

# Méthodes de conservation de la population microbienne du rumen *in vitro*

par J. BLANCOU (\*)

(avec la collaboration technique de A. NDOYE et A. NIANG)

## RÉSUMÉ

Des expériences ont été effectuées visant à définir les meilleures méthodes de conservation de la microflore du rumen, dans le but de la réutiliser ensuite pour améliorer la digestibilité lors de changement de régime alimentaire.

Les tests concernaient la conservation : à  $-196^{\circ}$ , à  $-70^{\circ}$  avec 10 p. 100 de glycérol, par lyophilisation, par réfrigération, par dessiccation à  $37^{\circ}$  par congélation à  $-20^{\circ}$ .

D'après le nombre de bactéries survivantes et leur capacité de production d'acides gras volatils, seule la dernière méthode semble à la fois la plus efficace et la plus pratique.

Les phénomènes de pré-digestion des aliments par les microbes vivant dans la panse des ruminants revêtent, chez ces animaux, une importance vitale. C'est grâce à leur présence que les ruminants sont capables d'utiliser des aliments indigestibles pour la majorité des autres espèces (cellulose) ou inassimilables pour elles (azote non protéique).

De nombreux travaux ont démontré que ces phénomènes étaient essentiellement d'origine bactérienne, les protozoaires ciliés ayant un rôle moindre, probablement non indispensable, et indirect (3, 4, 6).

Cette microflore bactérienne est capable de s'adapter, dans un délai variant de quelques heures à plusieurs semaines (10), à tout changement de régime des ruminants-hôte.

Faute de pouvoir disposer en permanence de microflores fraîches adaptées à tel ou tel régime, il apparaît donc utile de pouvoir en conserver des échantillons : ne trouvant décrite ailleurs aucune étude générale sur de telles

méthodes de conservations, nous avons entrepris ce travail.

Son but était essentiellement de définir la meilleure *technique* de conservation utilisable au cours de nos recherches en microbiologie du rumen, quoiqu'une telle méthode puisse être éventuellement envisagée pour faciliter le sevrage ou l'adaptation à tout autre changement de régime chez les ruminants.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

Pour obtenir des résultats comparables, nous avons toujours utilisé le contenu liquide du rumen du même animal donneur : un zébu Gobra (Sénégal) muni d'une fistule permanente et alimenté au même régime (fane d'arachide).

Parmi les méthodes de conservation, nous n'avons retenu que celles concernant la microflore (bactéries) et non la microfaune (protozoaires ciliés), trop fragile. Ces méthodes sont :

la dessiccation,

l'action des basses températures,

la lyophilisation.

(\*) Laboratoire national de l'Elevage et de Recherches vétérinaires, B. P. 2057, Dakar-Hann (Sénégal).

Pour apprécier l'efficacité des méthodes employées, nous avons fait appel à deux sortes de techniques :

- le dénombrement des bactéries survivantes,
- la mesure de l'activité métabolique de ces bactéries.

### Méthodes de conservation

— *Dessiccation* : Nous avons choisi la méthode la moins éprouvante pour les bactéries et la plus pratique, c'est-à-dire la dessiccation progressive à 37°.

— *Action des basses températures* : Quatre températures ont été appliquées au prélèvement : 4°, - 20°, - 70° et - 196° (azote liquide) avec addition éventuelle de glycérol. Le prélèvement est constitué par 100 ml de jus de rumen.

— *Lyophilisation* : Le prélèvement est soumis à une lyophilisation en flacon bouché sous azote, après addition d'un substrat tamponné classique.

### Appréciation de l'efficacité des méthodes de conservation

— *Dénombrement des bactéries survivantes*

Ce dénombrement se fait simultanément en anaérobiose stricte et en aéro-anaérobiose.

— *Anaérobiose stricte* : le jus de rumen, avant et après conservation, est dilué etensemencé en anaérobiose selon la technique de HUNGATE (6) adaptée par BRYANT et ROBINSON.

Les dilutions 10-7 et 10-8 sont incubées à 39° en « Roll-tubes » sous  $\text{Co}^2$ , les colonies dénombrées à la loupe après 7 jours.

— *Aéro-anaérobiose* : les dilutions précédentes serontensemencées en masse dans la gélose d'une boîte de Petri incubée aussi à 39°.

La valeur des numérations est ensuite comparée, avant et après conservation, par les différentes techniques.

### Appréciation de l'activité métabolique des bactéries survivantes

Nous n'avons retenu comme critères de cette activité résiduelle, que celle de la production d'acides gras volatils, en présence de deux

substrats les plus classiques (le glucose et la cellulose à 1 p. 100), avant et après conservation. Le taux de ces acides gras volatils est déterminé par chromatographie en phase gazeuse.

