

CARACTÉRISATION MICROBIOLOGIQUE
DES COMPOSTS
À BASE DE RÉSIDUS CHITINEUX

par

Philippe Leclerc

Mémoire présenté au département de Biologie
en vue de l'obtention du diplôme du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DES SCIENCES
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, Février 1997



National Library
of Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque nationale
du Canada

Acquisitions et
services bibliographiques

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

Our file Notre référence

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-21788-4

SOMMAIRE

La chitine, qui est le constituant majeur des exosquelettes d'insectes et des carapaces d'invertébrés marins, est un polymère abondant et répandu sur toute la surface de la terre. En région maritime, l'industrie de la transformation des pêcheries génèrent annuellement plusieurs milliers de tonnes de résidus chitineux (carapaces de crevettes, crabes, homards) qui sont simplement enfouis dans le sol ou rejetés à la mer. Ces rejets massifs créent souvent de graves problèmes de pollution en bordure des sites de production. Le compostage de ces résidus en présence d'autres intrants pourrait permettre la revalorisation de cette biomasse chitineuse tout en offrant un produit final ayant des caractéristiques fertilisantes et phytoprotectrices. Les trois principaux intrants utilisés ont été les carapaces de crevettes, la tourbe et les sciures de bois.

Cette étude fait partie d'un tout où chaque aspect de la faisabilité d'un tel compost, de son élaboration jusqu'à sa production à grande échelle, ont été étudiés par diverses branches de la biologie, du génie et des sciences humaines. Dans ce travail, nous avons privilégié l'étude des variations des populations bactériennes au cours du processus de compostage en mettant l'accent sur les groupes capables de l'hydrolyse de la chitine et de la cellulose qui sont deux polymères abondants dans nos composts. La méthode de dénombrements des cellules viables sur boîtes de Pétri a été la principale technique utilisée. Puis sont venues se greffer une technique de dénombrement direct en utilisant un fluorochrome et une technique d'extraction et d'analyse des acides gras microbiens du compost.

Les populations bactériennes totales, cellulolytiques et chitinolytiques varient au cours du compostage sous l'influence de certains facteurs environnementaux ou selon le fait que le compost soit amendé ou non. Les populations bactériennes diminuent pendant la phase thermophile mais sont fortement stimulées par des amendements en carapaces de crevettes en cours de compostage. Les variations des populations bactériennes cellulolytiques et chitinolytiques sont identiques dans presque tous les essais de compostage. Certaines bactéries du genre *Streptomyces* prolifèrent dans les composts à

partir du milieu de la phase thermophile et deviennent ensuite majoritaires pendant la maturation des composts. Au niveau microbiologique, l'utilisation des sciures de résineux en remplacement des sciures de feuillus ne semble pas affecter la microflore quant à son nombre. Il a aussi été démontré que le fait d'ajouter les carapaces de crevettes seulement plus tard au cours du processus ne nuit pas à leur dégradation par les microorganismes. Ceci pourrait offrir la possibilité d'amender des composts matures et stabilisés afin de leur conférer les propriétés désirées. L'analyse des acides gras fournit notamment de précieux renseignements sur les populations d'actinomycètes et de champignons présentes dans les composts. On note une importante prolifération de champignons pendant la phase thermophile qui est ensuite suivie d'une baisse drastique après les amendements en chitine.

REMERCIEMENTS

Je voudrais tout d'abord remercier ma directrice de recherche , le docteur Carole Beaulieu, qui a su m'encourager, me motiver et me stimuler pendant mes travaux de recherches. Elle a été d'un grand support moral et sa grande disponibilité à tous moments a été fort appréciée. Je voudrais aussi remercier le C.O.R.P.A.Q. pour son support financier.

Je tiens à mentionner ma reconnaissance envers mes conseillers, les docteurs Claude Déry et Ryszard Brzezinski pour leur précieuse collaboration.

Un merci à Gilles Grondin et Jean-Pierre Marier pour leur appui dans l'élaboration de certains protocoles.

Un grand merci à tous mes collègues de travail avec qui j'ai beaucoup appris; un apprentissage qui s'est effectué dans une atmosphère détendue. On aura bien rigolé et les taquineries ne nous aurons pas empêché de réaliser nos objectifs de recherche.

Je voudrais aussi remercier ma famille; mon père Pierre, ma mère Danielle et ma soeur Sophie pour leur soutien et leurs mots d'encouragement durant ces deux dernières années.

Enfin un merci bien spécial à ma copine Isabelle pour sa compréhension, son attention et le temps qu'elle m'a consacré même dans les moments difficiles afin de parvenir jusqu'à mes fins.

Merci à mon île qui m'a permis de m'évader et de me ressourcer tout au long de mon chemin...

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE.....	ii
REMERCIEMENTS.....	iv
TABLE DES MATIÈRES.....	v
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
LISTE DES FIGURES.....	ix
INTRODUCTON.....	1
CHAPITRE 1-MATÉRIEL ET MÉTHODES	17
1.0 Le compostage.....	17
1.1 Suivi des populations microbiennes.....	21
1.1.2 Technique de dénombrements des bactéries viables sur boîtes de Pétri.....	21
1.1.3 Dénombrement direct des bactéries totales avec l'utilisation d'un fluorochrome.....	22
1.1.4 Extraction et analyse des acides gras microbiens.....	23
CHAPITRE2- RÉSULTATS.....	26

2.1 Décomptes des populations bactériennes viables dans des composts non-amendés et amendés de carapaces de crevettes.....	26
2.2 Comparaison entre le dénombrement des bactéries totales viables et le dénombrement direct des bactéries totales avec l'utilisation d'un fluorochrome.....	39
2.3 Profil des acides gras microbiens retrouvés au cours du compostage.....	39
CHAPITRE 3- DISCUSSION.....	46
CONCLUSION.....	55
BIBLIOGRAPHIE.....	57

LISTE DES ABRÉVIATIONS

min:	minute
sec:	seconde
m:	mètre
cm:	millimètre
mm:	millimètre
µm:	micromètre
l:	litre
ml:	millilitre
µl:	microlitre
g:	gramme
M:	molaire
°C:	degré Celsius
g:	gravité
%:	pourcentage
UFC:	unité formatrice de colonie
ADN:	acide désoxyribonucléique
ATP:	adénosine triphosphate
PCR:	polymerase chain reaction
NAG:	N-acétylglucosamine
C/N:	rapport Carbone/Azote
RPM:	rotations par minute
C.R.I.Q.:	Centre de Recherche Industrielle du Québec
°C:	degré Celsius

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Liste des composts analysés dans cette étude.....	19
Tableau 2: Pourcentage des acides gras microbiens pour le compost non amendé CT ₂ S(R) ₂ f....	42
Tableau 3: Pourcentage des acides gras microbiens pour le compost amendé CT ₂ S(R) ₂ g.....	43

