

Origine des uréases impliquées dans le traitement de résidus lignocellulosiques avec l'urée. Flore microbienne responsable

Cordesse R., Yameogo V., Arnaud A., Inesta M.

in

Tisserand J.-L. (ed.).
Les pailles dans l'alimentation des ruminants en zone méditerranéenne

Zaragoza : CIHEAM
Options Méditerranéennes : Série B. Etudes et Recherches; n. 6

1994
pages 37-46

Article available on line / Article disponible en ligne à l'adresse :

<http://om.ciheam.org/article.php?IDPDF=95605266>

To cite this article / Pour citer cet article

Cordesse R., Yameogo V., Arnaud A., Inesta M. **Origine des uréases impliquées dans le traitement de résidus lignocellulosiques avec l'urée. Flore microbienne responsable.** In : Tisserand J.-L. (ed.). *Les pailles dans l'alimentation des ruminants en zone méditerranéenne*. Zaragoza : CIHEAM, 1994. p. 37-46 (Options Méditerranéennes : Série B. Etudes et Recherches; n. 6)



<http://www.ciheam.org/>
<http://om.ciheam.org/>

Origine des uréases impliquées dans le traitement de résidus lignocellulosiques avec l'urée. Flore microbienne responsable¹

R. CORDESSE
V. YAMEOGO
A. ARNAUD
M. INESTA
UNITE DE ZOOTECHNIE MEDITERRANEENNE
INRA-ENSA
MONTPELLIER
FRANCE

RESUME - Dans cette étude nous avons recherché, sur le matériel végétal destiné à subir un traitement à l'urée, s'il existait des microorganismes à propriétés uréasiques capables de se multiplier, et ainsi d'assurer les conditions favorables à l'hydrolyse complète de l'urée. Dans un premier essai, l'origine des uréases apportées par la farine de soja et la paille de blé dur a été identifiée. Les échantillons humidifiés à 33% par rapport à la MS ont été stérilisés, tyndallisés ou utilisés en l'état. Les variables mesurées ont été l'activité uréasique et la numération bactérienne. Dans un deuxième essai a été réalisée l'étude de la cinétique de l'uréolyse, du développement et des caractéristiques de la population bactérienne. La disparition de l'urée au cours du temps a été identifiée par la mesure de l'urée résiduelle. La population bactérienne, totale, les souches tolérantes au NH₃ et celles manifestant des propriétés uréasiques ont été identifiées au moyen de cultures sur milieux spécifiques (YMPG, YCB et YCB + urée). Cette étude a permis de montrer que l'urée, agent de traitement des pailles, est hydrolysée essentiellement grâce à des uréases d'origine microbienne. La possibilité d'intervention d'uréases végétales n'a pas été prouvée avec le substrat paille. Onze souches bactériennes ont été identifiées sur les pailles initiales, 5 souches étaient présentes sur les pailles traitées à l'urée et 4 d'entre elles possédaient une activité uréasique. Les pailles humidifiées au taux de 33% peuvent être traitées à l'urée sans avoir recours à une source exogène d'uréase (farine de soja) grâce à la sélection et la multiplication d'une flore microbienne uréasique.

Mots-clés : Urée, uréase, bactéries, paille, farine de soja.

SUMMARY - "Origin of ureases involved in the treatment of lignocellulose residues with urea. Microbial flora responsible". The aim of this study was to determine the origin of ureases associated with plant products treated with urea. It was also of interest to identify, if they were present, microbial germs with urease properties capable to multiply and to insure a complete hydrolysis of urea. A first experiment allowed to precise the origin of the ureases present in soya meal and durum wheat straw. Samples humidified to 33% of moisture relatively to dry matter were sterilized, tyndallized or used as they were. The ureasic activity and the microbic number were assessed. The kinetics of ureolysis as well as the evolution of the development of the bacterial population and its characteristics were studied in a second experiment. Urea removal during the treatment was followed by measuring out the residual urea. Total bacterial population and colonies NH₃-tolerant or having ureolytic properties were identified with specific culture media (YMPG, YCB and YCB + urea). This study under scores that the hydrolysis of urea used as a chemical agent for the treatment of straws is essentially due to ureases from bacterial origin. The

¹Le contenu de cet étude a été déjà publié par Elsevier/INRA en 1993. Ann. Zootech. 42: 39-47.

possible action of plant ureases has not been proved with durum wheat straw. Eleven bacterial colonies were identified on raw straws. Only five colonies were present on urea treated straws but four of them had an ureasic activity. Because of the selection and the multiplication of a microbial flora with an ureasic activity, the urea treatment of humidified straws (33% DM) does not need the supply of exogenous urease containing products such as soya meal.

