

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la Recherche Scientifique
Centre Universitaire Belhadj Bouchaïb d'Ain-Temouchent



Faculté des Sciences
Département de Sciences de la Nature et de la Vie

Mémoire

Pour l'obtention du Diplôme de Master en sciences biologiques

Option : Microbiologie Appliquée

Présenté par :

Melle : ZENASNI Amina Hanane

Melle : YAHIAOUI Imane

Effet de quelques souches microbiennes sur la litière des volailles.

Encadrant :

Mr. CHERIF NADJIB

Devant le jury composé de :

President: Mr. MOUEDEN	MAA	C.U.B.B.A.T
Examineur : Mm MADANI	MAA	C.U.B.B.A.T
Encadrant: Mr. CHERIF NADJIB	MCB	C.U.B.B.A.T

ANNEE UNIVERSITAIRE : 2019-2020

Remerciement

Tout d'abord, nous tenons à remercier **ALLAH** le tout puissant et miséricordieux, de nous avoir donné la santé, la force, la volonté et la patience d'accomplir tout le long de nos études.

Ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait pas pu avoir le jour sans l'aide et l'encadrement de Mr **CHERIF NADJIB (MCB)**, nous le remercions très profondément pour la qualité de son encadrement exceptionnel, sa patience, sa rigueur et sa disponibilité durant notre préparation de mémoire. Aussi nous le remercions pour ses orientation en nous faisant profiter de son expérience, ses idées, ses conseils et de nous avoir encouragées.

Nous tenons à gratifier aussi les membres jury :
Mr. **MOUEDEN (MAA)** et Mm. **MADANI (MAA)** de l'honneur qu'ils me font en acceptant d'évaluer ce travail et de l'enrichir par leurs propositions et leurs conseils.

Mes plus sincères remerciement aux tous les personnes du laboratoire de microbiologie surtout **Mr. Tires** pour nous aidées par tous les moyens matériels et moralement.

Nous adressons les sincères sentiments de gratitude et de reconnaissance à toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicace

Merci dieu le tout miséricordieux, ton amour et tes grâce a mon égard m'ont donné la persévérance et le courage pour accomplir ce modeste travail.

Je dédie mon travail à :

A mes chères parents : pour leurs efforts, leurs sacrifices durant toute ma vie, leurs encouragements et pour persévérer jusqu'à l'aboutissement de ce travail. Qu'ils retrouvent dans ce travail, l'expression de ma reconnaissance, ma respecte, mon amour et tous mes sentiments les plus profonds pour vous deux.

A ma adorable sœur : ***IBTISSEM*** à ceux qui, quel que soient les termes embrassé, je n'arriverais jamais à leur exprimer mon amour sincère qui n'a pas cessé de me conseiller, encourager et soutenir tout au long de mes études. Que dieu la protégée et leur offre la chance et le bonheur.

A mes chers frères : ***Zakaria et Ilyess*** qui ont les plus chers a mon cœur.

A ma meilleure et belle amie : ***Fafa***

En souvenir de nos éclats de rire et des bons moments en souvenir de tout ce qu'on a vécu ensemble. J'espère de tout mon cœur que notre amitié durera éternellement. Je vous remercie beaucoup pour ma toujours ouvert tes bras et de leur encouragement avec ton amour pour achever ce travail.

Sans oublier mon binôme : ***AMINA*** pour son soutien moral, sa patience et compréhension tout au long de ce projet et je souhaite une bonne chance et succès.

Je termine cette dédicace à mon encadreur : **Mr Cherif Nadjib** et tous mes collègues de la promotion microbiologie pour les bons souvenirs et le beau temps que nous avons passé ensemble et vous souhaitent bonne chance dans vos vies.

Imane

Dédicace

C'est grâce à Allah que j'ai pu achever ce travail :

A mes très chers parents : et surtout ma mère pour leur bien vaillance et soutien durant tout mon cursus, dont je leur doit toute ma reconnaissance et mon respect

Mes très chères sœurs : Chaimaa et Fatima

Mes chères frères : Abdel Rahim et Mohamed.

A ma chère grande mère laquelle sa prière est le secret de ma réussite

A mes tantes et mes oncles, surtout ma tante habiba et la famille ZENASNI et BOUSLAMA.

On tient à remercier particulièrement mon encadreurs: **Mr. Cherif Nadjib** qui est à l'origine de ce travail, pour leurs aides et encouragements continus et efficaces qu'ils nous ont apportés et d'avoir permis ainsi la réalisation de ce travail.

Ma chère amie, mon binôme Iman, qui m'a supportée, durant ces cinq années avec qui j'ai trouvé l'entente dont j'avais besoin.

Mes chères cousines que je considère comme mes sœurs :

Siham, Soumia et surtout l'âme jumelle Farah qui mon Support dans ma carrière universitaires.

Mes Chers amis qui m'ont soutenu et n'ont jamais cessé de m'encourager Imene, widade, khadidja et chaima et à tous ceux qui m'ont aidée de loin et de près.

Amina Hanane

Table des matières

Liste d'abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction01

1^{ere} partie synthèse bibliographie

CHAPITRE 01 : Généralité sur la litière des volailles

I. Définition	02
II. Les différents types de litière	02
II.1. Copeau de bois.....	02
II.2. Sciure de bois	02
II.3. Paille de blé entière.....	02
II.4. Paille de blé hachée.....	02
II.5. Paille broyée, dépoussiérée, défibrée.....	03
II.6. Mariage copeau paille	03
II.7. Carton.....	03
III. Fonction de la litière	04
III.1. Isolation.....	04
III.2. Absorption de l'humidité	04
III.3. Zonage dans les bâtiments	04
III.4. Confort des animaux	05
IV. La composition de litière de volaille	05
IV.1. Nutriments Végétales.....	06
IV.2. Les oligo-éléments.....	06
IV.3. Charge microbienne.....	06

CHAPITRE 02 : Ecosystèmes microbiennes de la litière des volailles

I. Ecosystème de la litière	07
I.1. Biocénose de la litière.....	07
I.1.1. Population bactériennes générale.....	07
I.1.2. Anti bio-résistance	08
I.2. Evolution de la litière.....	09
II. Les facteurs liés à la variation de la qualité de litière.....	11
II.1. Facteur liés à l’ambiance intérieur	11
II.2. Facteur liée au sol.....	11
II.3. Facteur liée aux agents pathogènes	11
II.4. Facteur liée à l’aliment	12
II.5. Facteur liée à l’aménagement et équipement du bâtiment d’élevage.....	12
II.6. Facteur liée à la densité des animaux	12
III. Utilisation de litière de volaille	12
III.1. Source nutritif	12
III.2. Amendement de sol.....	13
III.3. Source de carbone	13
IV. Gestion de la litière.....	13
IV.1. Inoculation des litières avec des flores microbiennes	13
IV.2. Traitement chimique de la litière.....	14
V. Les conséquences de la dégradation de la litière.....	14
V.1. Conséquence sur la santé.....	14
V.2. Conséquence sur les performances de croissance	15

2^{ème} partie : Matériel et Méthode

I. Zones de prélèvement et échantillons.....	16
II. Isolement et purification	17
II.1. Préparation des dilutions.....	17
II.2. Ensemencement et purification	17
III. Identification des souches isolées	18
III.1. Identification macroscopique	18
III.2. Identification microscopique.....	19
III.2.1 Observation à l’état frais.....	19
III.2.1. Coloration de gram.....	19
IV. Ensemencement sur les milieux sélectifs	19

IV.1. Préparation de la gélose inclinées.....	20
V. Etude de l'interaction Litière – microorganismes	20
V.1. Préparation d'inoculum.....	20
V.2. La spectrophotométrie.....	21
V.3. Contamination de la litière	21
V.3.1. Préparation de la litière	21
V.3.2. Ensemencement de la litière par les souches isolées	21
• Dénombrement bactérienne de la litière après incubation	22
V.3.3. Ensemencement de litière contaminé par des souches à effet antibactérienne	23
• Dénombrement bactérienne de la litière après incubation	24

3^{eme} partie : Résultat et Discussion

I. Echantillonnage.....	25
II. Isolement des souches	25
III. Identification des souches isolées	26
III.1. Aspect macroscopique.....	26
III.2. Aspect microscopique	27
III.2.1. Coloration de gram	27
IV. Isolement sur les milieux sélectifs	28
V. Isolement et la purification par la méthode de trois cadrans.....	29
VI. L'effet des souches probiotiques et de <i>Bacilles</i> sur les microorganismes de litière	30
Discussion	31
Conclusion	36

Références bibliographique

Annexes

Résumés

Liste d'abréviations

°C : degré Celsius.

% : pour cent.

PH : potentiel d'Hydrogène.

G : gramme

Mm : millimètre

UL : microlitre

Nm : nanomètre

H : heure.

N : Azote

P : Phosphore

K : Potassium

Cu : Cuivre

Zn: Zinc

As Arsenic

Mg: Magnesium

S: Soufre

Co: Cobalt

Fe: Fer

I : Iode

Mn : Manganèse

Se : Sélénium

PCR : Polymérase Chain Réaction (Réaction de polymérisation en chaine).

ADN : Acide désoxyribonucléique.

BN : Bouillon nutritif

GN : Gélose nutritif

G+ : Gram positive

G- : Gram négative

CNS : Staphylocoques négatifs pour la coagulas

Pb : Paire de base

UFC : Unités formant colonies

Ppm : Patrie par million

ml : millilitre

Mg : Milligramme.

DO : densité optique

EMB : éosine bleu de méthylène.

C. perfringens : *Clostridium perfringens*

E. coli : *Escherichia coli*

S. aureus : *Staphylocoque aureus*

E. gallinarum : *Enterococcus gallinarum*

Spp : Espèce non précisée

Liste des Figures

Figure 01 : Quelques types de litière de volailles	03
Figure 02 : Sites de prélèvements willaya Tlemcen et willaya Ain Témouchent (Google Map).....	16
Figure 03 : La préparation des dilutions décimales à partir de la litière de volaille	17
Figure 04 : L'ensemencement des dilutions sur GN	18
Figure 05 : La purification et l'isolement des souches.....	18
Figure 06 : L'ensemencement en stries dans le milieu sélectif Chapman.....	19
Figure 07 : L'ensemencement en trois quadrants	20
Figure 08 : Le principe de mesure l'absorbance (DO)	21
Figure 09 : Préparation de dilutions à partir d'une nouvelle litière	22
Figure 10 : Schéma représente l'ensemencement en surface à partir de séries des dilutions	23
Figure 11 : Répartition des souches isolées à partir de prélèvement effectuée	26
Figure 12: Aspect macroscopique des trois souches isolées de différents sites de prélèvements	27
Figure 13 : Observation microscopique des souches pures après la coloration de gram ...	28
Figure 14 : Aspect macroscopique des souches purifiées à partir des milieux sélectifs	31

Liste des tableaux

Tableau 01 : Les différents types des échantillons, leurs âges et leurs régions	16
Tableau 02 : Présentation de codifications de différents échantillons prélevés et isolées .	26
Tableau 03 : Présentation de différent aspect macroscopique des colonies isolées.....	27
Tableau 04 : Présentation de différent aspect microscopique des colonies isolées	29
Tableau 05 :Description de l'observation macroscopique des colonies isolées sur les Milieux sélectifs	29
Tableau 06 : Pourcentage de différentes formes des bactéries présentant dans la litière...	35

Liste des tableaux dans l'annexe

Tableau 01 : Présentation de quelques aspects des colonies isolées à partir des échantillons de la litière de volaille sur GN	51
Tableau 02 : Les caractères cultureux et morphologiques des isolats de tous les échantillons la litière de volaille.....	52
Tableau 03 : L'aspect des colonies isolées par les milieux sélectifs	54
Tableau 04 : Résultats macroscopiques de l'ensemencement de trois cadrant	55

INTRODUCTION
GENERAL

Au début jusqu'au départ pour l'abattoir, la litière de volaille est employée pour l'accueillir des animaux, est une combinaison de fumier de poulet accumulé, de plumes et de litière, qui est généralement des copeaux de bois, de la sciure de bois, de la paille de blé, des coques d'arachide ou des coques de riz . Le type de litière utilisé dépend fortement des résidus agro-industriels disponibles dans la zone de production avicole (**Bernhardt et fascina 2009**). Ses particularités se déterminent par leurs propriétés des substrats utilisés pour l'élevage des volailles au cours de leur croissance qui sont exprimées dont : isolation du sol, recueil des déjections et l'absorption de l'eau (**Guinebert et pénaud 2005**). Le rôle principal de la litière est de garantir le confort thermique et physique des animaux par des matériaux de nature sèche et souple afin de limiter le développement des lésions au niveau des pattes et bréchet (**ITAVI, 2009**).

Les litières des volailles sont des écosystèmes dynamiques qui hébergent une très grande diversité microbienne évoluant pendant la phase d'élevage de nombreux organismes pathogènes pour l'homme ou les animaux, varie selon l'espèce des volailles élevées et le type de substrats utilisés. La population microbienne des litières des volailles est composée des moisissures, d'algues et des bactéries hétérotrophes aérobies (bactéries acidophiles, actinomycètes et bactéries aérobies sporulées) (**Gupta et al, 2004**).

Les modifications physico-chimiques de la litière par les fermentations microbiennes, soumettent les volailles aux émissions gazeux en particulier l'ammoniac pouvant provoquer des **Kérato-conjonctivites**, des affections respiratoires, une immunodépression, par ailleurs, le contact permanent par les pattes et le corps avec la litière est l'un des facteurs qui peuvent avoir une influence sur les performances de l'exploitation (**Guinbert et Pénaud, 2005**).

Ce travail il s'agit d'un isolement de la population bactérienne de la litière à partir des différentes régions de la wilaya d'Ain-Temouchent et étudier l'effet de l'inoculation d'une flore à effet antibactérienne sur cette population isolée.

Synthèse

bibliographie

I. Définition :

La litière est définie comme un lit de paille ou d'autres matières végétales, absorbants, isolants et souples (Adama Faye, 2011).

La litière est un support composé de matières absorbantes qui sert à recueillir les excréments et d'assurer l'absorption de l'humidité des fientes. La litière dans l'élevage a pour rôle principale de garantir le confort thermique et physique des animaux par des matériaux de nature sèche et souple afin de limiter le développement des lésions au niveau des pattes et bréchets et ne doit pas être trop fermentescible pour éviter le dégagement d'ammoniac. Leurs caractéristiques ont un rôle important dans les performances des animaux, la qualité de l'air et le travail d'éleveurs (ITAVI, 2009).

II. Les différents types de la litière :

II.1. Le copeau de bois : C'est une litière à base d'un substrat végétal, composée par des morceaux de bois. Elle se caractérise par l'absence de moisissures et une capacité d'absorption supérieure à la paille et constituer un bon isolant thermique et confortable aux animaux. La présence d'une litière trop fine, entrainera la formation de poussière, ce qui perturbera le système respiratoire, l'épandage de fumier de litière peut acidifier le sol et la décomposition devenue lente (Justine Yawavi SANNI, 2014).