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Patrons de températures imposées pendant les différents essais de compostage.....	18
Figure 2: Dénombrement des populations bactériennes viables dans des composts CTS(F) et CT ₂ S(F) ₂ non amendé	27
Figure 3: Dénombrement des populations bactériennes viables dans des composts amendés CTS(F) et CT ₂ S(F) ₂	28
Figure 4: Dénombrement des populations bactériennes viables dans des composts amendés CTS(F) et CT ₂ S(F) ₂	29
Figure 5: Dénombrement des populations bactériennes viables dans des composts CT ₂ S(F) ₂ amendés et non amendés	31
Figure 6: Dénombrement des populations bactériennes viables dans des composts CT ₂ S(R) ₂ amendés et non amendés	32
Figure 7: Dénombrement des populations bactériennes viables dans des composts CT ₂ S(R) ₂ amendés et non amendés	33
Figure 8: Dénombrement des populations bactériennes viables dans des composts CT ₉ S(R) ₉ amendés et non amendés	34

Figure 9: Dénombrement des populations bactériennes viables dans des composts sans carapaces de crevettes dans leurs compositions initiale.....	36
Figure 10: Dénombrement des populations bactériennes viables dans un compost commercial Aquaterre amendé et non-amendé.....	37
Figure 11: Dénombrement des populations bactériennes viables dans un compost à base de feuilles mortes amendé et non amendé.....	38
Figure 12: Dénombrement des bactéries totales viables et des bactéries totales avec l'utilisation d'un fluorochrome.....	40
Figure 13: Étude du rapport des acides gras branchés et non-branchés au cours du compostage.....	44
Figure 14: Étude du rapport des acides gras fongiques sur les acides gras bactériens au cours du compostage.....	45

INTRODUCTION

Le compostage

Nous vivons dans un monde où l'industrialisation est en constant essor. Ce phénomène nous a poussé à abuser des ressources disponibles et à consommer de façon démesurée. Les hommes ont trop longtemps pensé en terme de profits sans se soucier des torts causés à l'environnement. Les effets de cette production industrielle massive et de cette consommation abusive sont trop souvent la génération de grandes variétés et quantités de déchets. Comme le dit Mustin (1987), on a qu'à penser aux boues usées produites par les stations d'épuration des eaux, aux industries extractives ou aux industries qui rejettent des polluants dans l'atmosphère ou dans l'eau, aux déchets agricoles, agroalimentaires et forestiers, et, plus près de nous, aux ordures ménagères pour constater que les déchets et résidus abondent. Fort heureusement, depuis quelques années, des mesures ont été prises afin de diminuer la quantité de déchets générés et de recycler une partie de ceux-ci. Une des solutions pour la revalorisation des déchets organiques est le compostage.

Le compostage est un processus biologique contrôlé de conversion et de revalorisation des substrats organiques (sous-produits de la biomasse, déchets organiques d'origine biologique, etc.) en un produit organique stable, hygiénique, semblable à un terreau riche en composés humiques que l'on nomme le compost (Mustin, 1987). Dans la majorité des cas, le compostage est le fruit d'une activité microbienne aérobie intense (Blaine, 1993). Le compostage comporte plusieurs applications. Il est important dans le traitement et la revalorisation des déchets organiques. Son produit, le compost, peut être utilisé comme amendement à un sol (horticulture) où il peut servir comme substrat sélectif (culture de champignons) (Blaine, 1994). La culture dite biologique et la réduction de l'emploi des engrais chimiques gagnent de plus en plus en popularité auprès des agriculteurs. Cependant, même si le compost est un bon conditionneur de sol car il apporte des nutriments aux plantes, il peut rarement compétitionner avec les engrais de synthèse. Par contre,

le compost a un avantage sur les engrais de synthèse car en plus de sa valeur fertilisante, il apporte au sol de la matière organique, ce qui peut limiter l'érosion des sols (Mustin, 1987; Atlas et Bartha, 1993).

Il existe différentes techniques de compostage, dépendamment des déchets ou biomasses à composter et du type d'installation dont on dispose. On peut tout d'abord composter en tas, de forme conique ou pyramidale (Blaine, 1993) ou en andain. Il s'agit d'un tas de compost qui a un maximum de 3 mètres de haut et qui peut avoir plusieurs mètres de longueur. On peut aussi composter en fosse, dans un trou au niveau du sol aménagé à cet effet. Pour ces 3 premières techniques, l'aération peut être soit forcée par un système de ventilation ou mécanique par brassage et retournement du tas de compost. Finalement, le compostage peut être effectué en silo-couloir ou en fermenteur (Mustin, 1987).

Facteurs influençant le compostage

La température

Comme il a été dit plus haut, le processus de compostage est le fruit d'une activité microbienne intense (Blaine, 1993). Les réactions de biodégradation et d'oxydations partielles de la matière organique qui ont lieu à l'intérieur d'un compost ont pour effet de produire de la chaleur qui est conservée à l'intérieur du tas de compost (Mustin, 1987). La température peut varier énormément durant le compostage; pendant les phases mésophiles, les températures peuvent être de 20 à 30°C alors que pour les phases thermophiles, les températures grimpent jusqu'à 50 à 70°C et parfois davantage (Suler et Finstein, 1977). La plus haute température enregistrée lors d'un processus de compostage est de 82°C (Finstein et al., 1986). Les températures élevées sont une des caractéristiques des systèmes en compostage et signifient la présence d'une grande activité métabolique microbienne et donc d'une grande vitesse de décomposition des substrats.

Lorsque la température du compost est inférieure à 20°C, la vitesse de décomposition est lente mais lorsqu'elle grimpe au dessus de 20°C, la vitesse de décomposition augmente rapidement (Blaine, 1993). Parce que l'activité microbienne est fortement influencée par la température, plusieurs chercheurs se sont penchés sur la question de la température optimale pour le compostage (Jeris et Regan, 1973; MaxGregor et al., 1981; McKinley et Vestal, 1984; Nakasaki et al., 1985; Suler et Finstein, 1977). Les réponses étaient assez variables et se situaient entre 35 et 65°C dépendamment des biomasses compostées. Cependant, le taux de décomposition est maximal lorsque la température se situe entre 50°C et 60°C. La température est un facteur sélectif très puissant (Atlas et Bartha, 1993). Les hausses de températures ont de grandes influences sur les populations microbiennes qui deviennent vulnérables lorsque celles-ci excèdent leurs températures optimales de croissance (Mustin, 1987). Les hautes températures sont bénéfiques car elles permettent l'élimination des microorganismes pathogènes (salmonelles, streptocoques fécaux, coliformes fécaux, etc) dans les composts (Blaine, 1993; Burge et al., 1978; Savage et al., 1973; Wiley et Westerberg, 1969).

L'humidité

L'humidité est un facteur physique très important mais souvent négligé dans les processus de compostage (Mustin, 1987). L'eau est essentielle pour les besoins physiologiques des microorganismes, pour les milieux de colonisation bactérienne et comme milieu pour les échanges gazeux. Il s'agit d'un facteur limitant la colonisation microbienne si elle est trop grande ou trop faible. L'humidité optimale est souvent définie comme étant le taux d'humidité maximal qui ne restreint pas la présence et la diffusion de l'O₂ essentielle pour la respiration des microorganismes dans le compost (Blaine, 1993; Mustin, 1987). La teneur en eau optimale d'un compost dépend surtout des biomasses à composter et de leur capacité de rétention d'eau (Mustin, 1987; Blaine, 1993; Suler et Finstein, 1977). La teneur en eau a tendance à diminuer pendant le compostage (perte sous forme de vapeur d'eau) sous l'action conjuguée de la montée

de température, du brassage et retournement du compost ou de l'aération par ventilation (Mustin, 1987). Une teneur en eau sous la barre des 40-45% peut devenir un facteur limitant surtout en ce qui a trait à la survie des populations de microorganismes (Miller, 1989; Mustin, 1987). En général, pour les biomasses les plus souvent rencontrées en compostage, une teneur en eau entre 55 et 75% s'avère adéquate (Blaine, 1993).