Key words: Urea, urease, bacteria, straw, soya meal.

Introduction

La rétrogradation de l'urée en ammoniac et gaz carbonique dépend de la présence d'enzymes uréasiques. Aussi, des uréases d'origine végétale sont ajoutées aux pailles traitées à l'urée afin d'accélérer les réactions d'uréolyse (Jayasuriya et Pearce, 1983), d'améliorer l'efficacité du traitement. La farine de soja, connue pour ses propriétés uréasiques est le produit le plus utilisé.

Ces études ne tiennent pas compte d'existence possible d'uréases microbiennes à côté des uréases d'origine végétale. Pourtant, Williams *et al.* (1984) et Hassoun *et al.* (1990) ont montré que la flore bactérienne présente sur les pailles pourrait être suffisante pour assurer l'uréolyse.

Nous avons recherché, sur le matériel végétal destiné à subir un traitement à l'urée, s'il existait des microorganismes à propriétés uréasiques capables de se multiplier et ainsi d'assurer les conditions favorables à l'uréolyse complète de l'urée. Dans ce but, deux essais ont été réalisés :

- i. Identification de l'origine des uréases présentes sur le matériel végétal utilisé.
- ii. Etude de la cinétique de l'uréolyse, du développement et des caractéristiques de la population bactérienne identifiée.

Matériel et méthodes

Essai 1. Identification de l'origine des uréases apportées par les farines de soja et les pailles de blé dur

L'activité uréasique est par définition, la quantité d'azote ammoniacal libéré en 30 min à 30°C, sa mesure est réalisée au moyen de la méthode NFVO3-921. Dans cette expérience, l'ammoniac et l'urée ont été dosés par la méthode enzymatique Boehringer Mannheim no. 542-946.

Des échantillons d'environ 0,1 g de farine de soja ou 1 g de paille de blé broyés (grille 5 mm) ont été humidifiés au taux de 33% par rapport à la MS dans des Erlenmeyers, protégés de la contamination bactérienne par un bouchon de coton. Ils

ont été stérilisés (120°C, 1 h), tyndallisés ou utilisés en l'état. La tyndallisation qui consiste en des chauffages répétés à des températures inférieures à 100°C a pour conséquence la destruction progressive des populations bactériennes sans altération notable de l'activité uréasique (Zelter et Delort-Laval, 1971). Dans cet essai, les traitements de tyndallisation ont été effectués à 90°C pendant 1 h et renouvelés 6 fois à 24 heures d'intervalle.

Les variables mesurées ont été l'activité uréasique et la population bactérienne totale à partir de cultures sur milieu nutritif complet YMPG (Yeast Malt Peptone Glucose).

Essai 2. Etude du développement et des caractéristiques de la population bactérienne, de la cinétique de l'uréolyse

La même paille de blé dur a été utilisée. Chaque échantillon d'un poids moyen de 70 g, a été placé dans un bocal de verre d'une capacité de 2 litres, fermé hermétiquement. L'étanchéité est assurée par un joint en téflon résistant à l'ammoniac. Les paramètres de traitement retenus ont été : humidité (33%), température (30°C), doses d'urée (0,7 et 7% de la matière sèche pour les échantillons de paille brute, 6,7% pour les autres), durée de traitement (30 min, 3, 7 et 30 jours).

Le nombre de répétitions a été de 2 et il a été réalisé 6 dosages par répétition. Nous avons mesuré sur tous les échantillons l'urée résiduelle, la population bactérienne totale et identifié les souches tolérantes à l'urée et celles manifestant des propriétés uréasiques. La détermination de la population uréasique est effectuée à partir de repiquage de colonies du milieu solide YMPG sur milieu liquide YMPG, puis sur les milieux spécifiques YCB (Yeast Carbone Base) de Wickerham enrichi ou non en urée comme seule source d'azote.