La valeur de cette production est jugée par rapport à un témoin incubé sans substrat additionnel. La différence, exprimée en pourcentage, entre le taux d'acides gras volatils produits avant et après conservation donne une idée de la réduction de l'activité du métabolisme des bactéries soumises à cette conservation.

## RÉSULTATS

Les résultats des différentes analyses effectuées sur le prélèvement sont rapportées aux tableaux suivants, indiquant les valeurs, avant et après conservation, pour les quatre techniques étudiées.

- Pour les *numérations*, les variations sont indiquées par le nombre des pertes d'éléments revivifiables.

- Pour la *production d'acide gras volatils*, les variations sont indiquées en pourcentage de perte d'activité moyenne en présence du substrat étudié.

## CONCLUSION — DISCUSSION

La lecture des tableaux I et II nous suggère les observations suivantes :

1) *D'après le nombre des bactéries revivifiables*, les plus efficaces des méthodes de conservation devraient se classer dans l'ordre suivant (au 8<sup>e</sup> jour).

- a) conservation dans l'azote liquide,
- b) conservation à - 70° en présence de 10 p. 100 de glycérol,
- c) conservation par lyophilisation en substrat tamponné,
- d) conservation à - 20°,
- e) conservation par dessiccation à + 37° (\*).

2) *D'après les variations dans la production d'acides gras volatils*, le classement devient :

- a) conservation à - 20°,

TABLEAU N° I-Variation du nombre de bactéries et de leur activité au huitième jour.

Méthode de conservation Analyse	Dessiccation à 37°		Conservation à + 4°		Conservation à -20°		Conservation à -70° avec 10 p.100 de glycérol	
	N		N		N		N	
Numération des bactéries aéro-anaérobies (par ml)	N	28	N	12	N	28	N	28
	Δ	Perte de $10^{3,5}$ à $10^{4,7}$	Δ	Augmentation de $10^{1,1}$ à $10^2$	Δ	Perte de $10^{1,8}$ à $10^{2,5}$	Δ	Perte de $10^{1,1}$ à $10^{1,6}$
Numération des bactéries anaérobies stricts (par ml)	N	28	N	12	N	28	N	28
	Δ	Perte de $10^{4,2}$ à $10^{5,7}$	Δ	Pas de variation significative	Δ	Perte de $10^{1,5}$ à $10^{2,2}$	Δ	Perte de $10^{1,2}$ à $10^{1,7}$
Production d'acides gras volatils en présence de 1 p.100 de Glucose (g/l).	N	28	N	-	N	28	N	28
	Δ	Perte d'activité de 80 à 100p.100	Δ	-	Δ	Perte d'activité de 19 à 54 p.100	Δ	Perte d'activité de 31 à 69 p.100
Production d'acides gras volatils en présence de 1 p.100 de cellulose (g/l)	N	28	N	-	N	28	N	28
	Δ	Perte d'activité de 80 à 100p.100	Δ	-	Δ	Perte d'activité de 67 à 95 p.100	Δ	Perte d'activité de 67 à 95 p.100

N = Nombre d'observations total ; Δ = Variation avant et après conservation (intervalles à  $P < 0,05$ ).

TABLEAU N°II-Variation du nombre de bactéries aéro-anaérobies du 8e au 180e jour.

Conservation	Durée	8e j	30e j	60e j	90e j	120e j	150e j	180e j
		N						
- 20°	N	28	4	4	-	4	-	4
	Δ	Perte de $10^{1,8}$ à $10^{2,5}$	Perte de $10^2$ à $10^{2,6}$	Perte de $10^{1,9}$ à $10^{2,7}$	-	Perte de $10^{2,5}$ à $10^3$	-	Perte de $10^{3,2}$ à $10^{4,1}$
- 19°	N	5	4	4	-	4	-	4
	Δ	Perte de $10^1$ à $10^{1,2}$	Perte de $10^1$ à $10^{1,2}$	Perte de $10^1$ à $10^{1,3}$	-	Perte de $10^{1,5}$ à $10^2$	-	Perte de $10^{1,8}$ à $10^{2,5}$
Lyophilisation	N	5	4	4	4	4	4	4
	Δ	Perte de $10^{1,2}$ à $10^{1,8}$	Perte de $10^{1,5}$ à $10^{2,2}$	Perte de $10^{1,3}$ à $10^{2,1}$	Perte de $10^{1,8}$ à $10^{2,5}$	Perte de $10^{2,1}$ à $10^{2,8}$	Perte de $10^2$ à $10^{2,9}$	Perte de $10^{2,5}$ à $10^{3,5}$

b) conservation à - 70° en présence de 10 p. 100 de glycérol,

c) dessiccation à + 37° (\*).

3) *En pratique* : Ce serait donc la conservation à - 20° qui serait à la fois la plus facile

à mettre en œuvre et la moins onéreuse, tout en restant l'une des plus efficaces.