II.2. La sciure de bois : C'est un résidu provenant du sciage du bois. Il se présente presque sous forme de poudre. On le trouve principalement et en quantité assez importante au niveau de grandes scieries. Elle peut provoquer la formation des croutes et des problèmes de conservation de l'humidité absorbée et la formation des poussières (Marie Chantal NYIRAMAFARANGA, 2012).

II.3. La Paille de blé entière : Elle est facilement employée directement dans les bâtiments sans passé au traitement mécaniques. Afin d'éviter certaines affections respiratoires comme l'aspergillose, elle devra sèche, sans foin est dépoussiérée.

II.4. La Paille de blé hachée : C'est un produit souple, préparé par un traitement mécanique à l'extérieur de bâtiment à cause de poussière.

II.5. La Paille broyée, dépoussiérée, défibrée : Le broyage a pour but d'éclater les rigides tiges de paille. Cette litière se caractérise par l'augmentation de pouvoir de rétention d'eau.

II.6. Le mariage coupeau-paille : Le mariage des deux matériaux ralentit ou évite la formation de la couche déjections-litière quasi imperméable à l'air et à l'eau, avec en dessous une sous-litière impeccable mais inutilisée (Adama Faye, 2011).

II.7. Le carton : C'est une matière constituée de plusieurs couches de papier collé, pouvant être ondulé, formée d'une couche cannelée entre deux couches planes. Des vieux papiers déchiquetés sont utilisables comme litière pour animaux, ou comme matériaux d'isolation dans le bâtiment (Adama Faye, 2011).



Copeaux de bois

Source :maguin.com



Scuire de bois

Source :magiun.com



Paille hachée

Source: picasawe.google.com



Paille entière

Source: terresacree.org

Figure 01 : Quelques types de litière de volailles.

III. Les fonctions de la litière :

Durant toute la période d'élevage, le résultat final est très conditionné par l'état de la litière, le reflet de la bonne conduite du bâtiment et l'état sanitaire des volailles. Les fonctions de la litière sont multiples :

III.1. Isolation :

Les animaux élevés sur le sol sont isolés thermiquement par la litière, minimisé les pertes par conduction principalement à partir des pattes et probablement du bréchet, tant qu'ils ne sont pas complètement emplumé ou lorsque ces parties anatomiques sont souillées ou lésées. Le déplacement ou repoussement des volailles sur une litière humide peut excrétée une grande quantité de chaleur par les pattes et le bréchet, qui entraînent un refroidissement important à ce niveau. Donc la qualité de la litière peut modifier la température critique des volailles et augmenter jusqu'à 5 ou 6°C (**Anne Baltazart, 2010**).

III.2. Absorption de l'humidité :

La litière joue un rôle « absorbant d'humidité » qui doit récupérer par la suite, lorsque la ventilation est insuffisante, l'air circulant ne peut plus absorber l'excès de l'humidité (**Anne Baltazart, 2010**).

III.3. Zonage des bâtiments :

Dans l'intérieur d'un bâtiment d'élevage, il existe plusieurs zones qui se distinguent par leur aspect et leur teneur en humidité (**Justine Yawavi SANNI, 2014**) :

La zone « **abreuvoir** » est caractérisés par sa forte teneur en humidité, surtout si les abreuvoirs fuient ou ne sont pas équipés de récupérateurs. Aussi la zone « **mangeoire** » est relativement humide car elle est généralement beaucoup plus chargée en déjection, on y trouve des particules alimentaires et la zone « **dortoir** » est la plus sèche de tout le bâtiment.

III.3.1.Zones humides :

Ces endroits des bâtiments des animaux que l'on dénombre le plus d'individus est principalement présentant des anomalies de type ampoules ou pustules. Les pertes thermiques par conduction (pattes et bréchet) présentent une grande importance et affectent la physiologie des animaux (thermorégulation) ainsi que sur leurs performances zootechniques (efficacité alimentaire) (Anne **BALTAZART, 2010**).

III.3.2.Zones sèches :

Dans la zone « dortoir », les endroits secs, souples et même chauds sont naturellement recherchés par les volailles sauf par les fortes chaleurs. Cependant, les litières chaudes peuvent avoir un défaut dans la production d'ammoniac (**Justine Yawavi SANNI, 2014**).

III.4.Assurer le confort des animaux :

Un confort thermique des animaux lié à la qualité de la litière afin d'éviter l'apparition de lésions. Ces derniers peuvent survenir lorsque les animaux restent au contact d'un sol trop dur, croûte et trop froid (**ITAVI, 2009**).

IV.Composition de la litière des volailles :

Les principaux composants de litière des volailles comprennent les matériaux de litière, la plume, fumier et les aliments renversées (**Kelley et al ,1996 Tasistro et al, 2004**). La litière contient des nutriments végétaux, tel que **N, P, K**, des oligo-éléments comme **Cu, Zn, As**, résidus de pesticides des produits tel que les coccidiostatiques, les perturbateurs endocriniens et des microorganismes. Comme pour les autres déchets organiques, la teneur en humidité, pH, le niveau de sel soluble et la composition élémentaires de fumier et de litière varient considérablement en fonction de type des volailles, régime et compléments alimentaire, type de litière et les opérations de manipulation de stockage.

IV.1. Les nutriments végétaux :

Les principaux nutriments de plantes dans le fumier de volailles sont le azote (N), phosphore (P), potassium (K), cuivre (Cu) magnésium(Mg) et le soufre (S). Certaines études sur la composition chimique de fumier de litière montrent une énorme variabilité de concentration en nutriment qui peut être attribué à certains nombre de facteurs notamment l'utilisation dans aliments, matériels de litière et aussi les pratiques de gestion de litière. Le teneur total en Net P des fumiers sont le plus élevées des amendements organiques, y compris les fumiers et le composte, par contre la litière de volailles a un teneur plus faible par rapport aux fumiers frais, ce qu'est attribuées à la fois aux pertes, produisant après l'excrétion du fumier et à l'effet de dilution résultant de la combinaison de fumier avec des litières pauvre en nutriments. L'utilisation de fumier de volaille comme amendement du sol pour les cultures agricoles fournira des quantités appréciables de nutriments essentiels pour les plantes. (Bolan et al, 2010).

IV.2. Les oligo-éléments :

Les oligo-éléments dans la litière de volailles proviennent principalement de leur alimentation et indirectement lors de la collecte de fumier, y compris **As, Co, Cu, Fe, I, Mn, Se, et Zn**. Certains nombres de ces éléments sont ajoutés aux aliments non seulement en tant que nutriment essentiel mais également comme supplément pour améliorer l'état de santé. Les éléments nutritifs essentiels participent aux processus enzymatiques impliquent de nombreuses fonctions physiologiques et de métabolismes intermédiaires de l'organisme des volailles. Ces éléments traces ne peuvent être éliminés sans pertes d'activités, et non pas remplacé par un autre élément (Bolan et al, 2010).

IV.3. La charge microbienne :

Le fumier de volaille contient une large population diversifiée de virus, bactéries, champignons et des protozoaires. Les concentrations microbiennes dans la litière de volailles peuvent dépassées 10^{10} cellules par gram (Acosta-Martinez and Harmel, 2006, Cook et al, 2008, Roth rock et al, 2008a), les bactéries gram positive : *Actinomycètes*, *Clostridies*, *Eubacterium*, *Bacille* et *Lactobacille* présentent 90% de la diversité microbienne (Lu et al, 2003, Enticknap et al, 2006, Lovanh et al 2007).

I.L'écossystème de la litière :

I.1. Biocénose de la litière

Les litières des volailles sont des écosystèmes dynamiques qui évoluent pendant la phase d'élevage de nombreux organismes pathogènes pour l'homme ou les animaux. La population microbienne des litières des volailles est composée de moisissures, d'algues et de bactéries hétérotrophes aérobies (bactéries acidophiles, actinomycètes et bactéries aérobies sporulées) (Gupta *et al*, 2004).

I.1.1 Population bactérienne générale :

Les litières hébergent une très grande diversité bactérienne, varie selon l'espèce de volailles élevées et le type de substrats utilisés.

Le développement de la PCR a permis de détecter et d'identifier de nombreuses bactéries non mises en évidence par des techniques classiques culturales. Les bactéries gram positives constituent plus de 80 % de la communauté bactérienne de la litière par rapport aux *Enterobacteriaceae* qui représentent moins de 2 % de cette biocénose (NANDI *et al*, 2004).

Abebe Eyasu *et al* (2014) ont étudié la flore bactérienne de la litière de poulet de chair à partir de l'isolement de quarante échantillons en utilisant les méthodes de mise en culture et l'identification sur la base de leur morphologie par la coloration de gram et aussi les tests biochimiques. Les bactéries Gram négatives sont plus fréquentes (67,3%) que les bactéries Gram positives (32,5%). Les organismes isolés ayant une influence sur la santé publique comprennent *E. coli*, *S. aureus*, *Proteus Klebsiella*, *Serratia*, *Enterobacter*, *Aérogènes*, *staphylococcus* à coagulas négative (CNS), *Citrobacter*.

Il existe néanmoins des variations de la composition de la flore bactérienne en fonction des types de productions des volailles, Omeira *et al.* (2006) ont comparés les propriétés microbiologiques de la litière générées par les poules pondeuses et les poulets de chair élevés dans des systèmes de production intensive ou en plein air. L'analyse microbiologique consistait en une numération des bactéries totales, des coliformes totaux, des espèces de staphylocoques, de *Salmonella* et de *Clostridie perfringens*.

La litière des poules pondeuses élevées présentait un comptage **bactérien total** plus faible que celle des poulets de chair indépendamment du système d'élevage choisi. La litière des pondeuses élevées en conditions intensives avait les plus faibles numérations en moyenne de **coliformes totaux** alors que le plus faible comptage en **espèces de Staphylocoques** était observé

dans la litière des poules de plein air. Les comptages de *C. perfringens* étaient minimums pour les volailles élevées de manière intensive et quel que soit le type de production.

I.1.2 Anti bio-résistance :

L'utilisation systématique et à large échelle des antibiotiques dans la production des volailles conduit à l'apparition de bactéries anti bio-résistantes. Une grande variété d'antibiotiques est couramment ajoutée aux aliments des animaux à des doses sous thérapeutiques pour favoriser la croissance et pour la prévention contre les maladies chez les animaux destinés à la consommation humaine. Selon les études, les bactéries sont porteuses d'un ou plusieurs gènes de résistance, ce qui diminue l'arsenal thérapeutique utilisable chez les humains et les animaux atteints de maladies causées par ces bactéries. La présence de bactéries résistantes aux antimicrobiens dans la production primaire représente un risque élevé pour les humains puisque les bactéries anti bio-résistantes d'origine animale peuvent être transmises des animaux à l'homme par l'approvisionnement alimentaire, l'eau ou par contact direct (Marchandai M et al, 2006 ; JA Funk et al, 2006).

Abebe Eyasu et al, (2014) ont testés la sensibilité de la population bactérienne de la litière après leur isolement. Tous les isolats bactériens montrent une résistance à la plupart des antibiotiques testés. Une haute résistance aux antimicrobiens a été observée contre l'ampicilline, la pénicilline, la tétracycline, érythromycine, alors, une faible résistance aux antimicrobiens a été observée pour Kanamycine, Ciprofloxacilin, et chloramphénicol. Aucune résistance n'a été observée pour la vancomycine et la méthicilline.

Khan et al, (2005) ont tenté d'identifier plus précisément les souches multi-résistantes d'*Enterococcus spp*, par leurs marqueurs de résistance et de virulence. La plupart des isolats étaient multi-résistants (vancomycine, gentamicine, streptomycine, tétracycline, érythromycine, bacitracine, kanamycine, acide nalidixique) et sensibles à la ciprofloxacine, au sulfaméthoxazole, au chloramphénicol, à l'ampicilline et à l'ofloxacine. Des tentatives d'amplification partielle des séquences de gènes ont été faites pour détecter les marqueurs de résistance à la vancomycine *vanA* (734 paires de bases), *vanB* (420 Pb), *vanC1* (531 Pb) et *vanC2-C3* (673 Pb) ; les marqueurs de virulence *cylA* (427 Pb) et *cylB* (225 Pb) pour la cytolysine entérococcique et la protéine de surface de formation de biofilm (*Esp*). Des essais individuels et multiplex de PCR ciblant les marqueurs de résistance à la vancomycine ont mis en évidence le gène *vanC1* dans 22 souches d'*E. Gallinarum*.

I.2 Evolution de litière :

La litière subit des transformations ou des modifications de la composition physique et microbienne après son installation dans les bâtiments d'élevage :

I.2.1 Evolution physico-chimique :

I.2.1.1. L'humidité :

L'eau des déjections animales et l'eau de boissons sont l'origine de l'humidité de litière qui est favorable à la croissance des moisissures et des oocytes de coccidies, ce qui conduit à une production accrue d'ammoniac dans le poulailler, ce dernier peut provoquer des affections respiratoires, une immunosuppression (**Adam Faye, 2011**).

I.2.1.2. Les composés azotés :

Dans les bâtiments d'élevage, l'azote se volatilise suivant les phénomènes de la fermentation aérobie et une moindre proportion anaérobie. Ces fermentations subissent une transformation de l'azote organique en ammonium puis en gaz ammoniac, et par l'effet de la manipulation des produits au moment de la reprise, de mouvement des animaux et l'humidité, contribuent à des pertes d'azote sous forme gazeuse.

En premiers jours, la production d'ammoniac sera lente dans les nouveaux bâtiments, mais à la proximité de 20 jours, le pH augmente, ce qui favorise la production d'ammoniac et la prolifération bactérienne (**Adam Faye, 2011**). Par l'apport de déjection animale et sous l'activité microbienne, la litière se caractérise par un fort teneur en composés azotés plus dégradables, par contre en début d'élevage l'azote insolubles sont disponibles (**Guinebert et Penaud Jean, 2005**).

I.2.1.3 Pourcentage en matière sèche :

Une litière neuve est définie par un taux très élevé en matière sèche supérieur à 80%, riche en source de carbone et l'absence d'azote soluble. Ces propriétés sont modifiées par la présence des déjections des animaux qui devenue siège de nombreux réactions biologiques. L'azote est présent sous forme dégradable caractérisé par sa solubilité passe sous forme d'ammoniac sous l'effet de la basicité de litière (**Guinebert et Pénaud, 2005**).

I.2.2 Evolution microbiologique :

I.2.2.1 Les bactéries :

Durant l'élevage, la présence des microorganismes est assurée par les déjections animales qui apportent une flore très variée mais le plus abondant est de type anaérobie strict qui ne pourra se développer dans les conditions aérobies de la surface de litière. Seules les bactéries de type anaérobies facultatives pourront y proliférer. Les pailles, les copeaux et les sciures sont très peu charger par les microorganismes.

L'activité métabolique des bactéries «anaérobies facultatives» permet aux bactéries «aérobies» de trouver un milieu adéquat pour leur prolifération, *Bacillus pasteurii* qui aboutit à la libération des acides gras volatiles, de grandes quantités d'ammoniac, de composés soufrés, et de phénols provenant de la décomposition des acides aminés et des fibres végétaux. Dans le cas de litière réalisée avec des matériaux mal conservés, la dégradation initiale due au stockage défectueux vient renforcer la rapidité d'implantation et le développement des microorganismes au sein de litière ce qui provoque sa destruction (**GUINBERT et PENAUD, 2005**).