Les résultats obtenus dans la première expérience ont été analysés dans un dispositif split plot 3 étages et les moyennes comparées par le test de Newman-Keuls au seuil de 5%. Ceux obtenus dans la deuxième expérience par le test factoriel 2 facteurs en bloc au seuil de 5%.

Résultats

Essai 1

Les résultats enregistrés avec les produits bruts (Table 1) montrent une activité uréasique importante pour la farine de soja et négligeable pour la paille de blé. Après un délai de 48 h, cette activité est augmentée de façon significative ($P = 5\%$) pour les deux produits. La population bactérienne totale initiale est environ 700 fois plus abondante dans le lot paille. Après un délai de 48 h, cette population a été multipliée par un facteur 10 pour la paille et 10 000 pour la farine de soja.

Table 1. Evolution de l'activité uréasique et de la population microbienne de la farine de soja et de la paille de blé sur les produits bruts, tyndallisés ou stérilisés. Valeurs initiales et après 48 h de séjour en milieu humidifié (moyenne de 6 répétitions). Test de comparaison de moyenne au seuil de 5% entre les états 30 min et 48 h

Nature du support de traitement	Activité uréasique (mg NH ₃ g ⁻¹ MS)		Test (5%)	Population microbienne totale x 10 ⁴ bactéries g ⁻¹ MS		Test (5%)
	30 min	48 h		30 min	48 h	
Produits bruts						
Farine de soja	95,4 ± 1,8	101,3 ± 3,0	*	3,4 ± 0,4	33000 ± 450	*
Paille de blé	0,14 ± 0,01	0,52 ± 0,03	*	2250 ± 350	51500 ± 250	*
Produits tyndallisés						
Farine de soja	58,3 ± 1,2	68,9 ± 1,4	*	Traces	Traces	
Paille de blé	0	0		Traces	Traces	
Produits stérilisés						
Farine de soja	0	0		0	0	
Farine de blé	0	0		0	0	

* Valeur significative au seuil de 5%

La stérilisation détruit toute la population microbienne et toute activité uréasique. L'opération de tyndallisation a entraîné une destruction presque totale de la population microbienne sur les deux supports et une forte réduction de l'activité uréasique de la farine de soja. Sur la paille, l'activité uréasique n'est plus mesurable.

Essai 2

Avec la paille brute (Table 1), traitée à la dose de 7% d'urée, l'hydrolyse est rapide puisqu'elle atteint 20% après 30 min, 45% après 3 jours, 94% après 7 jours et qu'elle est totale après un mois de traitement.

Avec les pailles tyndallisées ou stérilisées, l'hydrolyse de l'urée est limitée et relativement constante avec la durée du traitement. L'urée hydrolysée est comprise entre 4 et 13% mais la variabilité des résultats est importante malgré l'augmentation du nombre de répétitions.

La population bactérienne totale identifiée (Table 1) sur les pailles brutes ou après traitement diffère de manière importante. Les échantillons tyndallisés et stérilisés ne révèlent que rarement des traces de bactéries. Dans les échantillons bruts traités aux doses de 0,7% et 7% d'urée deux types de populations bactériennes sont décelées. Elles diffèrent par leur évolution en nombre au cours du traitement (Fig. 1). En effet, dans un laps de temps de 30 min, la population bactérienne décroît (dans les deux

cas) mais de manière plus importante pour les échantillons traités au plus fort taux. Par la suite, pour les échantillons traités à la dose de 0,7%, la population bactérienne croît de manière continue et atteint un palier après un délai de 7 jours. On dénombre $5,8 \cdot 10^9$ bactéries par g de MS et la présence de mycélium. Par contre, avec les échantillons traités à la dose de 7%, après 3 jours de phase croissante jusqu'à $16 \cdot 10^7$ bactéries par g de MS, le nombre de bactéries régresse pour atteindre après 30 jours de traitement, des valeurs voisines de 80 000 bactéries par g de MS (Table 2).