L'aération

La production de chaleur et le taux de décomposition sont affectés par la quantité d'oxygène. En général, des conditions anaérobies ne sont pas souhaitables durant le compostage même si certains processus particuliers de compostage ont lieu en absence d'oxygène (Gray et al., 1971). Dans le sol, des conditions aérobies et anaérobies peuvent coexister à proximité l'une de l'autre. Le même phénomène peut être rencontré dans les composts surtout si les composts sont trop humides ou mal aérés (Greenwood, 1961). Les conditions anaérobies amènent la formation de métabolites intermédiaires qui occasionnent des problèmes durant le compostage. On parle ici d'acides organiques volatiles (propanoïque et butanoïque), de composés soufrés et azotés (Blaine, 1993), et d'autres composés (phénols, indoles, mercaptans) causant de sérieux problèmes d'odeurs (Mathur et al., 1986). Ces odeurs peuvent également attirer des insectes indésirables (Mathur et al., 1986). Certains acides organiques produits en condition anaérobies sont toxiques pour les plantes. Les composts contenant ces acides peuvent demeurer phytotoxiques pour plusieurs années (Hoitink, 1980). Le produit final du compostage en conditions anaérobies est donc souvent très peu fertilisant (Blaine, 1993). L'aération des composts est très importante pour éviter tous les problèmes occasionnés par un manque en O_2 . La diffusion de l' O_2 dépend entre autres de la porosité des substrats, de la grosseur des particules, du pourcentage d'humidité, etc. (Blaine, 1987). Il est donc important que les systèmes de compostage soient construits afin d'avoir une ventilation forcée (Goldstein, 1988) ou qu'une bonne méthode d'aération mécanique soit effectuée afin d'assurer des conditions aérobies adéquates (Mustin, 1987).

Le pH

Le pH est un paramètre important et déterminant pour composter avec succès car les bactéries, et, plus particulièrement, le groupe des actinomycètes, sont très sensibles aux pH acides ($\text{pH} < 7$) (Blaine, 1993). Dans la section précédente, nous avons vu que les conditions aérobies sont essentielles pour produire un compost de qualité. Sous des conditions anaérobies, le pH du compost peut descendre très bas à cause de la production d'acides organiques. Ainsi, la croissance de plusieurs populations microbiennes est inhibée et par le fait même il y a un important ralentissement de la biodégradation (Blaine, 1993; Mustin, 1987). Un pH trop bas au départ peut ralentir le processus de décomposition (Jeris et Regan, 1973; Shulze, 1962). Le pH varie habituellement de 6 à 9 dans les composts. Normalement, le pH augmente au cours du compostage dû à l'ammonification ($\sim 8,5$), c'est-à-dire la production d'ammonium lors des différentes réactions métaboliques. Après la phase d'ammonification, le pH redescend et se stabilise autour de 7,5-8,0 (Blaine, 1993).

Les substrats

Avant de préparer un mélange à composter, il faut analyser particulièrement chaque intrant ou biomasse qui prendra part au processus. Il faut penser à faire des mélanges qui ne sont pas trop denses pour que l'aération puisse être adéquate. Un mélange de biomasses qui sont trop liquides risquent de produire des lixiviats auxquels sont souvent associés des problèmes d'odeurs et de contamination des nappes d'eau (Mathur et al., 1985;1986). L'emploi d'agents structurants comme les copeaux de bois, la paille ou de l'écorce est fortement recommandé lorsque le mélange à composter comporte des résidus animaux. Ces agents permettent d'augmenter la porosité (interstices) du compost afin de permettre une meilleure aération (Blaine, 1993). Le choix des bons intrants et dans les bonnes proportions permet habituellement d'effectuer le compostage sur

une période de temps plus courte (Randle et Flegg, 1985). La composition du substrat est un facteur limitant pour les besoins nutritifs qui varient grandement chez les microorganismes. Plusieurs types de bactéries préfèrent les acides aminés ou autres substrats azotés alors que d'autres préfèrent les substrats hautement carbonés (Blaine, 1993). Un paramètre très important à considérer pour le substrat est donc son rapport du carbone sur l'azote (C/N) (Mustin, 1987). Les composés comme la cellulose ont un C/N très élevé alors que les résidus animaux ont C/N bas car ils contiennent beaucoup d'azote. Il est important de créer un équilibre entre les différentes biomasses que l'on veut composter pour ne pas avoir de surplus ou de carence en éléments essentiels (Mustin, 1987). Le carbone est le principal constituant des composés organiques. Pendant la dégradation aérobie, les microorganismes consomment de 15 à 30 fois plus de carbone que d'azote. Les bactéries peuvent utiliser un substrat ayant un C/N de 10 ou 20 et les champignons un C/N de 150 ou 200. Cependant, il a été démontré que les meilleurs rapports se situaient entre 30:1 et 50:1. Le C/N décroît au fur et à mesure que le processus de compostage avance et se stabilise habituellement autour de 10 (Mustin, 1987).

La chitine

Dans ce projet interdisciplinaire, nous étudions différents aspects du compostage de résidus chitineux. La chitine est le polymère le plus répandu dans la nature après la cellulose. Ce polymère hautement hydrophile est présent dans la cuticule ou exosquelette des insectes, dans la paroi des champignons et de certaines algues chlorophycées, mais surtout dans les carapaces d'invertébrés marins et d'eau douce comme les crevettes, crabes, homards, krill (Pennisi, 1993 ; Seng 1988; Jeunieux et al., 1989). C'est ce polymère qui donne une structure rigide aux différentes carapaces. La chitine, et par conséquent, les différents organismes qui la synthétisent sont présents dans de très nombreux écosystèmes autant terrestres qu'aquatiques. C'est ce qui explique la présence dans le sol ou dans l'eau de microorganismes qui sont aptes à décomposer la chitine (Dupuy, 1991).

