffère selon la source d'azote. La plus forte production est de 6 ml pour le nitrate de potassium, environ 4 ml pour le bicarbonate d'ammonium et le Na-glutamate, 3ml pour le milieu sans source d'azote et plus que le milieu avec l'extrait de levure qui est d'environ 2.5 ml. Donc la flore ruminale utilise les débris alimentaire et produit comme même de gaz. les résidus d'oranges produisent plus de gaz avec 70-80 ml/200 mg de MS, suivis des résidus de tomates avec 52 ml, puis les cardes avec 30-32 ml et en dernier les chrysanthèmes avec 25 ml, avec les sources d'azote organiques la production de gaz est plus forte qu' avec les sources non organiques et pour le nitrate de potassium la production de gaz est inhibé. Dans les cinq milieux le pH mesuré avant fermentation a des valeurs proches de la neutralité, et augmente, après fermentation, dans les milieux qui contiennent les résidus de tomates pH= 7.78 et les plantes fibreuses pH= 7.94, sauf pour les résidus d'oranges pour lesquels il baisse pH= 6.68, à cause d'une plus grande production des AGV. L'analyse microbiologique de la flore ruminale bovine révèle une dominance des bactéries Gram – par rapport aux bactéries Gram + et une diminution de ces dernières après 120 h d'incubation dans les différents milieux.</p>		
Mots clés : Flore ruminale bovine, source d'azote, source d'énergie, résidus de tomates, résidus d'oranges, cardes, chrysanthèmes, résidus agroalimentaires		
Jury d'évaluation : Président du jury : M. KADEM D. (Professeur- UFM Constantine). Rapporteur : M. HADDI M.L (Professeur- UFM Constantine). Examinatrice : Mme. MIHOUBI I. (Professeur- UFM Constantine). Tutrice : Melle. AGGOUN A. (Doctorante- UFM Constantine).		
Laboratoire de recherche : Laboratoire de Mycologie, de biotechnologie et des activités microbiennes.		