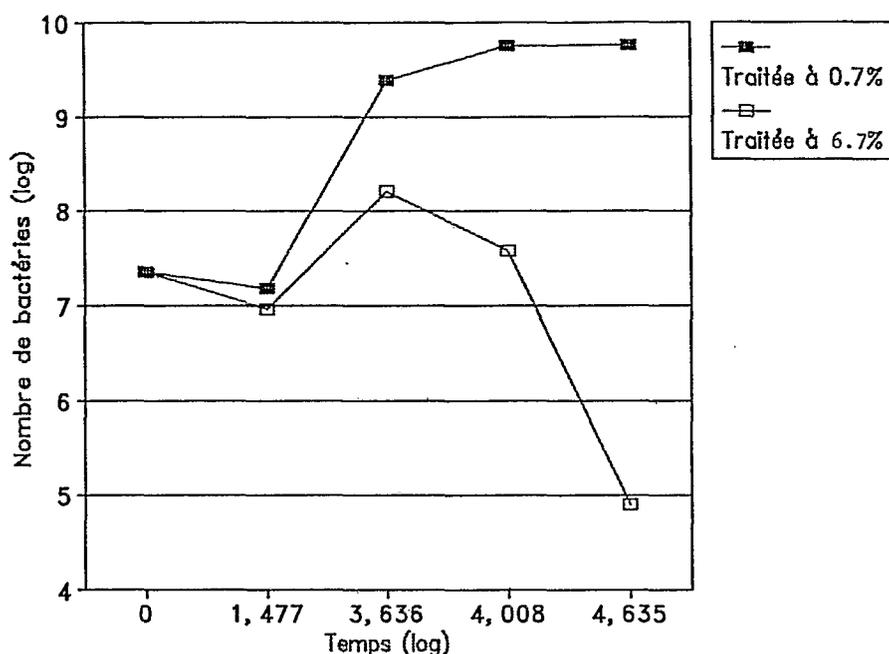


Fig. 1 Evolution de la population bactérienne de la paille traitée à l'urée aux doses de 0,7% et 6,7%. Echelle Log. Log.

L'utilisation de milieu de culture YMPG, non spécifique a permis d'identifier 11 colonies sur la paille avant traitement, classées de 1 à 11 en fonction de critères de couleur, de forme, de taille et de bordure (Table 3). Aucune de ces bactéries n'est capable de se développer sur milieu sans azote YCB (Table 4). Cinq souches (1-3-4-5-6) présentes sur la paille brute sont retrouvées sur les pailles traitées à 7% d'urée et sont donc tolérantes à la présence d'ammoniac. Cultivées sur milieu YCB + urée, les souches 1, 3, 4 et 6 expriment une activité uréasique. La souche 5, tolérante à l'ammoniac ne possède pas d'uréase. Elle s'est développée sur les pailles traitées à faible taux d'urée et représentait 35, 50 et 95% des colonies après respectivement 3, 7 et 30 jours de traitement.

Discussion

La présence initiale d'une population bactérienne plus abondante sur la paille de blé que sur la farine de soja pourrait être attribuée à une pollution d'origine tellurique différente. Les graines de soja sont protégées de cette pollution par la présence des gousses. Après un séjour de 48 h en milieu humide, l'évolution différente du nombre de bactéries entre les 2 supports pourrait s'expliquer par un apport en éléments nutritifs plus important avec la farine de soja.

Table 2. Cinétique d'uréolyse et évolution de la population bactérienne de la paille de blé brute, tyndallisée ou stérilisée. Humidité de la paille : 33%

Nature du support	Dose d'urée et nombre d'observations	Durée de traitement	Urée résiduelle (mg d'urée g ⁻¹ MS)	Population bactérienne x 10 ⁶ g ⁻¹ MS (6 observations)
Paille brute	0,7% MS n = 12	30 min	5,25 ± 0,40	15,01 ± 0,55
		3 jours	0,20 ± 0,03	2420 ± 265
		7 jours	0	5550 ± 550
		30 jours	0	5835 ± 590
	7% MS n = 12	30 min	53,26 ± 1,45	9,05 ± 0,78
		3 jours	37,02 ± 1,09	161 ± 35
		7 jours	4,36 ± 0,27	38,45 ± 2,80
		30 jours	0	0,08
Paille tyndallisée	6,7% MS n = 20	30 min	64,61 ± 8,96	0
		3 jours	65,44 ± 10,19	0
		4 jours	65,51 ± 3,02	Traces
		30 jours	58,12 ± 3,02	0
Paille stérilisée	6,7% MS n = 12	3 jours	59,63 ± 2,73	0
		7 jours	57,76 ± 3,02	0