L'accumulation progressive des fientes sur la litière favorise la prolifération de la flore bactérienne qui passe progressivement d'une concentration 10^4 UFC /g dans la litière propre à 10^8 UFC/g dans le fumier. Les entérobactéries et les coliformes subissent une évolution encore plus importante puisque leur nombre peut être multiplié par un facteur 10^5 à 10^6 .

Dans le même temps, la disparition de la flore anaérobie stricte présente dans la matière fécale intestinale des animaux est remplacée dans la litière, par une flore aérobie-anaérobie facultative opportuniste (**GUINEBERT et PENAUD, 2005**).

I.2.2.2 Les parasites :

Les litières sont un milieu favorable au cycle parasitaire des coccidies, assuré par la présence de protozoaires, parasites de genre *Eimeria*, par l'ingestion des oocystes sporulées. Les conditions favorables à leur sporulation sont l'humidité et la chaleur, en présence d'oxygène, lesquelles sont réunies dans la litière qui ne constitue cependant pas le milieu idéal à la survie prolongée des oocystes. Après cinq jours dans la litière, environ 95% des oocystes d'*Eimeria acervulinase* sporulent, mais jusqu'à 70% d'entre eux sont endommagés probablement sous l'action des bactéries ou de l'ammonium (**Marie Chantal NYIRAMAFARANGA, 2012**).

II. Facteurs de variation de la qualité de la litière :

II.1. Facteurs liés à l'ambiance intérieure :

II.1.1. La ventilation :

La ventilation permet d'assurer le renouvellement d'air dans le bâtiment, ce qui facilite l'évacuation d'une humidité ambiante et d'obtenir une litière sèche (moins de 20% d'humidité). La ventilation a pour objectif de contrôler le taux d'ammoniac dans le bâtiment, qui doit rester inférieur à 15 ppm.

La circulation d'air à grande échelle peut influencer sur les échanges thermiques entre l'air, sol et l'animal, et peut provoquer les diarrhées chez les jeunes sujets et perturbera le processus de l'humidification de litière et sa détérioration (**Justine Yawavi SANNI, 2014**).

II.1.2. La température :

La température représente un facteur majeur pour la performance et le confort des animaux. La présence d'une température ambiante permet d'obtenir une litière sèche par le pouvoir d'absorption plus élevés de l'air. Les effets d'une température insuffisante se définissent par un risque de dégradation locale de la litière, salissure du plumage des animaux et apparition de fientes semi-liquides et brillantes (**Justine Yawavi SANNI, 2014**).

II.2. Les facteurs liés au sol :

Le type de sol présent sous la litière a un effet majeur, cependant le sol imperméable provoque une augmentation de la production d'ammoniac et humidification accrue des litières par un phénomène de condensation au niveau du sol, et aussi un affaiblissement de l'état de santé des animaux (**ITAVI, 1997**).

II.3. Facteurs liés aux agents pathogènes :

La présence d'une infection microbienne ou virale est l'origine de la présence des agents pathogènes qui peuvent atteindre la paroi intestinale ce qui provoque des dérèglements digestifs qui se traduisent principalement par des entérites, dont les troubles digestifs sont l'origine de la détérioration de litière. Ces infections microbiennes peuvent parvenir soit de sol, des germes portées par la litière elle-même ou les poussins ou bien par la mauvaise désinfection des bâtiments et l'alimentation (**ITAVI, 1997**).

II.4. Facteurs liés à l'alimentation :

La qualité de matière première de l'aliment peut entraîner des perturbations physiologiques chez les animaux, dont l'augmentation de l'humidité des litières. Ces facteurs peuvent augmenter les rejets azotés et la consommation en eau par les animaux ce qui augmente le teneur en eau dans les excréments (ITAVI, 1997).

II.5. Facteurs liés à l'aménagement et l'équipement du bâtiment :

Les équipements de bâtiment doivent être bien aménagés et disposer pour éviter l'entrée d'eau dans le sol afin d'assurer un séchage plus rapide des fientes, le dégagement d'ammoniac et limiter la formation des crottes (Justine Yawavi SANNI, 2014).

II.6. Facteurs liés à la densité des animaux :

La présence des densités élevées des volailles dans le bâtiment d'élevage rendent plus difficiles l'entretien et la bonne conservation de la litière. Les risques se situent à partir de 21 poulets/m² (ITAVI, 1997).

III. Utilisations de la litière de volaille :

III.1. Source de nutriments :

La litière de volaille est souvent utilisée comme source nutritifs organiques dans la production de fourrage, des céréales et des fibres. L'ajout de cette matière à la fétuque élevée, à l'herbe de verger et à l'herbe des Bermudes a été montré l'augmentation de la production de matière sèche (Sims et Wolf, 1994 ; McGrath et al, 2009). Dans certains cas de production de fourragères, si la quantité de N appliquée était supérieure à la quantité recommandée entraîne une contamination des eaux souterrains et de surface par lessivage de surface (Sharpley et al, 2007). Une application excessive peut entraîner des effets indésirables sur les cultures fourragères (Bolan et al, 2010). Aux Etats-Unis, des études des engrais avec du coton ont montré que la litière de volaille est une source précieuse de substances nutritives pour les plantes qui fournissant du N et des métaux Fe, Cu, Zn et Mn (Tewolde et al, 2005).

III.2. Amendement de sol :

La culture continue des sols arables entraîne la détérioration de la structure du sol conduisant à une diminution des rendements. **Bolan et al, 1992** ont étudié les effets du fumier de volaille sur la fertilité physique du sol cultivé et la croissance des cultures de maïs, après cette expérience, les résultats obtenus indiquent que l'ajout de fumier de volaille améliore et augmente ces dernières. Les produits de compost, y compris la litière de volaille, sont utilisés couramment comme matériau de paillage pour les cultures agricoles et horticoles afin de conserver l'humidité du sol et de protéger les racines en surface de séchage pendant les périodes d'été (**Eneji et al, 2008 ; Agbede and Ojeniyi, 2009**).

III.3. Source de carbone :

La litière de volaille peut être brûlée directement comme source de carbone pour la production d'énergie thermique. L'un des problèmes liés à l'utilisation de litière de volaille comme source de carburant est sa teneur en humidité relativement élevée. Alternativement, la digestion anaérobie des déchets de volaille donne le biogaz, un gaz combustible qui peut être utilisé comme source d'énergie pour la combustion sous forme de chaleur (**Bolan et al, 2010**).

IV. Gestion de la litière :

IV.1. Inoculation des litières avec des flores microbiennes :

Guinebert et Pénaud en **2005** ont montré l'intérêt de l'apport d'une flore spécifique BACTIVORND dans cinq poulaillers des dindes. Cet inoculum constitué des souches de *Bacillus subtilis* sélectionnées, a une aptitude à se multiplier, d'orienter le développement microbien et de modifier les processus de dégradation de la matière organique, sous son influence pour aboutir une maturation bénéfique. La compétition bactérienne entretenue par ces apports entraînait la réduction des entérobactéries et des coliformes dans la litière et la réduction des pertes d'azote. Ce travail permet de conclure sur les perspectives intéressantes apportées par le contrôle microbiologique de la litière pour répondre aux exigences de protection de l'environnement.

Une autre étude réalisée par **Allain et Aubert** (2009) a pour objectif de mesurer les effets de l'ensemencement d'une litière de poulets de chair en début de bande par un complexe de micro-organismes en termes de pertes gazeuses, de compostage et d'assainissement. Les résultats obtenus montrent une réduction de plus de 80 % des pertes d'azote sous forme ammoniacale en bâtiment, un bon assainissement et un bon compostage (augmentation de 40 % de l'azote organique).

IV.2. Traitements chimiques de la litière :

Le contrôle chimique de la production d'ammoniac s'effectue par une inhibition de la croissance des micro-organismes qui décomposent l'acide urique ou par la neutralisation de l'ammoniac relâché. Maintenir la litière à un pH faible de 6 qui inhibe la croissance des bactéries urolytiques et augmente cette capacité de maintenir l'ammoniac à une faible concentration dans le bâtiment (**Marie Chantal NYIRAMAFARANGA, 2012**).

Le superphosphate et l'acide phosphorique sont utilisés comme inhibiteurs de la croissance microbienne. Ces produits présentent l'avantage d'être peu chers et facilement disponibles.

a. Le superphosphate : a une action asséchante sur la litière. Leur utilisation est bihebdomadaire aux doses de 100 à 200 mg/m² s'avère intéressante. Ce produit ne demeure actif que pendant 5 jours environ.

b. L'acide phosphorique : à une capacité de réduire la production d'ammoniac par son action acidifiante.

c. La chaux : agent alcalin, a un effet bactéricide et bloquer la fermentation par son pH de 9 À 11(**ITAVI, 1997b**).

V. Les Conséquences de la dégradation de litière :

V.1. Conséquence sur la santé :

V.1.1. Atteintes locomotrices :

Une litière détériorée a des conséquences directes sur l'appareil locomoteur des animaux (boiteries) avec des impacts sur la croissance des animaux et la qualité des carcasses (augmentation du taux de saisie, diminution du rendement de découpe, lésions du bréchet) (**ITAVI, 1997a, b**).

V.1.2. Atteintes respiratoires :

Une litière hachée trop finement et /ou broyée à l'intérieur du bâtiment d'élevage génère des poussières volatiles favorisant l'apparition de maladies respiratoires et vectrices de nombreux micro-organismes à tropismes variés (**Justine Awami SANNI, 2014**). Une forte teneur en ammoniac peut avoir une influence directe sur la santé des animaux. Ce gaz agit directement sur l'appareil respiratoire ou comme facteur prédisposant à une maladie respiratoire chronique. Il provoque en particulier une irritation des voies respiratoires supérieures et augmente la production de mucus (**Justine Yawavi SANNI, 2014**).

V.2. Conséquences sur les performances de croissance :

En présence d'une litière dégradée, les animaux peuvent présenter une diminution de leurs performances zootechniques, voir développer une pathologie. Une réduction de l'appétit et un retard de croissance chez les jeunes animaux sont observés dès l'exposition à une concentration de 50 ppm d'ammoniac. De plus, une litière de mauvaise qualité, mal préparée, constitue un milieu idéal pour divers agents pathogènes de toutes natures (virus, bactéries, champignons et autres parasites) surtout les coccidies qui peuvent être à l'origine d'une diminution du poids vif chez l'adulte et d'une baisse de croissance chez le jeune poulet (**Justine Yawavi SANNI, 2014**).

En conclusion la litière utilisée en élevage a pour rôle principal d'assurer le confort des animaux par l'isolation thermique, l'absorption de l'humidité et la prévention des pathologies. Elle intervient également sur le comportement animal et joue un rôle important sur les performances des animaux, la qualité de l'air et le travail de l'éleveur.

MATERIELS ET METHODES

I. Zones de prélèvement :

Cinq échantillons de litière des volailles de différents types ont été prélevés selon la procédure microbiologique standard dans des régions de la willaya d'Ain Témouchent [Hassasna, Hammam Bouhadjar, Oued Berkeche] et la willaya TLEMEN au mois de février 2020 (**Tableau 01**). Les zones d'étude ont été choisies sur la base de l'état de bâtiments, l'âge, L'odeur, et l'humidité de litière.

Environ 10g de chaque échantillon ont été prélevés à l'aide d'une spatule stérile dans des contenants stériles (papier aluminium) et immédiatement transportés au laboratoire de microbiologie de centre universitaire d'Ain Témouchent.

Tableau 01 : Les différents types des échantillons, leurs âges et leurs régions

Echantillons	Leurs âges	Type de litière	La région
01	30 jours	Paillez	Remchi
02	10 jours	Paillez	Remchi
03	32 jours	Copeaux de bois	Hammam Bouhadjar
04	38 jours	Paillez	Hassasna
05	40 jours	Paillez	Oued Berkeche

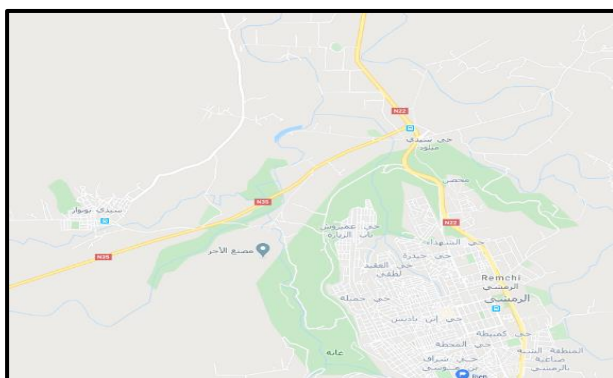


Figure 02 : Sites de prélèvements : willaya Tlemcen et willaya Ain Témouchant (Google Map).

II. Isolement et purification :

II.1. Préparation des dilutions et isolement :

Dans un flacon stérile de 250 ml, une pesée de 10 g de litière de chaque échantillon est diluée dans un volume de 100 ml d'eau physiologique stérile, homogénéiser et agiter pendant 5 minutes puis laisser à se précipiter pour obtenir deux phases, le surnageant et le culot. Ensuite, un volume de 1 ml du surnageant récupéré à l'aide d'une micropipette de 1000 μ l, est ajouté à 9 ml d'eau physiologique stérile et agité afin d'obtenir une dilution décimale de 10^{-1} . Des dilutions successives (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} et 10^{-6}) ont été préparées par la suite (**Figure 03**).

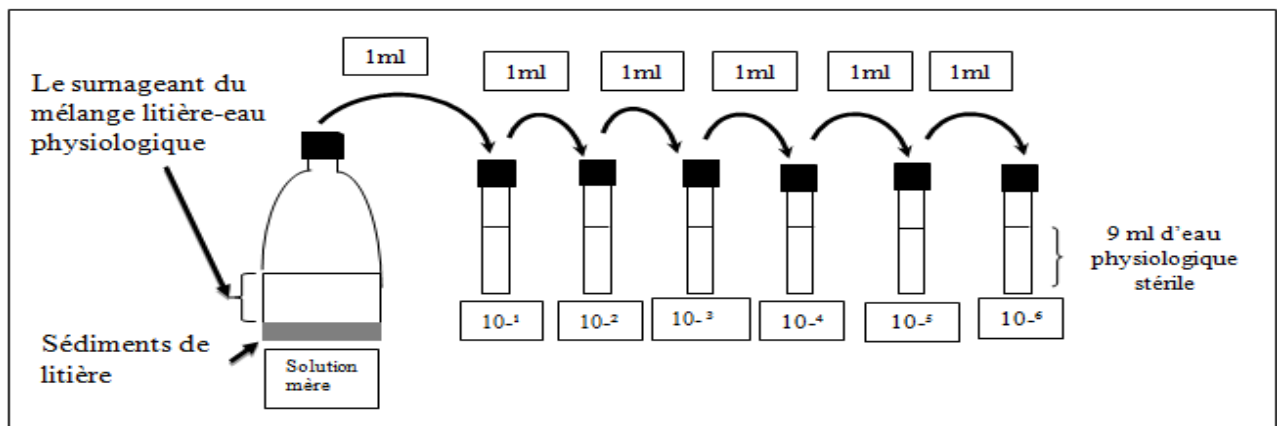


Figure 03 : La préparation des dilutions décimales à partir de la litière.