La chitine est le constituant majeur des carapaces de crustacés (60-80%). Ces carapaces renferment aussi des protéines et des sels inorganiques. Les carapaces de crustacés, essentiellement crevettes et crabes, sont d'ailleurs la source de chitine la plus facilement exploitable (Jeunieux et al., 1989; Seng, 1988). La chitine est un carbohydrate polymérique dont l'unité de base est un aminosucre, la N-acétylglucosamine. Dans la molécule de chitine, les monomères sont liés par des liens glycosidiques β 1-4. Il s'agit donc d'un composé dont la structure se rapproche de celle de la cellulose (Sanford, 1989). Certains microorganismes produisent des enzymes extracellulaires capables d'hydrolyser la chitine sous différentes formes. Les endo-chitinases hydrolysent le polymère de façon aléatoire pour produire des dimères et des trimères de N-acétylglucosamine tandis que les exo-chitinases hydrolysent la chitine de haut poids moléculaire en produisant uniquement des dimères de NAG. Finalement, les N-acétylglucosaminidases aussi appelées chitobiases ou N-acétyl hexoaminidases hydrolysent les dimères de NAG et parfois le NAG des extrémités non-réductrices des chaînes de chitine. Ceci produit des monomères de NAG (Shaikh et Deshpande, 1993). Le NAG, qui est le produit final de l'hydrolyse de la chitine, est un aminosucre très riche en énergie et en azote et peut donc être facilement assimilé par la majorité des microorganismes.

La chitine peut aussi se retrouver, quoique plus rarement, sous une forme partiellement déacétylée que l'on nomme le chitosane. Ce chitosane est en fait un composant de la paroi des champignons de la classe des Zygomycètes. Il est possible d'extraire la chitine des carapaces de crustacés en les broyant et en faisant un traitement déprotéinisant et déminéralisant. Ensuite, une simple déacétylation de la chitine permet d'obtenir du chitosane (Sanford, 1989; Seng, 1988). Le chitosane peut être hydrolysé par des enzymes comme les chitosanases et les glucosaminidases (Boucher et al., 1992). Le produit final de l'hydrolyse est évidemment la D-glucosamine, un aminosucre qui est aussi facilement utilisable par les microorganismes.

Les microorganismes possédant des chitinases appartiennent surtout aux groupes des bactéries

gram-positives comme les actinomycètes et les bactéries du genre *Bacillus* mais certaines bactéries gram-négatives (*Serratia*, *Aeromonas*) possèdent aussi des chitinases (Perrakis et al., 1993).

La chitine, le chitosane et les oligomères issus de leur dégradation ont des propriétés biologiques fort intéressantes. Ils peuvent en effet agir comme éliciteurs des mécanismes de défense des plantes envers certains agents phytopathogènes (Hadwiger et al., 1994; Kendra et Hadwiger, 1984; Kendra et al., 1989). Les produits intermédiaires de dégradation de la chitine et du chitosane (oligomères) exercent aussi une action fongistatique en limitant la croissance d'un bon nombre de champignons phytopathogènes comme *Alternaria*, *Rhizopus*, *Fusarium*, *Venturia*, *Rhizoctonia*, *Botrytis*, etc. (Allan et Hadwiger, 1979; Hirano et Nagao, 1989).

Les industries de transformation des pêches situées en bordure des côtes génèrent à chaque année plusieurs millions de tonnes de carapaces d'invertébrés marins riches en chitine. Ces résidus chitineux sont soit rejetés à la mer, créant un problème de pollution autour des usines, ou simplement enfouis dans le sol (Seng, 1988; Pennisi, 1993; Mathur et al., 1985; 1986). Dans certains pays (Japon, Etats-Unis etc.), les résidus chitineux commencent à être revalorisés. Des usines d'extraction et de production de la chitine et du chitosane ont été mises sur pied. On utilise ces produits ou leurs dérivés notamment en agriculture, dans l'industrie des cosmétiques, dans l'alimentation, dans le domaine de la santé, dans le traitement des déchets, etc. (Hirano, 1989; Sandford, 1989). Le marché potentiel de ces produits aux Etats-Unis seulement serait de l'ordre de plusieurs centaines de millions de dollars par année (Seng, 1988).

Chitine et compostage

Etant donné l'omniprésence de la microflore chitinolytique dans différents écosystèmes (Dupuy, 1991), les résidus chitineux provenant des carapaces d'invertébrés marins ne doivent pas

représenter une biomasse difficile à composter. Au Nouveau-Brunswick, l'équipe de Mathur (1985; 1986; 1988) a étudié la possibilité de composter des résidus de poisson en combinaison avec des carapaces de crabes, des algues marines et parfois de la tourbe. Au Maryland, des essais de compostage avec des carapaces de crabes et des sciures de bois (Brodie, 1994) ou de la paille (Cathcart, 1986) ont été réalisés. Toutes ces études en sont arrivées aux mêmes conclusions soit que les résidus chitineux peuvent être compostés efficacement. Les composts produits à partir de résidus chitineux avaient un pouvoir fertilisant de pauvre à très bon dépendant des biomasses compostées avec les carapaces de crustacés.

Les carapaces de crustacés marins, une biomasse composée en grande majorité, de chitine, de protéines et de sels inorganiques (Jeuniaux, 1989; Seng, 1988) ne représentent pas un mélange équilibré d'un point de vue nutritionnel pour obtenir un taux de décomposition microbien optimal. Les carapaces de crustacés sont trop riches en azote. Le mélange de chitine et protéines résiduelles retrouvées sur les carapaces possèdent un C/N inférieur à 8:1 (Brodie et al., 1994). De plus, la composition minérale en phosphore, en potassium et en magnésium est très pauvre. Il faut donc penser à composter cette biomasse en présence d'autres biomasses comme la tourbe, les copeaux ou sciures de bois, la paille et les feuilles mortes qui ont un C/N très élevé. Ainsi, la composition initiale d'un mélange bien balancé permettra d'atteindre un équilibre nutritionnel pour favoriser un taux de dégradation maximal.

Microbiologie des composts

La microbiologie du compostage est complexe dans sa description à cause des grandes variations des populations suite aux changements physico-chimiques (pH, température, etc.) (Blaine, 1993). Jusqu'à maintenant, peu d'études se sont penchées sur ce sujet (Blaine, 1993). Aucune recherche n'a d'ailleurs été effectuée sur la microbiologie des composts à base de résidus chitineux. En ce qui a trait à la caractérisation microbiologique des composts, les chercheurs ont souvent mis

l'emphase sur des groupes particuliers de microorganismes. Finstein et Morris (1975) ont fait une revue générale de la microbiologie du compostage afin d'identifier les principaux microorganismes participant au compostage. Les microorganismes sont présents en très grands nombres dans tous les substrats destinés à être compostés et, par conséquent, l'inoculation de microorganismes pour initier le compostage s'avère souvent inutile (Mustin, 1987). Au départ du processus de compostage, la température du compost dépend de la température ambiante (Mustin, 1987). Le processus de compostage est initié par des microorganismes hétérotrophes mésophiles (Atlas et Bartha, 1993). La première phase du compostage est une phase de dégradation. Elle est caractérisée par une très forte activité microbienne (surtout des bactéries) qui dégradent les composés les plus facilement biodégradables comme les protéines, les lipides et les glucides (Mustin, 1987). Suite au métabolisme microbien, la température du compost s'élève et peut atteindre des températures variant de 50 à 80°C (Mustin, 1987; Suler et Finstein, 1977). Au fur et à mesure que les températures augmentent, les populations de microorganismes thermophiles succèdent aux populations mésophiles (Atlas et Bartha, 1993). Cette phase thermophile dure peu de temps et est suivie par une diminution lente de la température (Mustin, 1987). Ensuite, on entre dans la deuxième phase du compostage qui est une phase de maturation. Il y a ralentissement de l'activité microbienne dû au manque de substrats facilement assimilables. Il ne reste habituellement que des composés plus difficiles à dégrader comme la lignine ou la cellulose. Il y a donc attaque de ces gros polymères par les microorganismes possédant les enzymes pouvant les hydrolyser. Il s'agit donc d'une phase où la compétition et les inhibitions sont plus marquées (Mustin, 1987). Les principaux groupes de microorganismes responsables du compostage sont les bactéries, les actinomycètes et les champignons. Les actinomycètes sont des bactéries mais ils sont souvent traités séparément (Blaine, 1993).