Ces résultats confirment les règles générales établies sur la conservation des cellules vivantes (7) et en particulier certaines analyses de microflore du rumen desséchées (5, 6, 9) réfrigérées (1) ou lyophilisées (8) ainsi que les valeurs déterminées chez d'autres zébus tropicaux (2).

(\*) On remarquera que, dans les deux types d'analyses, nous avons écarté les résultats concernant la conservation à + 4°. On peut en effet constater qu'elle autorise le développement d'une « seconde vague » bactérienne, protéolytique, qui bouleverse totalement l'équilibre original et rend l'échantillon inutilisable.

On constatera que, même en utilisant la meilleure méthode, la perte en micro-organismes reste très élevée (puisque'elle peut dépasser

99 p. 100) de même que celle de son potentiel enzymatique (puisque'elle peut atteindre 95 p. 100 dans le cas de la cellulolyse). Ceci limite, à l'évidence, l'efficacité des échantillons traités.

On conçoit que l'emploi d'inoculum conservé (par dessiccation en particulier) ait conduit beaucoup d'expérimentateurs à des déboires

lorsqu'ils n'ont pas corrigé les doses employées par rapport aux doses de microflore fraîche normalement requises.

La solution logique serait, soit d'augmenter la quantité de microflore conservée, soit de lui permettre de se remultiplier *in vitro* (dans un milieu de culture convenable) avant emploi.

## SUMMARY

### Methods for conserving rumen micro-organisms *in vitro*

Experiments were conducted to determine the best methods for conserving rumen microflora, in order to reuse it to improve digestibility when diet is modified. Tests were made on conservation by freezing at  $-196^{\circ}\text{C}$ , at  $-70^{\circ}\text{C}$  with 10 p. 100 glycerol, freeze-drying, refrigeration at  $4^{\circ}\text{C}$ , drying at  $37^{\circ}\text{C}$  and freezing at  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Because of the number of surviving bacteria and their ability to produce volatil fatty acids, the last method alone seems to be at the same time efficient and practical.

## RESUMEN

### Metodos de conservación *in vitro* de la población microbiana de la panza

Se efectuaron experiencias para determinar los mejores metodos de conservación de la microflora de la panza con el fin de utilizarla de nuevo para mejorar la digestibilidad cuando se cambia de regimen alimenticio.

Las pruebas concernian la conservación a  $196^{\circ}$ ; a  $-70^{\circ}$  con 10 p. 100 de glicerol, por liofilización, por refrigeración, desecación a  $37^{\circ}$ , por congelación a  $-20^{\circ}$ .

Según et número de bacterias supervivientes y su capacidad de producción de ácidos grasos volátiles, solo el último método parece a la vez el muy eficaz y el muy práctico.

## BIBLIOGRAPHIE

1. BLADEN (H. A.), DOETSCH (R. N.). Physiological activities of rumen mixed cell suspensions. *J. Agric. Food Chem.* 1959 (7) : 791-794.
2. BLANCOU (J.), RAZAFINDRAMANANA (J.). Contribution à l'étude de la population microbienne des zébus malgaches. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1974, 27 (3) : 265-269.
3. BONHOMME-FLORENTIN (A.). — Les ciliés oligotriches, les bactéries du rumen et la digestion de la cellulose. *Protistologica*, 1970, 6 (4) : 383-388.
4. EADIE (J. M.), GILL (J. C.). The effect of the absence of rumen ciliate protozoa on growing lambs fed on a roughage-concentrate diet. *Brit. J. Nutr.*, 1971, 26 (2) : 155-167.
5. EDDS (G. T.), KIRKHAM (W. W.), WANG (Y.), HOLDEN (C. A.). Viability of rumen bacteria. *Vet. Med., U. S. A.*, 1968, 63 (1) : 50-52.
6. HUNGATE (E. R.). The rumen and its microbes. New York, Academic Press, 1966.
7. MAZUR (A.). Physical and chemical basis of injury in simple-celled micro-organisms subjected to freezing and thawing in cryobiology. New York, Academic Press, 1966.
8. PHILLIPS (B. A.), LATHAM (M. J.), SHARPE (M. E.). A method for freeze-drying rumen bacteria and other strict anaerobes. *J. Appl. Bact.*, 1975, 38 (3) : 319-322.
9. TUTTOBELLO (L.), VALFRE (F.), MACRI (A.). Controllo d'ell'attivitè e osservazioni sulla flora microbica di campioni di contenuto del rumine essiccato. *Att. Soc. ital. Sci. vet.* 1967 (21) : 481-484.
10. WOLTER (R.). L'azote non protéique dans l'alimentation des ruminants. *Rev. Méd. vét.*, 1974, 125 (6) : 761-779.