II. 2. Ensemencement et purification :

L'ensemencement en surface est réalisé par l'étalement d'un volume de 0,1 ml de chaque dilution sur une boîte de Pétri contenant la gélose nutritive à l'aide d'un râteau stérile en verre. Les boîtes sont étiquetées par la date et le numéro de l'échantillon puis incubées à une température de 30°C pendant 24 h à 48 h.

Les observations macroscopiques des colonies obtenues ont été effectuées afin de déterminer leurs formes, couleurs, tailles et autres caractéristiques morphologiques. Ensuite, les colonies sont purifiées par des repiquages successifs sur la GN (ensemencement en strie), incubées à une température 30°C pendant 24 h (**Figure 04**).

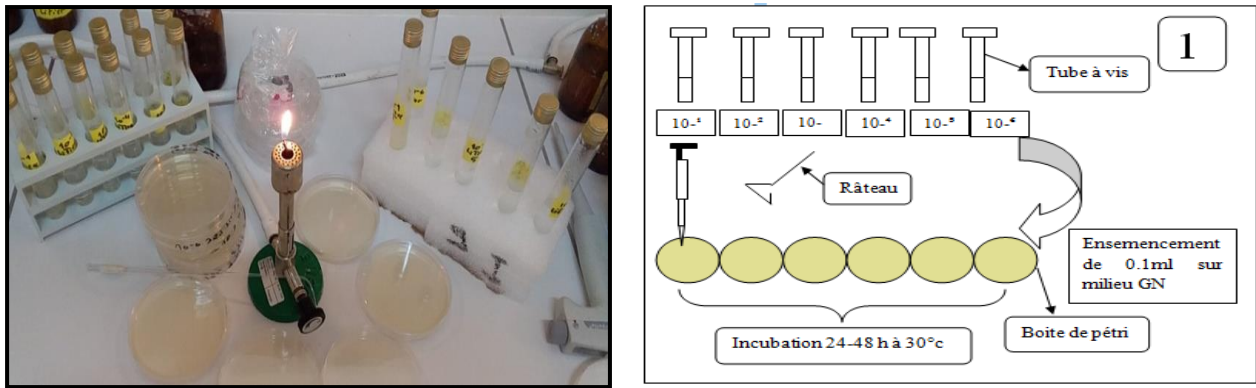


Figure 04 : L'ensemencement des dilutions sur la gélose nutritive.

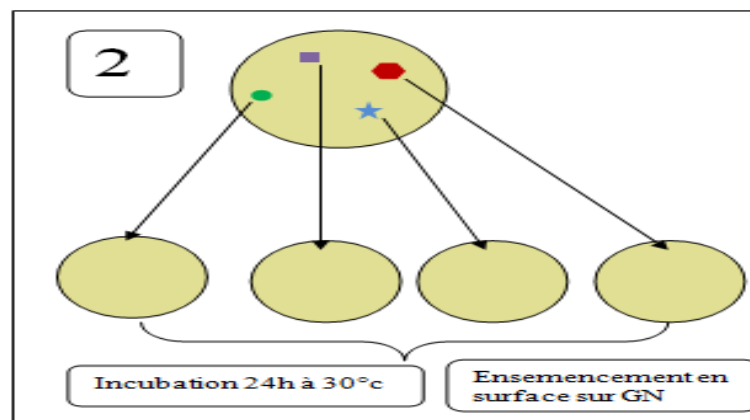


Figure 05 : Purification et l'isolement des souches.

III. Identification des souches isolées :

Après la purification et l'incubation des souches, l'identification a été réalisée dans un premier temps par l'observation macroscopique (à l'œil nu) et par l'observation microscopique (coloration de Gram) des isolats.

III.1 Aspect macroscopique des colonies :

C'est une description directe basée sur l'observation visuelle de la culture des isolats, permettant de caractériser la taille, la forme et la couleur des colonies bactériennes ainsi que le diamètre, la pigmentation et l'aspect.

III.2 Aspect microscopiques des souches :

- **Observation à l'état frais :**

La préparation à l'état frais permet d'examiner la mobilité ou l'immobilité des bactéries et d'en décèler la forme, bien que ce renseignement soit plus accessible sur des frottis colorés. Si la bactérie est sporulée, l'état frais permet également de mettre ce phénomène en évidence. Pour observer la mobilité, on doit prendre en garde à ne pas détruire les flagelles bactériens lors du prélèvement et de la préparation de la lame (**annexe 03**).

- **Coloration de Gram :**

L'observation microscopique d'après la coloration de Gram détermine la forme et la couleur des colonies bactériennes qui sert à distinguer le groupe de gram positive ou bien négative. C'est une coloration classique en microbiologie permettant la distinction des bactéries Gram positives (G+) et les bactéries Gram négatives (G-). Ces bactéries présentent toutes une paroi constituée d'une substance, la muréine qui est un peptidoglycane. Celle-ci est recouverte par une membrane externe chez les bactéries Gram-, tandis que les bactéries à Gram+ sont dépourvues (**Annexe 04**).

IV. Ensemencement sur les milieux sélectifs :

Selon les résultats de la coloration obtenues, les différentes formes des colonies bactériennes isolées ont été ensemencées en stries sur des milieux de cultures sélectives : **Chapman, EMB et Mac Conkey** et les incubées à 30°C pendant 24 à 48 h.

- ❶ Milieu Chapman : isolement les bactéries de forme Coque.
- ❷ Milieu EMB et Mac-Conkey : isolement les bactéries de forme Coccobacille.

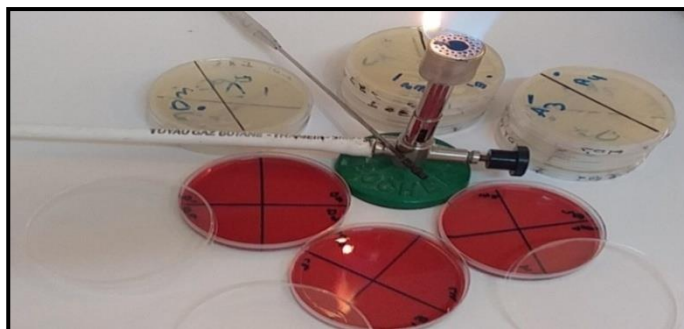


Figure 06 : Ensemencement en stries dans le milieu sélectif Chapman.

Après la sélection des souches sur les différents milieux de culture, une purification des différentes colonies a été réalisée par la méthode de trois quadrants (Le 1^{er} quadrant, des stries sont très serrées, le 2^{ème} des stries moins serrées et le 3^{ème} des stries un peu larges), l'ensemencement est réalisé sur **GN** à l'aide d'une anse de platine stérile et les incubées à 30°C pendant 24 à 48h.

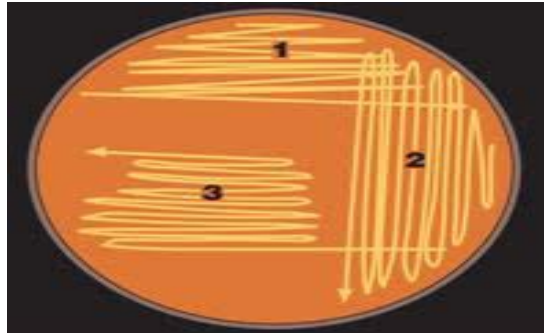


Figure 07 : l'ensemencement de trois quadrants.

IV.1. Préparation de la gélose inclinée :

Dans des tubes à vis contenant le **GN** inclinés, dix colonies différents ont été isolées à partir de 27 colonies bactériennes et les ensemencés en stries puis les incubés à 30°C pendant 24 à 48 h afin d'obtenir un stock des colonies et les conservées à 04 °C.

V. Etude de l'interaction Litière – microorganismes :

V.1 Préparation de l'inoculum :

La préparation d'inoculum est réalisée dans des tubes stériles contenant 5 à 10 ml de bouillon nutritif. À partir des cultures pures des tubes inclinés, dix colonies ont été isolées à l'aide d'une anse de platine stérile et déchargées dans le **BN**. Ensuite bien homogénéiser le contenu par le vortex et les incubés à 37°C pendant 24h.

Après l'incubation de l'inoculum la densité optique a été ajustée pour avoir une charge bactérienne de 10⁸ UFC/ml.

V.2 La spectrophotométrie :

La spectrophotométrie est une méthode d'analyse quantitative et qualitative qui permet de mesurer l'absorbance (**A**) qui également appelée la densité optique (**DO**) d'une substance chimique donnée c'est-à-dire sa capacité d'absorption de la lumière selon sa nature et sa concentration. Pour procéder à un dosage par cette technique, on utilise un appareil spécial, le spectrophotomètre qui est capable d'évaluer le spectre d'absorbance d'une solution.

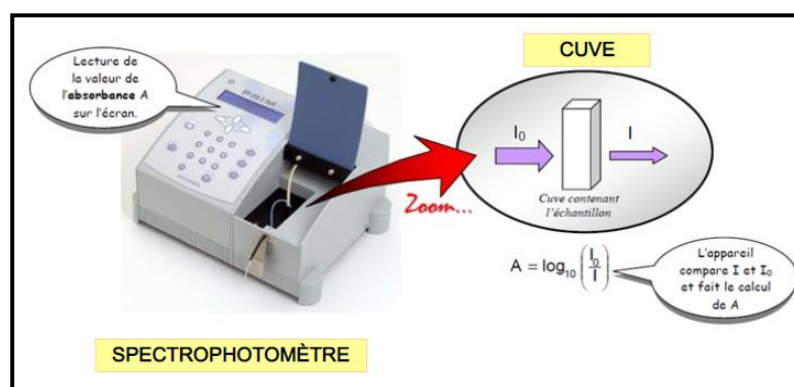


Figure 08 : Le principe de mesure l'absorbance ou DO.

V.3. Contamination de la litière :

V.3.1 Préparation de litière :

Un nouveau prélèvement de litière de poulets de chair a été réalisé au niveau de la willaya de TLEMCEN. Cette litière se caractérise par la forte odeur, et la couleur verte avec une consistance dure. L'étape de cette préparation exige l'obtention d'une nouvelle litière stérile qui est nécessaire pour la continuation de notre travail, dans cinq flacons stériles contenant l'eau physiologie, la litière a été mise e dans l'autoclave pendant deux heures afin d'obtenir une litière stérile sans aucuns microorganismes.

V.3.2. Ensemencement de la litière par des souches isolées :

Après la stérilisation de la litière, un autre ensemencement a été réalisé à partir de l'inoculum qu'ont été préparées par les souches isolées. Ensuite dans chaque flacons contenant la litière, un volume de 2ml de différents inoculum a été additionné. Après cette étape tous les flacons ont été recouverts par le papier aluminium. Ces flacons ont été incubés pendant une semaine à 30°C.

- **Dénombrement bactérienne de la litière après incubation :**

Une autre série de dilution a été réalisée par l'utilisation de cette nouvelle litière contaminée. Dans un flacon stérile, une pesée de 10 g de litière contaminée est diluée dans un volume de 100 ml d'eau physiologique stérile, homogénéiser et agiter pendant 5 minutes puis laisser à se précipiter pour obtenir deux phases, le surnageant et le culot. Ensuite, un volume de 1 ml du surnageant récupéré à l'aide d'une micropipette de 1000 μ l, est ajouté à 9 ml d'eau physiologique stérile et agité afin d'obtenir une dilution décimale de 10^{-1} . Des dilutions successives (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} à 10^{-6}) ont été préparées par la suite.

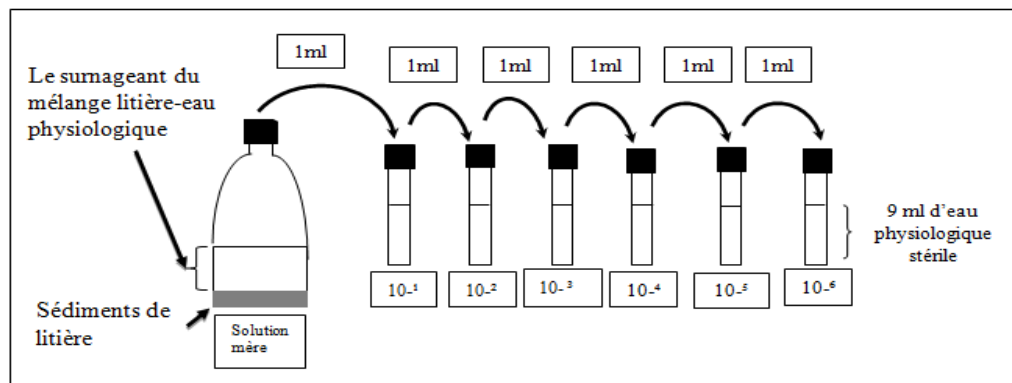


Figure 09 : Préparation des dilutions à partir d'une nouvelle litière contaminée.

Le dénombrement se fait par deux méthodes distinguées, la première est de dénombrer les colonies bactériennes directement sur la boîte après une culture bactérienne, la deuxième se fait par la mesure de la densité optique par le spectrophotomètre avec une longueur d'onde précise.

- ❶ **La mesure de la charge bactérienne par la densité optique :**

À l'aide d'un spectrophotomètre, la densité optique des dilutions a été ajustée pour avoir une charge bactérienne de 10^8 UFC /ml (Guinebert et Pénaud, 2005) avec une longueur d'onde de 600 à 620 nm.

- ❷ **Ensemencement en surface :**

Après la dilution, un étalement de volume de 0,1 ml de chaque diluant est réalisé par l'utilisation d'un râtelier stérile en verre sur des boîtes de pétrie contenant le GN.L'incubation dure 48 heures à 30°C .

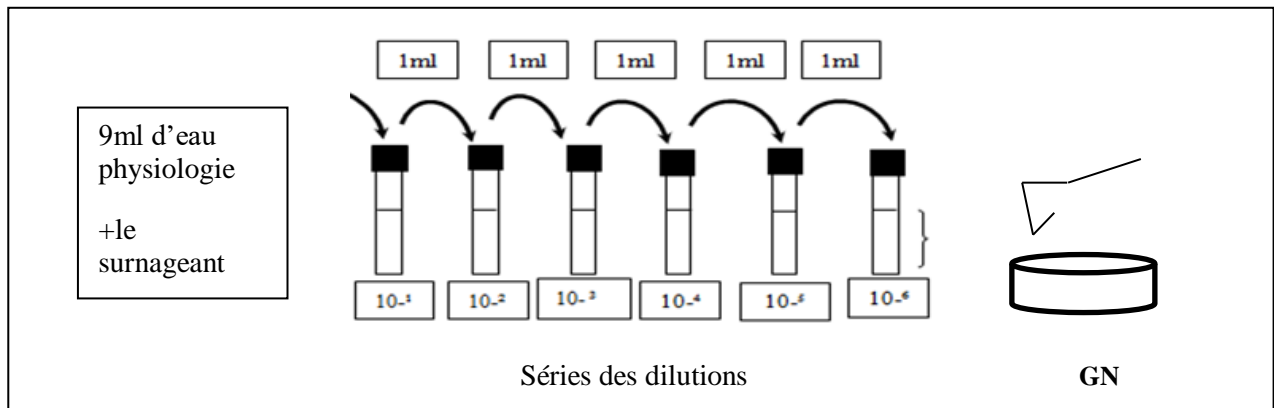


Figure 10 : Schéma représente l'ensemencement en surface à partir de séries de dilutions.