Les champignons

Les champignons sont souvent retrouvés dans les systèmes en compostage dans la phase de maturation lorsque la température est plus basse et que les seuls substrats disponibles sont des polymères complexes. Ceux-ci préfèrent des conditions aérobiques et peuvent croître à une large gamme de pH (2-9). Même si certains champignons (*Geotrichium candidum*, *Aspergillus fumigatus*, *Thermoascus aurantiacus*, *Torula thermophila*) peuvent croître à des températures au dessus de 50°C (Finstein et Morris, 1975), la plupart des champignons sont sensibles à une trop forte augmentation de température et par conséquent ne se développent pas durant la phase thermophile (Blaine, 1993).

Les actinomycètes

Les actinomycètes sont pour la plupart des bactéries filamenteuses qui produisent des spores. Leurs spores ne sont pas aussi résistantes que les endospores bactériennes mais elles leur permettent de survivre à une dessiccation prolongée (Mc Carthy et Williams, 1991). Ces bactéries sont aérobies et neutrophiles, c'est-à-dire que leur croissance est meilleure à des pH neutres ou légèrement alcalins (Blaine, 1993; Mustin, 1987). Plusieurs genres d'actinomycètes croissent à des températures de 50-60°C et sont donc considéré comme étant thermophiles (*Thermomonospora*) (Atlas et Bartha, 1993). Les actinomycètes peuvent utiliser une grande variété de substrats carbonés (Mc Carthy et Williams, 1991) et sont bien connus pour leur capacité à sécréter des enzymes extracellulaires dégradant de grands polymères. On parle ici de la lignine, de la cellulose, de l'hémicellulose, de la pectine et de la chitine (Mc Carthy, 1987; Zimmermann et Broda, 1989). Les actinomycètes se développent surtout dans les phases de maturation du compost alors qu'il ne reste que des polymères comme la cellulose ou la lignine dans les composts. Les genres *Streptomyces* et *Nocardia* représentent environ 90% de la biomasse des actinomycètes présents dans le compost. Les actinomycètes sont souvent associés

aux odeurs aromatiques du sol ou des composts matures (Mustin, 1987).

Les bactéries

Les bactéries ont été moins étudiées que les actinomycètes ou les champignons mais ce n'est pas parce qu'elles sont de moindre importance. Il a été démontré que, dans des composts à base de sciures et de boues de stations d'épuration et sous des conditions idéales, les activités de biodégradation intense suivie de la montée de température dans les premiers jours de compostage étaient essentiellement dues aux bactéries (Miller et Finstein, 1985; Strom, 1985). Des températures de 60-80°C sont souvent obtenues dans la première semaine du compostage laissant ainsi la place aux bactéries thermophiles. Mais quand les températures redescendent après quelques jours, les microorganismes mésophiles qui ont survécu à la montée de température (thermotolérance ou spores) reprennent le dessus. Dans des composts où la phase thermophile est maintenue artificiellement à 50-60°C pendant plusieurs jours, des bactéries du genre *Bacillus* constituent la majorité des bactéries isolées. Cependant, lorsque la température d'incubation atteint 65°C, *Bacillus stearothermophilus* est la seule espèce représentée (Strom, 1985). Certaines bactéries thermophiles dont *Bacillus steathermophilus*, et *Clostridium thermocellum* sont dominantes dans les composts (Atlas et Bartha, 1993).

Les techniques permettant l'étude microbiologique des composts

Deux types d'informations sont plus prisées en ce qui a trait aux microorganismes du compost; premièrement, leur quantité (nombre) ou leur biomasse (exprimée en unité/volume ou masse) et deuxièmement, leur identification taxonomique au niveau de la classe, du genre et de l'espèce (Mustin, 1987). Il existe donc des techniques qui permettent de dénombrer les microorganismes ou qui permettent de calculer leur biomasse et leur activité métabolique. Certaines techniques

permettent aussi de détecter spécifiquement des groupes de microorganismes particuliers (Atlas et Bartha, 1993).

Dénombrement des microorganismes

Pendant longtemps, la technique qui a été utilisée pour les dénombrements des cellules microbiennes viables, était celle qui consistait à diluer un échantillon de compost puis à l'étaler sur différents milieux de culture (Atlas et Bartha, 1993). Cette technique permet d'utiliser toutes sortes de variantes au niveau de la composition du milieu, de la température et de la durée de l'incubation. Ainsi, pour des dénombrements de microorganismes totaux, on utilise des milieux riches en nutriments, contenant plusieurs sources de carbone et d'azote qui permettra la croissance d'un maximum de microorganismes. Pour dénombrer des populations spécifiques, on utilise des milieux sélectifs ou différentiels qui permettent seulement la croissance des organismes voulus ou qui permettent la différenciation de certains microorganismes croissant sur le milieu de culture (Atlas et Bartha, 1987). Les milieux solidesensemencés sont incubés pendant une période de temps qui permet aux bactéries de l'échantillon de se multiplier et de former des colonies visibles à l'oeil. Les décomptes sont obtenus en comptant chaque colonie qui représente dans la plupart des cas la croissance d'une seule cellule (Atlas et Bartha, 1993). Il a été prouvé que la technique de dénombrement sur boîtes de pétri sous-estime les populations présentes dans l'échantillon. Elle donne donc une estimation ou un ordre de grandeur des populations présentes dans l'échantillon (Atlas et Bartha, 1987; Kepner, 1994) Cette technique, bien qu'encore très utilisée, laisse donc progressivement sa place aux techniques de dénombrement direct des microorganismes qui donnent des résultats plus près de la réalité (Kepner, 1994).

Les techniques utilisant un microscope à épifluorescence sont les méthodes les plus fiables pour le dénombrement direct des microorganismes dans un échantillon (Bergstrom et al., 1986; Schallenberg et al., 1989; Kepner et Pratt, 1994). Cette technique demande une coloration à

l'aide d'un fluorochrome. Les 2 colorants les plus utilisés sont l'acridine orange (3,6-bis[diméthylamino]chlorure acridine) et le DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole). Le principe consiste à mettre en contact l'échantillon et un colorant qui se fixe à l'ADN des microorganismes ce qui les rend brillants sous une lumière fluorescente (Kepner, 1994). Ces techniques donnent généralement des dénombrements de 10 à 100 fois plus élevés que ceux obtenus par la technique des dilutions et étalement sur des milieux de culture. Toutefois, il est souvent difficile de différencier les microorganismes vivants des microorganismes morts (Atlas et Bartha, 1993).