La tyndallisation, méthode plus sélective que la stérilisation, aurait maintenu les uréases d'origine végétale de la farine de soja malgré une baisse du niveau d'activité initial (Zelter et Delort-Laval, 1971). La faible activité uréasique des pailles ne permet pas d'interpréter les résultats. Néanmoins, l'augmentation concomitante entre les stades 0 et 48 heures de la population microbienne et de l'activité uréasique suggère une activité d'origine bactérienne qui de plus est sensible au traitement de tyndallisation. Cette observation est en accord avec les résultats de Williams *et al.* (1984) et de Hassoun *et al.* (1990).

La stérilisation a bloqué toute activité uréasique. L'hydrolyse de l'urée a été un phénomène relativement rapide puisque 94% de l'apport avait disparu après 7 jours. Ce résultat est en accord avec ceux de Todorov (1982) et Tetlow (1983) avec les pailles, Henning *et al.* (1990) avec les foin humides. Par contre, Dias da Silva *et al.* (1988) et Chermiti *et al.* (1989) n'obtiennent 91% d'hydrolyse qu'après un délai de 30 jours.

L'hydrolyse résiduelle constatée avec les échantillons tyndallisés pourrait provenir des uréases non détruites par le traitement (Zelter et Delort-Laval, 1971). De même avec les pailles stérilisées cette faible hydrolyse pourrait être expliquée par une température de 120°C trop faible pour détruire totalement cette enzyme.

Table 3. Description des colonies de bactéries rencontrées sur la paille de blé non traitée

Caractéristiques physiques des colonies			Intensité de croissance sur milieu nutritif complet YMPG	Numéro d'identification
Couleur	Forme et Taille	Bordure		
Jaune	Convexe	Régulière	+++	1
Jaune	Bombue	Peu régulière	+++	2
Jaune	Diamètre < 1 mm		+++	3
Blanche	Bombue	Régulière	+++	4
Crème	Bombue	Régulière	+++	5
Transparente	Plate	Dentelée	+++	6
Transparente	Bombue	Peu régulière	++	7
Rose	Bombue	Peu régulière	+++	8
Orange	Bombue	Régulière	+++	9
Orange foncé	Bombue	Régulière	+++	10
Jaune brillant	Bombue	Régulière	+++	11

A la dose de 7% d'urée, l'ammoniac libéré a bien joué le rôle bactéricide et fongicide signalé par Knapp *et al.* (1974, 1975). Les échantillons traités présentent encore après une durée de 30 jours, une forte odeur d'ammoniac. A la faible dose de 0,7%, l'absence d'odeur du NH₃, la forte contamination bactérienne et fongique sont conformes aux résultats de Henning *et al.* (1990) qui signalent ces phénomènes pour les doses d'urée inférieures à 2,4% de la MS.

L'évolution de la population bactérienne totale, au cours du traitement à la dose de 7% est en accord avec les études réalisées en milieu non renouvelé de Monod (1942) et Larpent et Larpent-Gouraud (1975). Après une période de sélection par le produit

formé (ici NH_3) et de multiplication des bactéries, on assiste à une phase de régression liée à l'épuisement du substrat. Williams *et al.* (1984) ont bien montré que l'uréolyse est sous la dépendance de bactéries uréolytiques, mais, ils n'ont pas caractérisé ces populations comme nous avons pu le faire dans cet essai.

Conclusion

Les résidus ligneux récoltés après moisson possèdent une population bactérienne importante. Placés dans des conditions favorables au développement bactérien (température et humidité) sous l'action de l'urée apportée pour le traitement de ces résidus, il se produit une sélection et une prolifération des bactéries à propriétés uréasiques.