D'après la culture bactérienne obtenue, un comptage des colonies est réalisée sur la boîte de pétrie par l'utilisation d'un marqueur. On peut compter la charge bactérienne de cette litière à partir de la formule mathématique **de norme ISO 7218** ci-dessous :

$$N = \frac{\sum C}{(N1 + (0.1 \times N2) D)} \times \left(\frac{1}{V}\right)$$

N : nombre de bactéries /g ou par litre.

∑C : La somme des colonies comptées sur les boîtes retenue.

N1 : nombre de boîtes de la dilution la plus faible (la première dilution).

N2 : nombre de boîtes de la seconde dilution.

D : facteur de dilution de la première dilution retenue pour les comptages sur boîte (la plus faible).

V : volume de l'inoculum appliqué à chaque boîte (ml).

V.3.3. Ensemencement de litière contaminé par des souches à un effet antibactérien :

Un nouvel inoculum a été préparé à partir des tubes inclinés contenant les souches à un effet antibactérien, ces colonies ont été isolées à l'aide d'une anse de platine stérile et déchargées dans le **BN**. Un ensemencement a été réalisé par l'ajout d'un volume de 2 ml de cet inoculum dans les flacons contenant la litière contaminé et les incubées pendant 48 heures à température de 30°C. Cette méthode a pour but d'avoir l'effet de ses souches antibactériennes soit par l'augmentation ou la diminution des microorganismes (souches isolées) présent dans cette litière. L'impact de ses souches s'exprime par la comparaison entre la charge bactérienne de deux litières (litière contaminé et la litière contaminé plus les souches à effet antibactérienne).

- **Dénombrement bactérienne de la litière après incubation :**

Une pesée de 10 g de litière contaminé plus les souches à effet antibactérienne est diluée dans un volume de 100 ml d'eau physiologique stérile, homogénéiser et agiter pendant 5 minutes puis laisser à se précipiter pour obtenir deux phases, le surnageant et le culot. Ensuite, un volume de 1 ml du surnageant récupéré à l'aide d'une micropipette de 1000 μ l, est ajouté à 9 ml d'eau physiologique stérile et agité afin d'obtenir une dilution décimale de 10^{-1} . Des dilutions successives (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} à 10^{-6}) ont été préparées par la suite.

Le dénombrement se fait par les deux méthodes précédant soit par le comptage des colonies après une culture bactérienne réalisé par un ensemencement en surface ou bien la mesure de la charge bactérienne par l'ajustement de la densité optique de dilution pour obtenir une charge microbienne de 10^8 UFC /ml (**Guinebert et Pénaud, 2005**). Ensuite une comparaison entre les deux dénombrements bactériennes a été réalisé pour étudier l'effet de ses souches antibactériennes.

***RESULTATS ET
DISCUSSION***

I. Echantillonnage :

Les prélèvements effectués dans ce présent travail sont choisis sur la base du degré de l'état d'élevage dans les bâtiments, l'âge, l'humidité et l'odeur. A cet effet, les échantillons sont collectés à partir de différents bâtiments d'élevage des volailles de la willaya d'Ain-Temouchent et willaya Tlemcen compris la litière de type de copeaux de bois et les pailles. Les échantillons sont transportés au laboratoire de microbiologies du centre universitaires d'Ain-Temouchent afin de procéder aux analyses microbiologiques.

De nombreuses espèces avicoles sont élevées sur la litière dont le rôle est multiple : isolation du sol, recueil des déjections et absorption de l'eau. Au début de l'élevage, cette litière est caractérisée par une forte concentration en carbone, une teneur en matière sèche très élevée, une faible teneur en azote sous forme insoluble. Par l'apport des déjections animales, la litière est caractérisée par leurs très fortes concentrations en composés azotés facilement dégradables et générateurs potentiels de grandes quantités d'ammoniac, mais aussi par leur richesse en eau qui entraîne l'abaissement progressif du taux de matière sèche au-dessous de cinquante pour cent et favorise la prolifération de la flore bactérienne présente qui passe d'une concentration de 10^4 UFC /g à 10^8 UFC /g (**Guinebert et Pénaud, 2005**).

Une pesée de 10 grammes des litières prélevées et des dilutions décimales (10^{-1} à 10^{-6}) à partir de la solution mère ont été préparées. L'étalement d'un volume de 0,1 ml de chaque dilution sur la surface de gélose nutritive et l'incubation à une température de 30°C pendant 24-48 heures a permis l'isolement de 27 différentes souches, réparties sur les sites de prélèvements effectués.

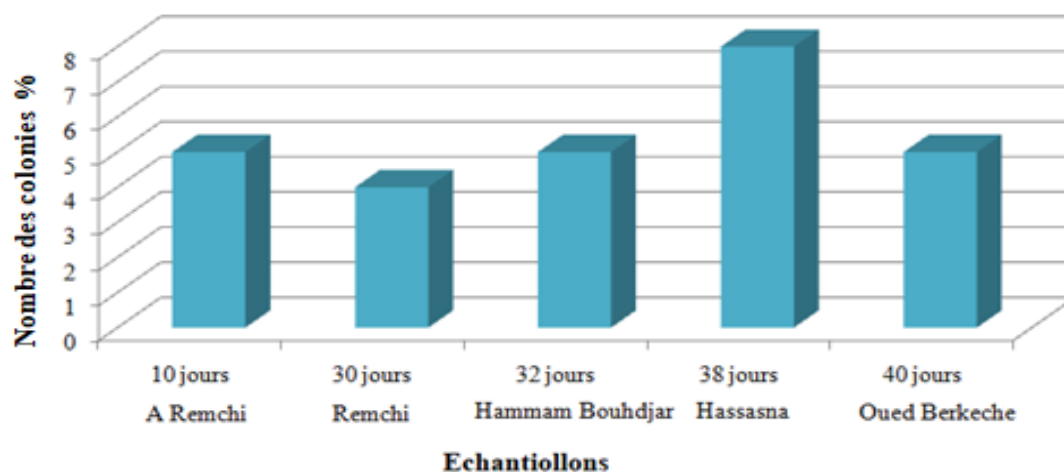


Figure 11 : Répartition des souches isolées à partir des sites de prélèvements effectués.

D'après l'histogramme, on a constaté qu'il y a présence d'une microflore dans les cinq sites de prélèvements effectués. La comparaison de la charge microbienne totale présente dans les cinq sites a permis de déduire que le bâtiment de 38 jours contient une microflore assez importante par rapport aux autres bâtiments. Cependant, la litière de 30 jours a montré la présence d'une faible charge microbienne.

II. Isolements des souches :

Un total de 27 souches ont été isolées et purifiées sur milieu gélose nutritive (GN).

Tableau 02 : Présentation de codification de différents échantillons prélevés et isolés.

Codification des échantillons isolés				
Litières de 40 jours	Litières de 10 jours	Litières de 30 jours	Litières de 38 jours	Litières de 32 jours
A1_A2_A3_ A4_A5	B1_B2_B3_ B4_B5	C1_C2_C5_C 6	D1_D2_D3_ D4_D5_D6_ D7_D8	E1_E2_E3_ C3_C4

La litière de 40 jours est très dégradée avec une odeur forte et sa charge bactérienne plus faible par contre les litières de 38 et 32 jours se caractérisent par une consistance humide, une forte odeur ammoniacale et une charge bactérienne trop importante. Les échantillons de 10 et 30 jours très solides avec une charge bactérienne moyenne et la fétide odeur.

III. Identification des souches isolées :

III.1. Aspect macroscopiques :

L'observation macroscopique et l'aspect des colonies isolées ont permis d'effectuer une caractérisation phénotypique primaire. De plus, l'ensemencement des souches isolées sur la surface de la gélose nutritive et l'incubation à une température de 30°C pendant 24-48 heures a permis l'observation de trois types de colonies, distinctes par leur forme, leur taille et leur aspect.

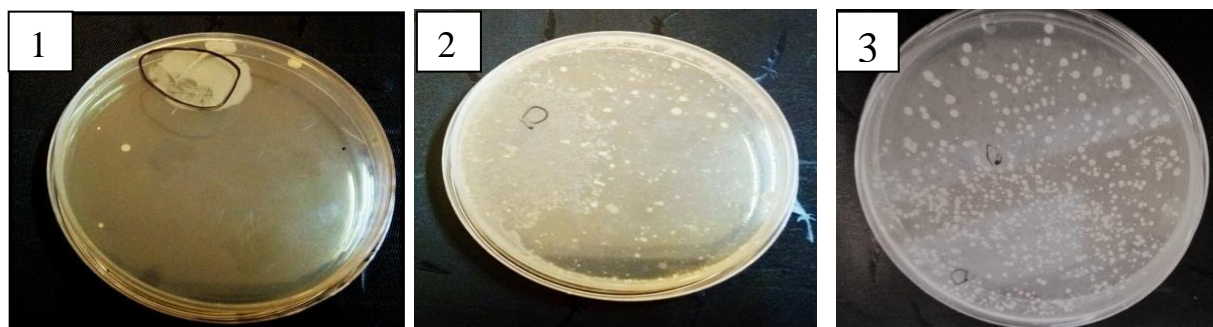


Figure 12 : Aspect macroscopique des 03 souches isolées de différents sites de prélèvement :

1: 10^{-6} litière de 10 jours / **2 :** 10^{-3} litière de 32 jours / **3 :** 10^{-4} litière de 30 jours.

Tableau 03 : Présentation de différents aspects macroscopiques des colonies isolées.

Les colonies isolées	Couleur	Forme	Surface	Consistance
Souche 1	Crème	Irrégulier	Lisse	Crémeuse
Souche 2	Blanche	Irrégulier	Rugueuse	Crouteuse
Souche 3	Crème	Ronde	Lisse	Crémeuse

III.2. Aspect microscopiques :

L'observation microscopique est réalisée par la méthode de la coloration de Gram. Les résultats illustrés ont montré une variété de types bactériens. Toutes les bactéries observées sont mobiles et présentent différentes formes bacillaires du groupe coccobacilles aux gros bacilles et des coques. Elles sont assemblées en amas, en chainettes, ou même isolées, elles présentent une paroi à Gram positive ou négative.

III.2.1. Coloration de Gram :

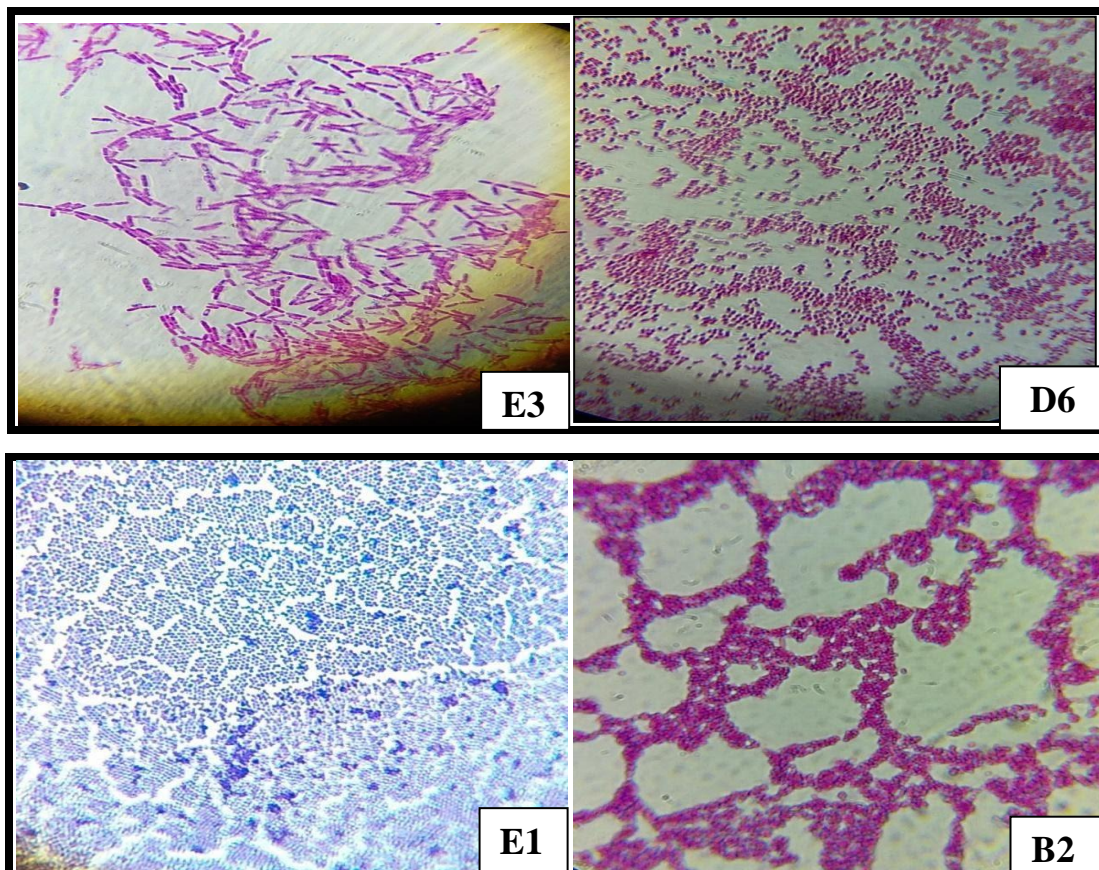


Figure 13 : Observation microscopique des souches pures après coloration de Gram (Gross 100x10).


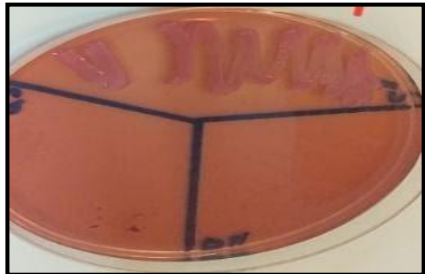
Tableau 04 : Présentation de différent aspect microscopique des colonies isolées.





Souche / Critère	E3	D6	E1	B2
Coloration de Gram	-	-	+	-
Taille de la cellule	Gross	Moyennes	Petites	Petites
Forme	Bacille	Coccobacille	Coque	Bacille

IV. Isolements sur milieux sélectives :

- Tous les codes A → Litière de 40 jours
- Tous les codes D → Litière de 38 jours.
- Les codes C3, C4, E1 et E2 → Litière de 32 jours.
- Le code C6 → Litière de 30 jours.

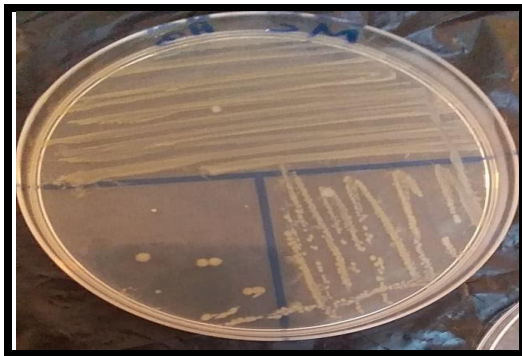
Tableau 05 : Description de l'observation macroscopique des colonies isolées sur les milieux sélectifs.