Il est aussi possible de déterminer la quantité de microorganismes présents dans un échantillon par mesure de la biomasse. Ceci nous donnera une information en unité par volume ou par masse d'échantillon. Différents paramètres peuvent être étudiés et peuvent nous donner une bonne indication de la biomasse microbienne présente dans l'échantillon étudié. On peut par exemple mesurer la quantité d'ATP et d'adénylate total, doser la quantité de certains pigments photosynthétiques comme la chlorophylle (algues et bactéries photosynthétiques), ou mesurer la quantité d'ADN et de protéines (Atlas et Bartha, 1993). Finalement, l'analyse de certains composants formant les parois et membranes cellulaires comme les lipides par exemple peuvent aussi nous donner des indices sur les biomasses en présence. Des études ont démontré que le suivi des acides gras microbiens par exemple était possible afin d'estimer certaines populations microbiennes dans des échantillons de sol (Pennanen et al., 1996; Frostegard et al., 1993). D'autres études ont aussi démontré que les patrons des acides gras sont très particuliers d'une espèce de bactérie à une autre et qu'il est possible de les utiliser comme outil de classification pour les bactéries (Thomson, 1993; Paradis et al., 1994; Faucher et al., 1995).

Finalement, il existe des méthodes qui permettent la détection de certains groupes de microorganismes. On parle ici de la détection immunologique (ex: anticorps marqué qui est spécifique à un groupe de microorganismes) et de la détection par sondes moléculaires ou par PCR (Atlas et Bartha, 1993).

Certaines approches physiques utilisant le phénomène de la respiration comme base peuvent aussi être utilisées. On peut mesurer le taux de respiration grâce à la production de CO₂. Ces mesures nous renseignent sur la quantité de réactions métaboliques effectuées par les microorganismes (Atlas et Bartha, 1993).

Objectifs du projet

Il s'agit d'un projet multidisciplinaire regroupant des participants de plusieurs domaines tels que l'ingénierie (pour les études de marchés et de faisabilité du compostage à grande échelle), les sciences humaines (au niveau de la perception des agriculteurs face au compostage) la biologie (pour le développement d'un compost à base de carapaces de crevettes, les études microbiologiques) et l'agriculture (les effets du compost sur les plantes et la microflore du sol). Les objectifs globaux de ce projet visent à l'élaboration d'un compost à base de résidus chitineux (carapaces de crevettes) arborant les propriétés fertilisantes, fongistatiques et phytoprotectrices offertes par la chitine. Nous partons de l'hypothèse que le compostage de ces résidus chitineux pourrait permettre, tout en éliminant une source de déchet, d'obtenir un produit final (compost) fertilisant qui pourrait posséder les caractéristiques apportées par les oligomères de chitine soit le pouvoir d'activer les mécanismes de défense des plantes et une action fongistatique (Kendra et Hadwiger, 1984; Kendra et al., 1989; Hirano et Nagao, 1989). Il importera de trouver la composition optimale de chaque biomasse participant au processus de compostage et, notamment, de déterminer la quantité et le moment d'introduction des carapaces de crevettes nécessaires pour obtenir les oligomères actifs dans le produit final.

Pour notre part, nous nous sommes donnés comme objectifs spécifiques d'étudier la dynamique des populations microbiennes au cours du processus de compostage de résidus chitineux. Pour ce faire, les populations bactériennes totales, cellulolytiques et chitinolytiques viables seront dénombrées par la méthode classique de dilutions et d'étalement sur milieu de culture. Ces études

seront effectuées pour plusieurs composts. À des fins de comparaisons, en plus des dénombrements de bactéries viables, nous ferons des dénombrements directs des bactéries totales de même que des extractions et analyses de différents acides gras microbiens présents dans certains composts. Cette dernière technique nous permettra de dresser un profil des acides gras microbiens et suivre leur évolution au cours du processus de compostage.

CHAPITRE 1

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1.0 Le compostage

Le compostage des résidus chitineux à petite échelle a eu lieu dans des contenants de plastique de 4 litres. Ces contenants, 18 en tout, étaient regroupés dans un incubateur. Étant donné l'impossibilité pour de si petits volumes de composts de conserver la chaleur produite par les nombreuses réactions de biodégradation, les températures de compostage étaient imposées. Ainsi, une partie du processus de compostage a été effectuée à 30°C et l'autre partie à 50°C. Trois profils de température ont été utilisés (figure 1).

Les contenants de plastique étaient munis d'embouts aux deux extrémités pour permettre l'aération des composts. Celle-ci était assurée par une pompe qui aspirait l'air présent dans l'incubateur pour le faire sortir à l'extérieur. Le temps d'aération était de 20 minutes et ce, 6 fois par jour. Différentes biomasses ou intrants tels les carapaces de crevettes, la tourbe, les sciures de bois de résineux et de feuillus et l'urée ont été compostées. Les formulations à 3 intrants se sont avérées les meilleures en ce qui a trait aux qualités fertilisantes du compost et elles produisaient un minimum de lixiviats. Ce sont donc les mélanges à 3 intrants qui seront analysés dans ce travail. Les mélanges les plus étudiés ont été les composts composés de carapaces de crevettes, tourbe et sciures de bois en différentes proportions. Aux cours du compostage des 3 intrants originaux (crevettes, tourbe, sciures), des amendements en carapaces de crevettes ont été réalisés avec certains essais. Des amendements sur des composts commerciaux ont aussi été étudiés.

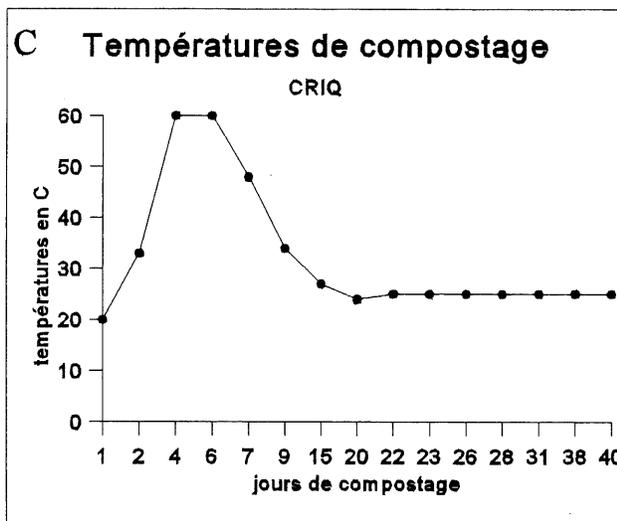
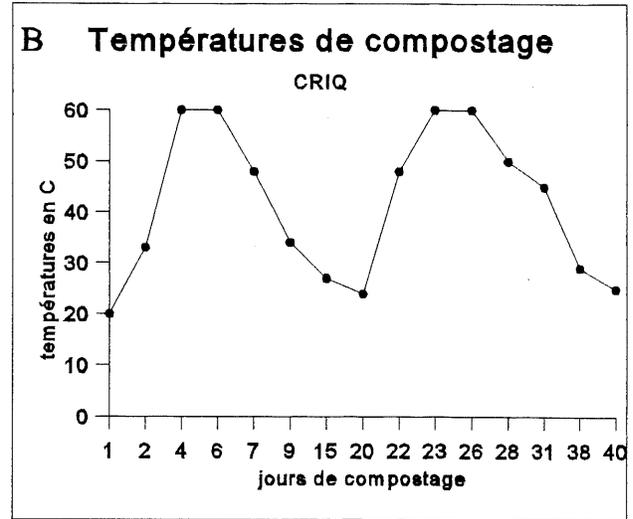
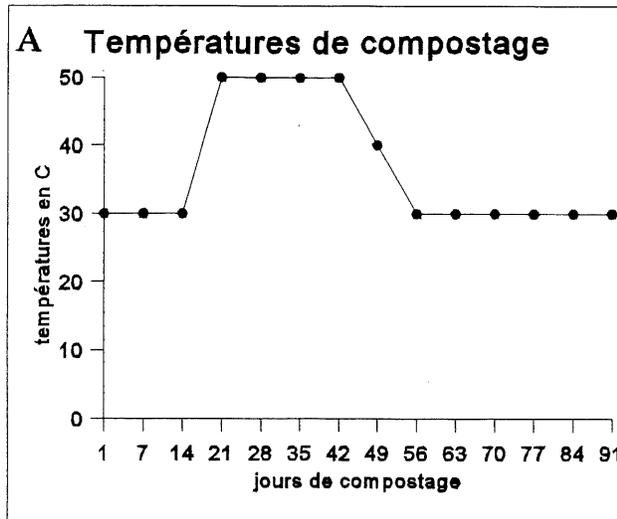