Table 4. Caractérisation des colonies bactériennes identifiées sur pailles non traitées ou traitées à l'urée. Colonies cultivées sur milieu complet (YMPG), déficient en urée YCB ou complétement en urée (YCB + urée). Fréquence de croissance : +++ très bonne ; ++ bonne ; + moyenne ; - nulle

Colonies identifiées sur paille YCB + urée non traité	Bactéries présentes sur paille traitée a 7% YMPG	Bactéries cultivées sur milieu YCB	Bactéries à caractère uréasique
1	+++	-	++
2		-	-
3	+++	-	++
4	+++	-	++
5	++	-	-
6	+++	-	+
7		-	+
8		-	+++
9		-	-
10		-	++
11		-	++

La rétrogradation totale et rapide de l'urée en ammoniac est ainsi possible.

Nous pensons donc qu'il est permis de réaliser des traitements à l'urée sans apport exogène d'uréases. Des études doivent être poursuivies sur les paramètres optimaux

de traitements : taux d'urée, humidité, durée de traitement, ainsi que sur les modifications biochimiques, la digestibilité et l'ingestibilité des produits ligneux traités.

Références

- CHERMITI, A., NEFZAOU, A., CORDESSE, R. (1989). Paramètres d'uréolyse et digestibilité de la paille traitée à l'urée. *Ann. Zootech.* 38 : 63-72.
- DIAS da SILVA, A.A., MASCARENHAS FERREIRA, A., GUEDES, C.V.M. (1988). Effects of moisture level, treatment time and soya bean addition on the nutritive value of urea-treated maize stover. *Anim. Feed Sci. Technol.* 19 : 67-77.
- HASSOUN, P., GEOFFROY, F., SAMINADIN, G., PRIOR, P., BERAMIS, M. (1990). Studies on the ammoniation of sugar-cane bagasse by urea. Effects of moisture, urea levels, urease source and treatment periods on composition, *in vitro* dry matter digestibility and evolution of ureolytic bacteria. *Anim. Feed Sci. Technol.* 29 : 113-129.
- HENNING, J.C., DOUGHERTY, C.T., O'LEARY, J., COLLINS, M. (1990). Urea for preservation of moist hay. *Anim. Feed Sci. Technol.* 31 : 193-204.
- JAYASURIYA, M.C.N., PEARCE, G.R. (1983). The effect of urease enzyme on treatment time and the nutritive value of straw treated with ammonia as urea. *Anim. Feed Sci. Technol.* 8 : 271-281.
- KNAPP, W.R., HOLT, D.A., LECHTENBERG, V.L. (1974). Anhydrous ammonia and propionic acid as hay preservatives. *Agron. J.* 66 : 823.
- KNAPP, W.R., HOLT, D.A., LECHTENBERG, V.L. (1975). Hay preservation and quality improvement by anhydrous ammonia treatment. *Agron. J.* 67 : 766.
- LARPENT, J.P., LARPENT-GOURGAUD, M. (1975). Mémento technique de microbiologie : la cellule bactérienne - Métabolisme - Systématique - Bactéries utiles - Milieux de cultures et réactifs. *Technique et Documentation*, Paris, 269 pp.
- MONOD, J. (1942). *Recherches sur la croissance des cultures bactériennes*. 2^e ed. Hermann, Paris, 210 pp.
- TETLOW, R.M. (1983). The effect of urea on the preservation and digestibility *in vitro* of perennial ryegrass. *Anim. Feed Sci. Technol.* 10 : 49-63.
- TODOROV, N.A. (1982). Ensiling waste roughage with urea to increase energy and protein value. *Nutr. Abst. Rev. Série B*, 53, no. 9.
- WILLIAMS, P.E.V., INNES, G.M., BREWER, A. (1984). Ammonia treatment of straw via the hydrolysis of urea. II. Additions of soya bean (urease), sodium hydroxide and molasses : effects on the digestibility of urea-treated straw. *Anim. Feed Sci.*

Technol. 11 : 115-124.

ZELTER, S.Z., DELORT-LAVAL, J. (1971). Traitement thermique et qualité des protéines du soja. II. Préparation des tourteaux en atelier expérimental et estimation de leur degré de cuisson au moyen de tests biochimiques. Ann. Zootech. 20 : 17-29.