Mac-Coke		<p>A3, D8 et E2 :</p> <p>Inhibition partielle à complété.</p> <p>A1 et C3 :</p> <p>Ces souches ont des grosses colonies roses / rouges avec une surface lisse et consistance crémeuse.</p> <p>A2 :</p> <p>Cette souche a des grosses colonies jaunes avec une surface lisse et consistance crémeuse.</p>
		

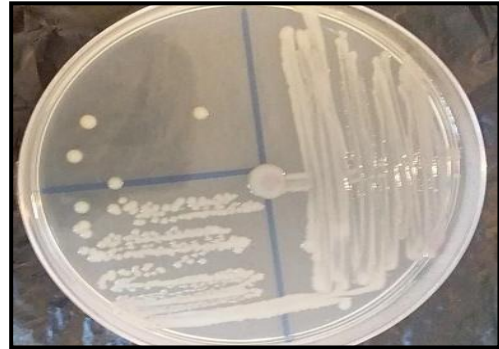
<p>EMBL</p>	 <p>A1 A2 A3</p>  <p>C 3 E2 D8</p>	<p>A3 et D8 :</p> <p>Inhibition partielle à complété.</p> <p>A1 et C3 :</p> <p>Ces souches ont des grosses colonies très foncées bambées (violet) à centre noire avec un reflet vert métallique brillant, d'une surface lisse et consistance crémeuse.</p> <p>A2 et E2 :</p> <p>Ces souches ont des petites colonies plates incolores (marron) avec une surface lisse et consistance crémeuse (suspicion d'E. coli).</p>
<p>Chapman</p>	 <p>D1 D7 D3 D2</p>  <p>C4 E1 C6 C2</p>	<p>C6, C4, D7et D2 :</p> <p>Ces souches ont des grosses colonies jaunes d'une surface rugueuse et consistance crouteuse (suspicion des staphylocoques aureus).</p> <p>C2, E1, D1 et D2 :</p> <p>Ces souches ont petites colonies rouges d'une surface rugueuse et consistance crouteuse (suspicion des staphylocoques epidermidis).</p>

V. Isolement et purification par la méthode de trois cadrans :

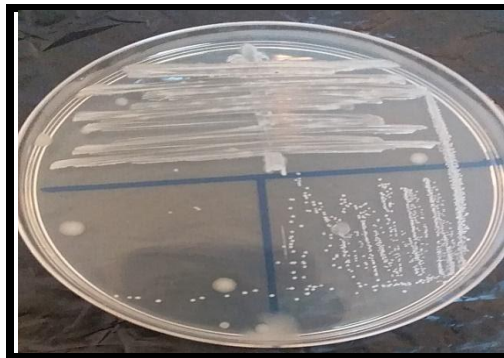
Les souches purifiées à partir de **MAC-CONKEY** sont caractérisées par une forme rondes, semi bombées similaires aux coccobacilles et une surface rugueuse avec une couleur crème par contre les souches obtenues à partir d'**EMBL** sont irrégulier, semi bombées avec une surface lisse et couleur blanche. Les colonies isolées de **Chapman** sont purifiées et donnant un couleur blanches, semi bombées et de forme rond comme les petites coques avec un surface lisse. Ces figures représentant les résultats de la purification.



A partir de MAC-CONKEYA3



À partir d'EMBL C3



A partir de Chapman B5

Figure 14 : Aspect macroscopique des souches purifiées à partir des milieux sélectifs.

VI. L'effet des souches probiotiques et de *Bacillus* sur les microorganismes de la litière :

Guinebert et Pénaud (2005) ont évalué l'intérêt de l'apport régulier directement sur la litière d'une flore spécifique (BACTIVORND), inoculum constitué de souches de *Bacilles subtilisa* sélectionnées à une aptitude à se multiplier et d'orienter le développement microbien. La compétition bactérienne entretenue par ces apports entraînait la réduction des entérobactéries et des coliformes dans la litière permet une réduction des pertes ammoniacales, ainsi qu'une diminution de la proportion d'azote lessivable présente dans les fumiers maturés.

Allain et Aubert (2009) a étudiée les effets de l'ensemencement d'un complexe de microorganismes dans une litière de poulets de chair. Les résultats obtenus montrent une réduction de plus de 80 % des pertes d'azote sous forme ammoniacale en bâtiment, un bon assainissement et un bon compostage (augmentation de 40 % de l'azote organique).

Discussion :

Les litières de volaille est un mélange de fumier de volaille et de différents matériaux de litière, sont des écosystèmes environnementaux avec une gamme considérable de caractéristiques. Leur diversité microbienne varie d'un type de litière à l'autre, ce qui rend leur étude intéressante. Les propriétés biotiques de ces volailles et leurs déchets ont été mises en étude (Lovett et al, 1971; Finstein et Morris, 1975; Corominas et al, 1987; De Bertoldi et al, 1987; Acea et Carballas, 1988a , b; Nodar et al, 1990; Martin et al, 1998; Lu et al, 2003b; Thaxton et al, 2003; Fries et al, 2005).

D'après notre étude, cinq Fermes distincte ont été choisis pour collectés les échantillons dans des poulaillers en poulets de chair à des âges différents tant que plusieurs études a été faites dans des poulaillers soit en poulets pondeuses ou de chair comme étude de **Lu et al en 2003**. L'isolement et la caractérisation des souches bactériennes ont été réalisés par mise en place des méthodes culturales standards sur la base de leurs essais morphologiques, culturaux et biochimiques. **Mathan Periasamy et al, 2013** ont choisi la même méthode.

Les premiers résultats d'isolement ont montré une charge microbienne dans tous les cinq échantillons avec un total de 27 colonies bactériennes différentes dans la taille, la surface et la consistance. Ce nombre des isolats reste très négligeable par rapport aux différentes diversités des souches bactériennes d'un écosystème de la litière ou les conditions de l'état des bâtiments des volailles sont optimales (comme l'humidité, l'odeur, âges...).

Après l'observation macroscopique des colonies bactériennes isolées, on a trouvée des petites ou grandes colonies crémeuses à bord irrégulier ou régulier, rond, d'une surface lisse et des colonies blanchâtres crouteuses irrégulières d'une surface rugueuse.

Notre résultat montre que l'échantillon de 38 jours a présenté un grand pourcentage par rapport aux autres échantillons grâce à leurs caractéristiques de l'humidité et l'odeur fétides et les déjections animales observées au niveau de bâtiment avec un faible pourcentage pour l'échantillon de 30 jours.

L'observation microscopique par la coloration de Gram a montré l'apparition de trois formes de colonies qui ont les bacilles, les coccobacilles et les coques. Le taux de coques est de 40%, les bacilles de 37%, les coccobacilles de 13%. Ces formes sont soit assemblée en amas, en chainettes et même isolées avec des tailles différents (**annexe 05**). Les bactéries a Gram- sont les plus fréquentes (93%) et les bactéries Gram+ de 2% aux parallèles aux résultats de **Abebe Eyasu et al, (2014)**, par contre **NANDI et al, 2004** a trouvé que les bactéries a Gram+ représente 80% et les bactéries Gram- de 2%.

Tableau 06 : Pourcentage de différents formes des bactéries qui présent dans la litière.

Forme des Bactéries	Pourcentage de la présence dans la litière de volaille
Les Coques	40% (Parmi eux 1% de gram +)
Les bacilles	37% (Les tous sont des gram-)
Les Coccobacilles	13% (Parmi eux 1% de gram +)

Selon la coloration de Gram obtenues, la sélection des souches bactériennes se fait à partir des milieux sélectifs spéciaux pour l'isolement des coques (Chapman) et les Coccobacilles (MAC_Conkey et EMBL). Plusieurs études réalisées ont été utilisée des techniques classiques par la mise en évidence des différents milieux cultures comme **Mathan Periasamy et al, 2013** par contre le développement de PCR a permis d'isoler et détecter de nombreux bactéries qui hébergent l'écosystème de la litière de volailles comme **Lu et al en 2003**.

Notre résultats de purification a montré l'apparition des colonies blanches, rond, semi-bombé, lisse de forme coques qui est similaires au staphylocoques ou E. coli aussi des colonies crémeuses et lisse de forme bacilles et coccobacilles.

A cause des conditions sanitaires dans nos payé et le monde entier, notre travaille s'arrêté dans l'étape de l'identification des souches bactériennes qui est essentielle dans n'importe études microbiologiques.

Des études ont été réalisées par plusieurs chercheurs concernant l'identification de la population bactériennes de la litière a révélée quelques différences entre eux.

❖ **Lu et al. (2003)** ont étudié la composition bactérienne de la litière de poulet de chair (sur litière de bois blanc) en utilisant à la fois les méthodes de mise en culture et d'identification moléculaire. Les bactéries aérobies étaient détectées par les méthodes de culture à partir de 10^9 UFC/g de litière. Les entérobactéries comme *Enterococcus spp* et les coliformes représentaient 0,1 et 0,01 %, respectivement, des bactéries aérobies totales cultivables dans la litière. Aucune souche de *Salmonella* n'a été détectée par culture. Pour caractériser les groupes bactériens les plus importants, les auteurs ont ensuite séquencé les gènes d'ADN ribosomal 16S par PCR à partir de l'ADN total de la communauté microbienne isolé dans la litière. Douze familles ou groupes ont été ainsi identifiés avec comme représentants principaux *Lactobacilli* et *Salinococcus spp*. En effet, 82 % des séquences totales appartenaient à des bactéries Gram+, dont 62 % à des taxons à faibles GC%. En plus de la détection des séquences d'ADN ribosomal 16S correspondant à des bactéries d'origine fécale, de nombreuses autres séquences bactériennes ont été détectées dans la litière : *Globicatella sulfidofaciens*, *Corynebacterium ammoniagenes*, *Corynebacterium urealyticum*, *Clostridium aminovalericum*, *Arthrobacter spp* et *Denitrobacter permanens*. Celles-ci pourraient être impliquées dans la dégradation du bois et les cycles de l'azote et du soufre. D'autres séquences bactériennes correspondant à des agents pathogènes potentiels ont également été identifiées, à l'instar de *Clostridium*, *Staphylococcus* et *Bordetella spp*. En revanche, n'ont pas été détectées *Salmonella*, les *Escherichia coli* pathogènes, *Campylobacter spp*, *Yersinia spp*, *Listeria spp*, ou les Staphylocoques toxigéniques.

❖ **Omeira et al (2006)** ont comparé les propriétés microbiologiques de la litière générée par les poules pondeuses et les poulets de chair élevés dans des systèmes de production intensive ou en plein air. L'analyse microbiologique consistait en une numération des bactéries totales, des coliformes totaux, des espèces de staphylocoques, de *Salmonella* et de *Clostridium perfringens*. La litière des poules pondeuses élevées présentait un comptage bactérien total plus faible que celle des poulets de chair indépendamment du système d'élevage choisi. La litière des pondeuses élevées en conditions intensives avait les plus faibles numérations en moyenne de coliformes totaux alors que le plus faible comptage en espèces de staphylocoques était observé dans la litière des pondeuses de plein air. Les comptages de *C. perfringens* étaient minimaux pour les volailles élevées de manière intensive et ce quel que soit le type de production.

❖ **Mathan Periasamy et al, 2013** a été réalisés un isolement et identification des micro-organismes à partir des sites de déversement des gaspillages de volaille. Des échantillons ont été prélevés dans cinq régions différentes et isolats bactériens obtenus ont ensuite été purifiés dans la culture pure et identifiés sur la base de leurs essais morphologiques, culturels et biochimiques par des procédés microbiologiques standards. Les organismes pathogènes isolés étaient *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella sonnei* et *Klebsiella pneumonia*. La colonisation des bactéries pathogènes dans des décharges de déchets de volaille est très dangereuse à l'environnement et ces gaspillages de volaille ont besoin d'un système d'évacuation rapide Isolement des bactéries pathogènes de la volaille à des gaspillages

- **Inoculation de litières avec des flores microbiennes :**

Notre études en principe est basée sur l'inoculation des souches bactériennes dans une litière stérile et de suivis leur effets sur la litière. **Guignebert et Pénaud en 2005** ont montré l'intérêt de l'apport d'une flore spécifique BACTIVORND dans cinq poulaillers des dindes. Cet inoculum constitué des souches de *Bacillus subtilis* sélectionnées, a une aptitude à se multiplier, d'orienter le développement microbien et de modifier les processus de dégradation de la matière organique, sous son influence pour aboutir une maturation bénéfique. La compétition bactérienne entretenue par ces apports entraînait la réduction des entérobactéries et des coliformes dans la litière. Ce travail permet de conclure sur les perspectives intéressantes apportées par le contrôle microbiologique de la litière pour répondre aux exigences de protection de l'environnement.

❖ Une autre étude réalisée par **Allain et Aubert (2009)** a pour objectif de mesurer les effets de l'ensemencement d'une litière de poulets de chair en début de bande par un complexe de micro-organismes en termes de pertes gazeuses, de compostage et d'assainissement. Les résultats obtenus montrent une réduction de plus de 80 % des pertes d'azote sous forme ammoniacale en bâtiment, un bon assainissement et un bon compostage (augmentation de 40 % de l'azote organique).

La diminution de la charge bactérienne et le teneur en azote se fait soit par la libération des acides organiques ou bien de substances antibactériennes à partir de ce complexe de microorganismes qui possèdent la propriété de la compétition bactérienne afin d'éliminer les autres bactéries.

En conclusion, L'inoculation de la litière au cours de l'élevage des volailles permet une réduction des pertes ammoniacales, ainsi que la diminution de la proportion d'azote lessivable présente dans les fumiers maturés. Les nuisances liées à l'épandage sont limitées avec cette pratique. Enfin, l'inoculation permet de réduire les risques de contamination pour les animaux liés à la forte concentration en entérobactéries des litières non traitées, ainsi que par les microorganismes potentiellement pathogènes présents dans ces milieux.

CONCLUSION

CONCLUSION

La litière, c'est l'isolant qui permet aux animaux d'assurer le confort thermique et physique dans leur poulailler mais qui sert aussi à absorber les déjections et à les occuper. En effet, la présence d'une mauvaise qualité de litière provoque l'augmentation de l'humidité ce qui permet une évolution d'un écosystème favorable pour le développement des microorganismes et les moisissures.

Ce travail, réalisé dans une période courte de mois de février jusqu'à à le mois de mars de l'année 2020 à cause des conditions sanitaires mondiales (Covide -19), basée sur l'inoculation des souches bactériennes dans la litière de volailles et l'étude de leurs effets à partir de l'identification et isolements des cinq échantillons de la litière des volailles de différents types et âges dans notre wilaya .

Alors, 27 souches microbiennes de différentes formes morphologiques ont été isolées et identifiées au laboratoire microbiologique. On a montré une microflore élevée importante a été présentée dans l'échantillon de 38 jours (8%) à cause de leurs caractéristiques de l'humidité et l'odeur fétides et les déjections animales dans le poulailler tant qu'une faible diversité microbienne a été présentée dans l'échantillon de 30 jours (3%).