Figure 1. Patron des températures imposées pendant les différents essais de compostage. (A) Patron de température pour les premiers essais de compostage; (B) Patron de température obtenus par le C.R.I.Q.; (C) Patron de température obtenu par le C.R.I.Q. comportant une seule phase thermophile.

Nous avons utilisé la nomenclature qui est décrite ci-dessous pour identifier nos composts selon leur composition. Nous avons associé une lettre à chaque biomasse à composter:

C..... pour carapaces de crevettes

T.....pour tourbe

S(F).....pour sciures de feuillus

S(R).....pour sciures de résineux

U.....pour urée

De plus, la proportion volumétrique de chaque intrant est désignée par un chiffre qui suit immédiatement la lettre du code d'identification précédent. Si aucun chiffre ne suit une lettre, c'est que le chiffre un devrait être associé à cette lettre. Ainsi, un compost $CT_2S(F)_2$ avait donc comme intrants au départ des carapaces, de la tourbe et des sciures de feuillus en proportion volumétrique de 1:2:2. Le tableau 1 présente les différents types de composts qui ont été étudiés dans ce travail.

Tableau 1. Liste des composts analysés dans cette étude.

composts	conditions de compostage ¹	profil de températures
CTS(F) Essai a Essai b Essai c	non-amendé amendé de 30% après 57 jours amendé de 30% après 78 jours	A
CT₂S(F)₂ Essai a Essai b Essai c	non-amendé amendé de 30% après 57 jours amendé de 30% après 78 jours	A

composts	conditions de compostage	profil de températures
CT ₂ S(F) ₂ Essai a Essais b c d e	non-amendé amendés de 30% après 50 jours et de 10% après 78 jours.	A
CT ₂ S(R) ₂ Essais a f Essais b c d e g	non-amendés amendés de 30% après 50 jours et de 10% après 78 jours.	A
UT ₂ S(R) ₂ Essai a Essais d e	non-amendé amendés de 33% après 21 jours	B
CT ₂ S(R) ₂ Essai a Essais d e	non-amendé amendés de 33% après 21 jours	B

compost	conditions de compostage	profil de températures
C2T ₉ S(R) ₉ Essai a Essais d e	non-amendé amendés de 33% après 21 jours	B
Compost Aquaterre Essai a Essai b	non-amendé amendé de 30% après 6 jours	C
Compost de feuilles Essai a Essai b	non-amendé amendé de 30% après 6 jours	C

1 Les amendements étaient constitués de carapaces de crevettes et étaient effectués en % masse sèche de carapaces de crevettes/%masse sèche de compost.

1.1 Suivi des populations microbiennes.

Trois méthodes ont été utilisées pour effectuer le suivi des populations microbiennes soit: le dénombrement des bactéries viables sur boîtes de Pétri, le dénombrement direct des bactéries totales par l'utilisation d'un fluorochrome et l'extraction et l'analyse des acides gras microbiens.

1.1.2 Technique de dénombrement des bactéries viables sur boîte de Pétri.

Trois échantillons de compost ont été prélevés aléatoirement dans les bacs de compost. Dans un premier temps et pour chacun des échantillon, 1 g de compost a été pesé et a servi pour le

dénombrement microbien. Dans un deuxième temps, et encore pour chacun des échantillons, une quantité a été prélevée, pesée puis séchée au four à 80°C pour déterminer le pourcentage d'humidité de chaque compost. Chaque échantillon de compost a été dilué en série dans de la saline physiologique (NaCl 0,85%) stérile. Ensuite, 100 µl de certaines dilutions ont été étalées sur différents milieux de culture solides. Trois milieux de culture ont été utilisés: GPCA (gelose plate count agar), cellulose-agar et chitine-agar. Le milieu GPCA (gelose plate count agar) (Difco manual, 1984) est un milieu riche qui a servi à estimer la quantité totale de bactéries viables. Ce milieu est constitué de 5,0 g de tryptone, de 2,5 g d'extrait de levure, de 1,0 g de glucose et de 15,0 g d'agar pour 1 litre d'eau distillée. Le milieu cellulose-agar avait comme base minérale celle du milieu Czapek (Difco manual, 1984). Cette base minérale est constituée de 2,0 g de NaNO₃, de 1,0 g de K₂HPO₄, de 0,5 g de KCL, de 0,5 g de MgSO₄ et de 0,01 g de FeSO₄ pour 1 litre d'eau. La seule source de carbone du milieu était le carboxyméthylcellulose à une concentration finale de 1%. Le milieu était solidifié en ajoutant 15 g d'agar par litre. Ce milieu permettait la croissance des microorganismes possédant les enzymes capables d'hydrolyser le carboxyméthylcellulose. Pour le milieu chitine-agar, la base minérale du milieu Czapek a été utilisée sauf que le NaNO₃ a été éliminé. La seule source de carbone et d'azote du milieu était la chitine en poudre (Sigma) à une concentration finale de 1%. Le milieu était solidifié en ajoutant 15 g d'agar par litre. Ce milieu permettait la croissance des microorganismes possédant des enzymes capables d'hydrolyser la chitine. Les colonies poussant sur les différents milieux ont été comptées après quatre ou cinq jours d'incubation. Les unités formatrices de colonies (UFC) ont été rapportées par gramme de compost sec en tenant compte du poids de l'échantillon et du pourcentage d'humidité.