L'apparition de trois formes des colonies isolées ont été observées par la coloration de gram : des coques de 40%, des bacilles de 37% et des coccobacilles de 13%. Les bactéries à gram – sont plus abondante (93%) par rapport aux bactéries à gram + qui présentent de 2%.

D'après des études qui ont été réalisées par les chercheurs microbiologistes, l'effet de l'inoculation d'un complexe des microorganismes dans une litière stérile a permet une réduction des pertes ammoniacales, diminution de la proportion d'azote lessivable et limitation des nuisances (odeurs) associées à l'épandage, ainsi permet aux animaux de réduire les risques de contamination provoquer par la présence des entérobactéries et des agents pathogènes

Référence :

- 1. ABEBE EYASU, FELEKE MOGES ET AGERSEW ALEMU** (12/11/2014). Bacterial isolates from poultry litters and their antimicrobial susceptibility patterns in Gondar, Northwest Ethiopia. *International Journal of Microbiology Research and Reviews* ISSN 2329-9800.
- 2. ACOSTA-MARTINEZ V and HARMEL R.D** (2006). Soil microbial communities and enzyme activities under various poultry litter application rates. *Journal of Environmental Quality* 35: 1309-1318
- 3. ADAMA Faye** (23/ 7/ 2011). Influence de la nature de litières utilisées en région périurbaine de Bakar (Sénégal) sur les performances de croissance du poulet de chair. Thèse.
- 4. AGBEDE, T.M and OJENIYI, S.O** (2009). Tillage and poultry manure effects on soil fertility and sorghum yield in south-western Nigeria. *Soil and tillage research*104: 74-81.
- 5. ANNE BALTAZART**(2010). Propriété physique, chimique, biologique et nutritive de litières en élevage de volaille. Thèse pour le doctorat vétérinaire, ÉCOLE NATIONALE VETERINAIRE D' ALFORT.
- 6. BERNHART M, O.O, FASINA** (2009). Moisture effect on the storage, handling and flow properties of poultry litter. *Waste Management*, 29(4), 1392-1398
- 7. BOLANN.S et al** (2010). Uses and management of Poultry litter. *World's Poultry Science Journal*.
- 8. COOK, K.L et al** (2008). Effect of alum treatment on the concentration of total and ureolytic microorganisms in poultry litter. *Journal of EnvironnementalQuality*37: 2360-2367
- 9. Egrinya Eneji A, S. Inanaga, X. Li, P. An, J. Li, L. Duane and Z. Li** (2008). Effectiveness of mulching vs. incorporation of composted cattle manure in soil water conservation for wheat based on eco-physiological parameters. *Journal of Agronomy and Crop Science* 194: 26-33.

- 10. ENTICKNAP, et al** (2006) « Microbial diversity associated with odor modification for production of fertilizers from chicken litter ». *Applied and Environmental Microbiology* 72: 4105-4114
- 11. FDA** (2009). Food and Drug Administration; Center for Veterinary Medicine. The Use of Chicken Manure/Litter in Animal Feed. Available at: <http://www.pickle-publishing.com/papers/chicken-litter-animal-feed.htm>.
- 12. ITAVI**(2009). Guide d'élevage aviculture fermière – quelques repères pour les éleveurs professionnels commercialisant en circuits courts. en-ligne Paris (Fr)
- 13. Justine Yawavi SANNI (2014)**. Effets d'une litière à base d'attapulgite calcinée, sur les performances de croissance du poulet de chair. Thèse, Ecole inter-états des sciences et médecine vétérinaires de Dakar
- 14. Gian Gupta, Hemalatha Bhaskaran, Gerald Kananen and Joseph Okoh** (2004). Biodegradation of 2, 4-dinitrotoluene using poultry litter leachate. *Journal of Hazardous Materials*, 113(1-3), 137-140.
- 15. GUINEBERT Eric et PENAUD Jean** (30.31/5/2005). Intérêt d'un traitement biologique des litières de volailles par apport d'un additif microbien en présence des animaux.
- 16. LEYTEM A. B et al** (2007). What aspect of dietary modification in broilers controls litter water-soluble phosphorus: dietary phosphorus, phytase, or calcium? *Journal of Environmental Quality* 36: 453-463
- 17. LIECHTLY HAL O et al** (13/1/2009). Assessment of repeated application of poultry litter on phosphorus and nitrogen dynamics in loblolly pine: Implications for water quality. *Forest Ecology and Management* 258 2294–2303.
- 18. LOVANH et al** (2007). Spatial shifts in microbial population structure within poultry litter associated with physicochemical properties. *Poultry Science* 86: 1840-1849.

- 19. LU, et al** (2003). Evaluation of broiler litter with reference to the microbial composition as assessed by using 16S rRNA and functional gene markers. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 901-908.
- 20. Marie Chantal NYIRAMAFARANGA, 2012.** EFFETS D'UN TRAITEMENT CHIMIQUE PAR DES « FINES D'ATTAPULGITE CALCINEES » SUR L'EVOLUTION PHYSICO-CHIMIQUE ET MICROBIOLOGIQUE DE LA LITIERE DE COQUE D'ARACHIDE, ET LES PERFORMANCES DE CROISSANCE DU POULET DE CHAIR. Thèse.
- 21. Maguire R. O, P. W. Plumstead, and J. Brake,** (3/4/2006) « Impact of diet, moisture, location, and storage on soluble phosphorus in broiler litter breeder manure. *Journal of Environmental Quality* 35: 858-865.
- 22. MALONEG.W et al** (1992). Nutrient enrichment in integrated broiler production systems. *Poultry Science* 71: 1117-1122.
- 23. M. BEN LARBI et al** (2018). Effets des différents types de litières sur les performances et la qualité des poulets de chair à l'abattage. *Journal of new sciences, Agriculture and Biotechnology*, 51(4), 3166-3170.
- 24. McCASKEY, T.A. and JB. MARTIN JR,** (14/3/1988). Evaluation of a process for improved quality and microbiological safety of broiler litter. *Biological Wastes* 25:209-218
- 25. Michel JACQUET**(2007). Guide pour l'installation en production avicole. 2ème partie. La production de poulets de qualité différenciée : mise en place et résultats. [en-ligne] Gembloux (Belgique) : FACW. [<http://www.facw.be/dossierstechniques/guide-l-installation-2-me-partie.pdf>] (consulté le 22 Décembre 2009).
- 26. OMEIRA .N et al** (2006). Microbiological and chemical properties of litter from different chicken types and production systems. *Science of The Total Environment* 367 156–162.
- 27. ROTHROCK, M.J et al** (2008a). Development of a quantitative real-time PCR assay to target a novel group of ammonia producing bacteria found in poultry litter. *Poultry Science* 87: 1058-1067.

- 28. Seung-Soo Kim, Foster A. Agblevor, and Jongtae Lim** (2009). Fastpyrolysis of chicken litter and turkey litter in a fluidized bed reactor. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 15(2) : 247-252
- 29. Sharpley A.N, S. Herron, and T. Daniel** (2007). Overcoming the challenges of phosphorus-based management challenges in poultry farming. *Journal of Soil and Water Conservation*
- 30. SISTANI K. R et al** (20/3/2003). Characterization of broiler cake litter, the by-products of two management practices. *BioresourceTechnology*90: 27-32.
- 31. Sobhan Nandi, John J. Maurer et al** (4/5/2004). Gram-positive bacteria are a major reservoir of Class 1 antibiotic resistance integrons in poultry litter. *PNAS*, 101(18), 7118-7122.
- 32. Steve McGrath et al** (2010). Improving Soil Nutrition with Poultry Litter Application in Low-Input Forage Systems. *Agronomy Journal*102:48–54.
- 33. Tasistro Armando S, David E. Kissel and Parshall B. Bush** (2004). Spatial variability of broiler litter composition in a chicken house.*Journal of appliedpoultryresearch*13: 29-43.
- 34. Tewelde H, K. R Sistani, and D. E Row** (2005). Broiler Litter as a Micronutrient Source for Cotton: Concentrations in Plant Parts. *Journal of environmental quality*34:1697–1706.
- 35. Watson David .W, Phillip E. Kaufman, Donald A. Rutz, and Carol S. Glenister** (2001). Impact of the Darkling Beetle *Alphitobius diaperinus* (Panzer) on Establishment of the Predaceous Beetle *Carcinops pumilio* (Erichson) for *Muscadomestica*. Control in Caged-Layer Poultry Houses. *Biological Control*, 20(1), 8-15.
- 36. Zhu A and S.W Lee** (2005). Co-combustion performance of poultry wastes and natural gas in the advanced Swirling Fluidized Bed Combustor (SFBC). *Waste Management*, 25(5), 511-518.

ANNEXES :

ANNEXE 01 :

A. Matériels utilisés :

- Tubes à vis stériles
- Flacons stériles
- Boîtes de pétries
- Pipettes pasteurs
- Micropipette de 1000µl et de 100 µl
- Bec benzène
- Anse de platine
- Agitateur magnétique chauffante
- Spectrophotomètre
- Incubateur
- Réfrigérateur de 4°C.
- Autoclave
- Papier Aluminium
- Microscope de grossissement x100.
- Lames et lamelles stériles
- Bain maries.
- Vortex.

B. Les réactifs :

- violet de gentiane
- Fuschine de Ziehl
- Lugol
- Alcool
- Eau physiologie 0,9%.

C. Milieu utilisés :

- Gélose nutritif
- Bouillon nutritif
- Milieu Chapman
- Milieu EMB
- Gélose Mac Conkey.

ANNXE 02 : Composition des milieux.

❖ Gélose nutritif :

Gélose nutritive est un milieu gélosé non sélectif car il ne permet pas de sélectionner une souche bactérienne précise. Il permet la culture des micro-organismes en microbiologie.

- Peptone 15g
- Extrait de viande 10g
- Extrait de levure..... 02g
- Chlorure de sodium..... 05g
- Agar 20g
- Eau distillée 1000ml
- pH = 6,8-7,4.

❖ Bouillon nutritif :

Le Bouillon Nutritif est un milieu largement utilisé pour la culture des micro-organismes peu exigeants.

- Extrait de viande 5g
- Peptone 10g
- Na Cl 5g
- Agar1 5g
- Eau distillée 1000 ml

❖ Eau physiologie :

- Na Cl 09g
- Eau distillée 1000ml

❖ Gélose Mac Conkey :

La gélose Mac Conkey est un milieu sélectif, lactose permet d'isoler et dénombrer les Entérobactéries. Il est particulièrement adapté pour l'isolement des Salmonella, Shigella et Escherichia coli entéropathogènes.

- Peptone pancréatique de gélatine..... 17,0g.
- Tryptone 1,5g.
- Peptone pepsique de viande 1,5 g.
- Lactose 10,0g
- Sels biliaires..... 1,5g
- Sodium chlorure 5, 0g.

- Rouge neutre 0,030g.
- Cristal violet 0,001g
- Agar agar 13,5g.
- Eau distillée 1L
- PH du milieu prêt à l'emploi à 25°C : 7,1 ± 0,2

❖ **Milieu Chapman :**

La gélose Chapman - Mannitol Salt Agar est un milieu sélectif pour l'isolement et la numération des staphylocoques. Il permet également de différencier les espèces fermentant le mannitol de celles qui ne le fermentent pas.

- Peptone 10,0g.
- Extrait de viande de bœuf..... 1,0g.
- Chlorure de sodium..... 75,0g.
- Mannitol 10,0g.
- Rouge de phénol 0,025g.
- Agar..... 15,0g.
- Eau distillée 1L
- PH =7,4 ± 0,2.

❖ **Milieu EMB : (éosine bleu de méthylène).**

Ce milieu est utilisé pour isoler et identifier *Escherichia coli* et *Enterobacter* ainsi que les bactéries intestinales à Gram -. L'éosine Y et le bleu de méthylène sont des agents faiblement sélectifs. Ils n'inhibent que partiellement le développement des microorganismes à Gram positif tels que les entérocoques.

- Peptone pancréatique de gélatine..... 10 g
- Phosphate bi-potassique (PO₄ K₂H) 2 g
- Lactose 10 g
- Eosine jaune 0,4 g
- Bleu de méthylène 0,065 g
- Agar Agar 15 g
- Eau distillée 1000 ml.
- PH du milieu prêt à l'emploi à 25°C : 7,1 ± 0,2.

ANNEXE 03 :

I. Etapes de l'observation à l'état frais :

- 1- Déposer une petite goutte d'eau stérile sur la lame.
- 2- Prélever une fraction de colonies sur gélose, de préférence aux bords de celle-ci (ou prélever une petite goutte de bouillon). Faire une suspension homogène dans la goutte d'eau en incorporant progressivement l'inoculum et en remuant très délicatement (afin de ne pas casser les flagelles).
- 3- Recouvrir d'une lamelle en évitant d'enfermer des bulles d'air. Le liquide ne doit pas déborder (sinon jeter la lame dans une solution désinfectante et recommencer).
- 4- Observer rapidement à l'objectif **40** en mettant la lumière au maximum mais en fermant le diaphragme (ou utiliser un système « fond noir » ou à « contraste de phase »).
- 5- Après observation, jeter l'état frais dans un bac contenant un désinfectant à large spectre car les bactéries sont vivantes...

❖ **Résultat :**

Des bactéries sont considérées comme **mobiles** lorsque des trajets très différents sont observés (déplacement dans toutes les directions). Une bactérie immobile est animée de mouvements d'agitation normaux dits mouvements browniens (agitation moléculaire), qu'il ne faut pas confondre avec la mobilité. De plus, lors de la pose de la lamelle, des **flux liquidiens** entraînent toutes les bactéries dans le même sens et à la même vitesse...

ANNEXE 04 :

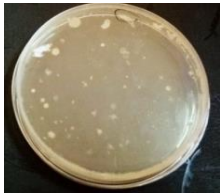

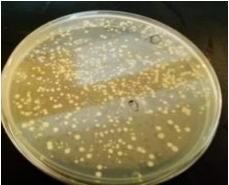







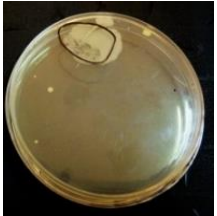
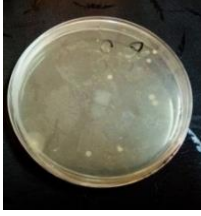
II. Etapes de coloration de gram :

- 1.** Nettoyer la lame à l'alcool et déposer une goutte d'eau physiologie.
- 2.** Prélever un échantillon de colonie et mélanger avec la goutte d'eau, strier et sécher par passage de lame rapide 3 fois sur la flamme du bec benzène.
- 3.** Versez une goutte du **crystal violet** sur la lame, laissez pendant 1 minute.
- 4.** Laver l'excès du colorant avec de l'eau distillée.
- 5.** Etaler le **lugol** et laisser agir 30 secondes puis rincer à l'eau distillée pendant 5 secondes. Cette étape permet de stabiliser la coloration violette.
- 6.** Rincer immédiatement le frottis avec le mélange alcool - acétone en inclinant la lame et par goutte à goutte jusqu'à disparition complète de la coloration violette (Décoloration pendant 5 à 10 secondes).
- 7.** Laver à l'eau distillée pendant 5 secondes.
- 8.** Contre coloration avec de la **Fuchsine** : laisser agir pendant 1 minute et laver à l'eau distillée pendant 10 secondes.
- 9.** Sécher la lame puis déposer une goutte d'huile à immersion sur le frottis et observer au microscope à un fort grossissement (objectif à immersion x100).

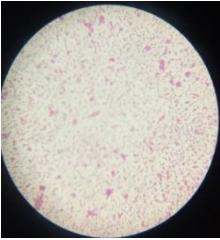
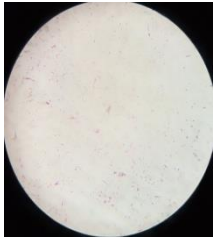

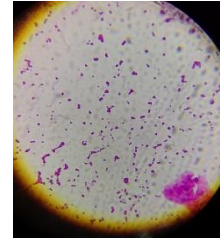
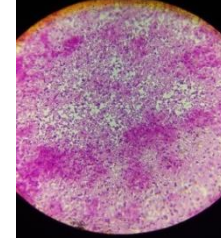
❖ Les résultats :

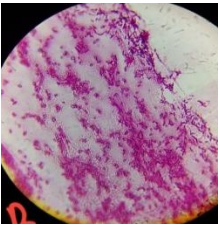
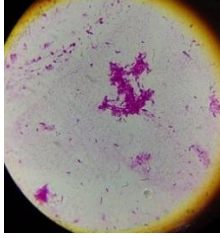
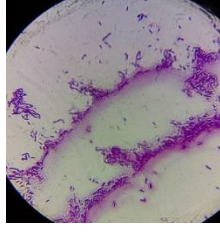
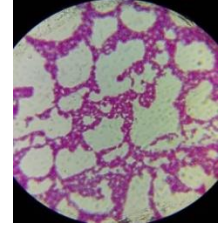
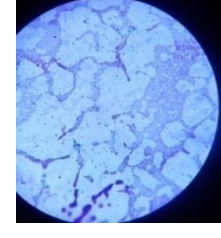
Les bactéries à Gram positif apparaissent violettes, le cristal violet étant piégé au sein de leurs parois cellulaires épaisses, alors que les bactéries à Gram négatif apparaissent roses ou rouges, le cristal violet étant passé à travers leurs fines parois cellulaires et le recolorant rose les ayant pénétrées.

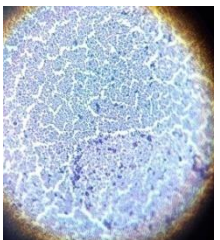
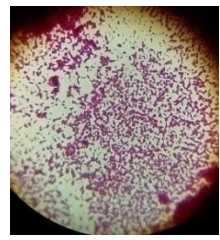
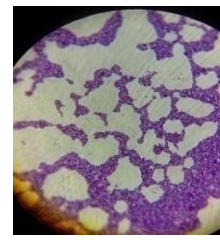

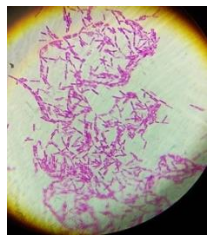
ANNEXE 05 : Tableau 01 : Présentation de quelques aspects des colonies isolées à partir des échantillons de litière de volaille sur GN.

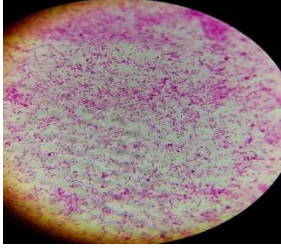

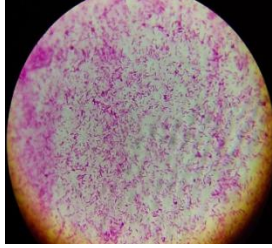
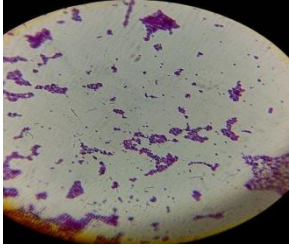
Echantillons Dilutions	Litière de 10 jours	Litière de 30 jours	Litière de 32 jours	Litière de 38 jours	Litière de 40 jours
10 ⁻¹					
10 ⁻²					
10 ⁻³					
10 ⁻⁴					
10 ⁻⁵					
10 ⁻⁶					

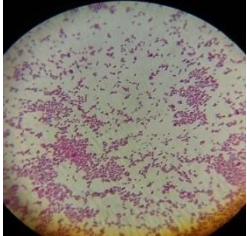
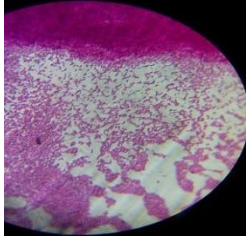
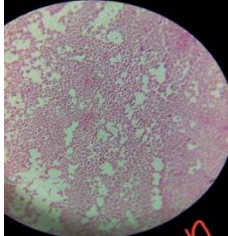
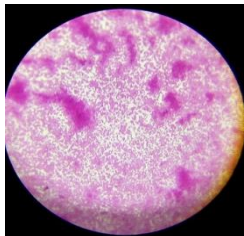
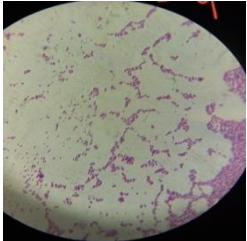
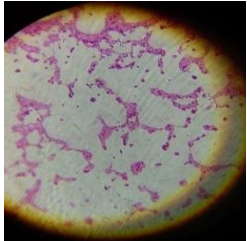
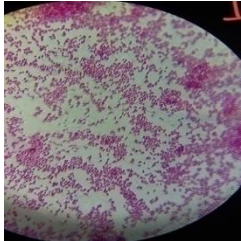
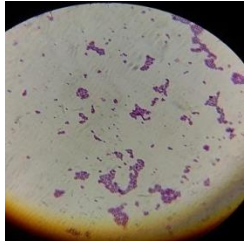
ANNEXE 06 : Tableau 02 : les caractères culturaux et morphologiques des isolats de tous les échantillons de la litière de volaille (coloration de gram).

Forme	Les Coccobacilles			Les coques	
	A1	A2	A3	A4	A5
Litière de 40 Jr (Toutes sont G-)					

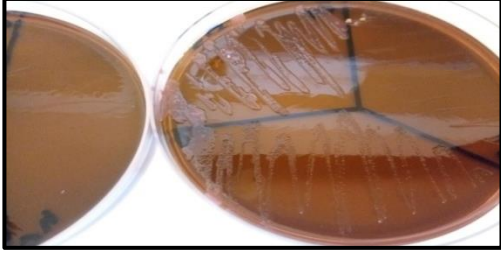
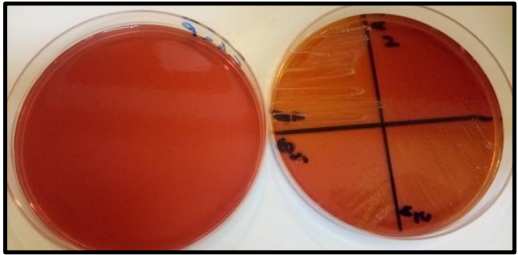
Forme	Les bacilles			Les coques	
	B1	B3	B4	B2 (Avec capsule)	B5
Litière de 10 jours (Toutes sont G-)					

Forme	Les coques		Les coccobacilles		Les bacilles
	E1 (Gram+)	C4 (Gram-)	E2 (Gram+)	C3 (Gram-)	E3 (Gram-)
Litière de 32 jours					

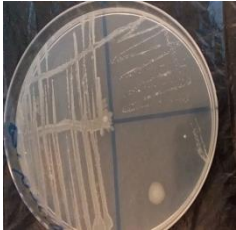


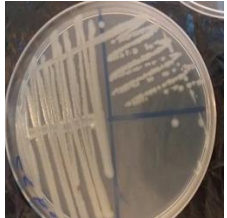
Forme	Les bacilles		Les Coques	
Code	C1	C5	C2	C6
Litière de 30 jours (Touts gram -)				

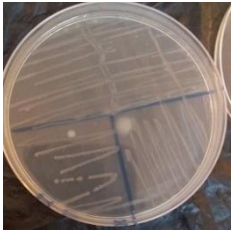
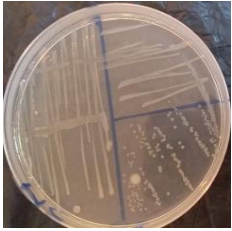
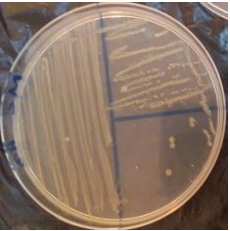

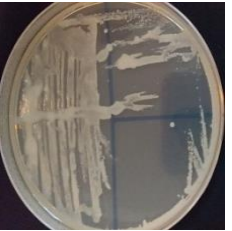
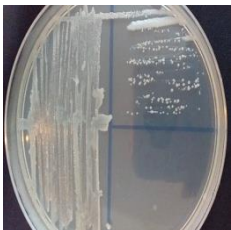



Litière de 38 jours (Toutes sont gram -)				
Code Forme	D1	D2	D3	D7
Les coques				
Code	D4	D5	D6	D8
Les Coccobaciles				





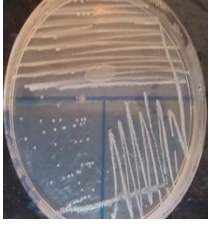
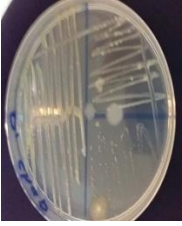




ANNEXE 07 : Tableau 03 : L'aspect de colonies isolées par les milieux sélectifs (Restes des figures).

Milieux Sélectifs	
EMBL (D6 et D5)	Chapman (B4, B5, A4 et A5)
	

ANNEXE 07 : Tableau 04 : Résultat macroscopique de l'ensemencement de trois cadrant. Isollements à partir de colonies obtenues des milieux sélectifs_ Chapman_Macconkey_EMB et les bacilles.

Codification	B1	B3	C1	C5
Ensemencement des colonies de forme bacilles				

Code	A1	A2	A3	C3	E2
A partir de Mac Conkey					
Code	D4	D5	D6	D8	
A partir de Mac Conkey					

Code	A4	A5	B5	C2	C6
A partir de Chapman					
Code	D1	D2	D3	D7	E1
A partir de Chapman					

Résumé : Dans les élevages de poulet de chair, la litière joue un rôle important dans le confort des animaux par l'isolation thermique, l'absorption de l'humidité et la prévention des pathologies (**BEN LARBI et al, 2018**).

L'objectif de ce travail est de mettre en évidence l'effet de l'inoculation d'une flore bactérienne dans une litière à partir de différents bâtiments d'élevages des poulets de chair. 05 échantillons de litière de différentes régions de la wilaya Ain Témouchent et Tlemcen ont été prélevés dont 27 souches bactériennes sont isolées et identifiées sur des milieux sélectifs et par des méthodes classiques. D'après les résultats microscopiques illustrés, toutes les bactéries observées sont mobiles et de différentes formes bacillaires du groupe coccobacilles aux gros bacilles et des coques, elles sont assemblées en amas, en chainettes, ou même isolées 93% des bactéries sont gram négatives.

Les recherches réalisées sur l'apport d'une flore des microorganismes dans une litière des volailles ont montré la réduction des entérobactéries et des coliformes, la réduction des pertes ammoniacales, ainsi qu'une diminution de la proportion d'azote lessivable présente dans les fumiers mûrés (**Guinebert et Pénaud, 2005**). **Allain et Aubert** en 2009 ont montré une réduction de plus de 80 % des pertes d'azotes sous forme ammoniacale en bâtiment, un bon assainissement et un bon compostage (augmentation de 40 % de l'azote organique).

D'après des recherches réalisées, l'inoculation d'un complexe des microorganismes dans une litière a une importance dans la modification de l'état physique de la litière et la réduction des entérobactéries et des coliformes et des pertes ammoniacales.

Mots clés : Litière, volailles, fumier, azote, fient et ammoniac.

Abstract: In broiler farms, litter plays an important role in animal comfort by providing thermal insulation, moisture absorption and disease prevention.

The objective of this work is to highlight the effect of the inoculation of a bacterial flora in a litter from different broiler farm buildings. 05 litter samples from different regions of the wilaya Ain Témouchent and Tlemcen were taken, of which 27 bacterial strains were isolated and identified on selective media and by conventional methods. According to the microscopic results illustrated, all the bacteria observed are mobile and of different bacillary forms from the coccobacillus group to large bacilli and cocci, they are assembled in clusters, in chains, or even isolated. 93% of the bacteria are gram negative.

Research carried out on the contribution of microorganism flora in poultry litter has shown the reduction of enterobacteria and coliforms, the reduction of ammonia losses, as well as a decrease in the proportion of leachable nitrogen present in mature manure (**Guinebert and Pénaud, 2005**). **Allain and Aubert** in 2009 showed a more than 80% reduction in ammonia nitrogen losses in buildings, good sanitation and composting (40% increase in organic nitrogen).

Based on the researches conducted, the inoculation of a complex of microorganisms in litter is important in modifying the physical state of the litter, and reducing enterobacteria and coliform bacteria and ammonia losses.

Key words: litter, poultry, Manure Nitrogen, Droppings, Ammonia.

ملخص:

في مزارع دجاج التسمين، تلعب القمامة دورًا مهمًا في راحة الحيوانات من خلال العزل الحراري وامتصاص الرطوبة والوقاية من الأمراض.

الهدف من هذا العمل هو توضيح تأثير تلقيح النباتات البكتيرية في القمامة من المباني المختلفة لدجاج اللحم. تم أخذ 05 عينة قمامة من مناطق مختلفة من ولاية عين تموشنتو لتلمسان، منها 27 سلالة بكتيرية تم عزلها وتحديدها على وسط انتقائي وبالطرق التقليدية. وفقًا للنتائج المجهرية الموضحة، فإن جميع البكتيريا التي تمت ملاحظتها متحركة وذات أشكال عصوية مختلفة من مجموعة العصيات إلى عصيات كبيرة وكونشي، يتم تجميعها في مجموعات أو سلاسل أو حتى معزولة. 93% من البكتيريا سالبة الجرام.

أظهر البحث الذي تم إجراؤه حول مساهمة الكائنات الحية الدقيقة في فضلات الدواجن تقليل البكتيريا المعوية والقولون، وتقليل خسائر الأمونيا، فضلاً عن انخفاض نسبة النيتروجين المتسرب الموجود في السماد ناضج (**Guinebert and Pénaud, 2005**). أظهر **Allain** و **Aubert** في عام 2009 انخفاضًا بأكثر من 80 % من خسائر النيتروجين في شكل الأمونيا في المباني، والصرف الصحي الجيد والسماد الجيد (زيادة بنسبة 40 % في النيتروجين العضوي).

يستنتج من البحوث التي تم إجراؤها أن تلقيح مجموعة من الكائنات الحية الدقيقة في القمامة مهم في تغيير الحالة الفيزيائية للقمامة، وفي تقليل البكتيريا المعوية والبكتيريا القولونية وفقدان الأمونيا.

كلمات مفتاحية: قمامة، دواجن، السماد، نيتروجين، فضلات، الأمونيا.