1.1.3 Dénombrement total et direct des bactéries avec l'utilisation d'un fluorochrome.

Pour le dénombrement total et direct des bactéries, le protocole utilisé est celui de Kepner et Pratt

(1994) à quelques modifications près. Pour les composts à étudier, 1 g de compost a été prélevé. Cet échantillon a été resuspendu dans une solution d'eau distillée stérile dans laquelle un agent dispersant (tétrasodium Ppi) a été ajouté à une concentration finale de 0,01M. Des dilutions en série ont ensuite été effectuées dans de l'eau distillée stérile. L'étape suivante était la coloration des cellules microbiennes de l'échantillon. La coloration a eu lieu dans un tube-entonnoir muni d'un filtre de polycarbonate noir ayant des pores de 0,2 μ m. La coloration avait lieu après que 3 ml d'eau stérile eurent passés sur le filtre de polycarbonate noir pour l'humecter. La coloration d'une durée de 3 min. à l'obscurité a eu lieu directement dans le tube entonnoir en mélangeant 1,25 ml de l'échantillon, 3,25 ml d'eau distillée stérile et 0,5 ml d'acridine orange à 0,001%. Le mélange a été agité à chaque minute. Après 3 min, 3 ml d'eau distillée stérile ont été ajoutés puis l'échantillon a été filtré sous vide. Les bords de l'entonnoir ont ensuite été rincés avec 3 ml d'eau distillée stérile. Une fois la filtration terminée, on déposait sur une lame de microscope le filtre sur lequel étaient trappés les microorganismes. Le comptage des bactéries a été effectué à l'aide d'un microscope à épifluorescence à un grossissement de 400X. Vingt champs de microscope de 0,43 mm de diamètre ont été comptés puis l'extrapolation a été faite pour estimer la quantité de bactéries trappées sur le filtre. Les comptes ont été ramenés par g de compost sec.

1.1.4 Extraction et analyse des acides gras microbiens.

Les cellules microbiennes ont été séparées des débris de compost en suivant le protocole de Steffan (1988). Un échantillon de 10 g de compost était prélevé et mélangé à 50 ml de tampon phosphate de sodium (pH 4,5) dans un malaxeur à basse vitesse pendant une min. Le mélange était ensuite refroidi dans la glace pour une min. Cette étape de brassage de l'échantillon dans un mélangeur était répétée 2 autres fois avec un refroidissement sur glace entre chacun. À la fin des 3 brassages, 200 μ l de SDS ont été ajoutés puis un brassage de 5 sec. a eu lieu. Le mélange était ensuite centrifugé à 500 rpm pendant 30 sec. Le surnageant était récupéré et centrifugé à 10 000 x g à 10⁰C pendant 30 min. Le surnageant était jeté et le culot de cellules conservé et resuspendu

dans du tampon phosphate de sodium (pH 4,5). Deux autres lavages et centrifugations à 10 000 x g à 10°C ont été effectués. Une fois le culot de cellules récupéré, une étape de saponification a eu lieu. La saponification et les étapes suivantes d'extraction des acides gras ont eu lieu dans des tubes de verre nettoyés avec de l'acide chromique pour éliminer toutes traces d'acides gras ou de lipides contaminants. Pour la saponification, un volume de 1 ml d'une solution composée de 150 ml d'éthanol, de 150 ml d'eau distillée et de 45 g de NaOH a été ajouté au culot de cellules. Le mélange a été ensuite chauffé à 100°C pendant 30 min avec une agitation au vortex après les 5 premières min. L'extraction des acides gras a été faite selon le protocole de Bligh and Dyer (1959) qui a été modifié de la façon suivante. Premièrement, un mélange chloroforme, méthanol et eau (2: 3,5: 1,1) a été ajouté dans le tube contenant les extraits de cellules qui avait préalablement été refroidi. Le mélange a été vortexé puis centrifugé à 1000 rpm pendant 10 min. Ensuite, le surnageant a été versé dans un autre tube contenant un mélange de chloroforme (4 ml) et d'eau (4 ml) et le culot a été jeté. Le surnageant et le mélange chloroforme-eau a alors été vortexé avant de subir une centrifugation à 1000 rpm pendant 10 min. À l'aide d'une seringue à bout carré, la phase inférieure contenant les lipides totaux a été récupérée.

La dernière étape a été la transestérification et la transméthylation des acides gras préalablement extraits. Pour ce faire, la phase chloroforme contenant les acides gras a été évaporée sous azote et 2 ml de BF₃ ont été ensuite ajoutés. Ce mélange a alors été incubé à 85°C pendant 15 minutes. Ensuite, 2 ml d'eau distillée et 4 ml d'éther de pétrole ont été ajoutés puis le tout a été vortexé quelques secondes. La phase supérieure contenant les lipides a été recueillie et évaporée sous azote. Deux autres lavages à l'éther de pétrole ont été effectués. Après évaporation de l'éther de pétrole, les acides gras ont été resuspendus dans 100 µl d'hexane. Finalement, les acides gras ont été identifiés par chromatographie en phase gazeuse d'après un standard composé de plusieurs acides gras microbiens (compagnie Metreya). Le chromatographe en phase gazeuse était un Hewlett Packard HP 6890 series, GC System. Les conditions de la chromatographie étaient les

suivantes: colonne capillaire en silice SPB™ de 30m X 0,25mm ; diamètre intérieur 0,25µm; vitesse de l'hélium: 20cm/sec; Température: 150°C pendant 4 min puis augmentation de 4°C/min. jusqu'à 250°C. Le temps de chromatographie était de 45 min dont 17 min. à 250 C pour permettre à tous les acides gras et autres composés de sortir de la colonne.

CHAPITRE 2

RÉSULTATS

2.1 Décomptes des populations bactériennes viables dans des composts non-amendés et amendés de carapaces de crevettes.

Au premier essai, les composts étudiés étaient de type CTS(F) et CT₂S(F)₂. Durant tout le compostage, les populations bactériennes totales étaient habituellement un peu plus élevées que les populations cellulolytiques et chitinolytiques (fig. 2). On remarque que les populations bactériennes (totales, cellulolytiques et chitinolytiques) ont diminué progressivement au cours de la phase thermophile car d'environ 1X10¹⁰ UFC avant la phase thermophile (jour 0), elles sont descendues à 1X10⁹ UFC ou 5X10⁸ UFC au jour 50 dépendant du type de populations. Ensuite, avec le retour de la phase mésophile (jour 56), il y a eu une stabilisation des 3 types de populations à environ 1X10⁹ UFC. Dans les composts CTS(F) et CT₂(F)₂ qui n'ont pas été amendés en cours de compostage, les populations sont demeurées stables durant les 6 semaines de maturation du compost suivant la phase thermophile.

Des composts de composition similaire avaient été maintenus exactement dans les mêmes conditions que les précédents et ont été amendés de carapaces de crevettes après 58 jours (fig. 3) ou après 78 jours (fig. 4). L'amendement a eu pour effet de provoquer une augmentation entre 10 et 100 fois des 3 types de populations. Que l'amendement ait lieu au jour 57 ou au jour 78, l'effet est sensiblement le même. Après l'amendement (jour 57), les populations sont demeurées élevées quelques jours puis redescendaient progressivement (fig. 3). Cependant à la fig. 4, notre étude ne s'est pas prolongée suffisamment pour suivre les populations de 2 à 4 semaines après l'amendement.

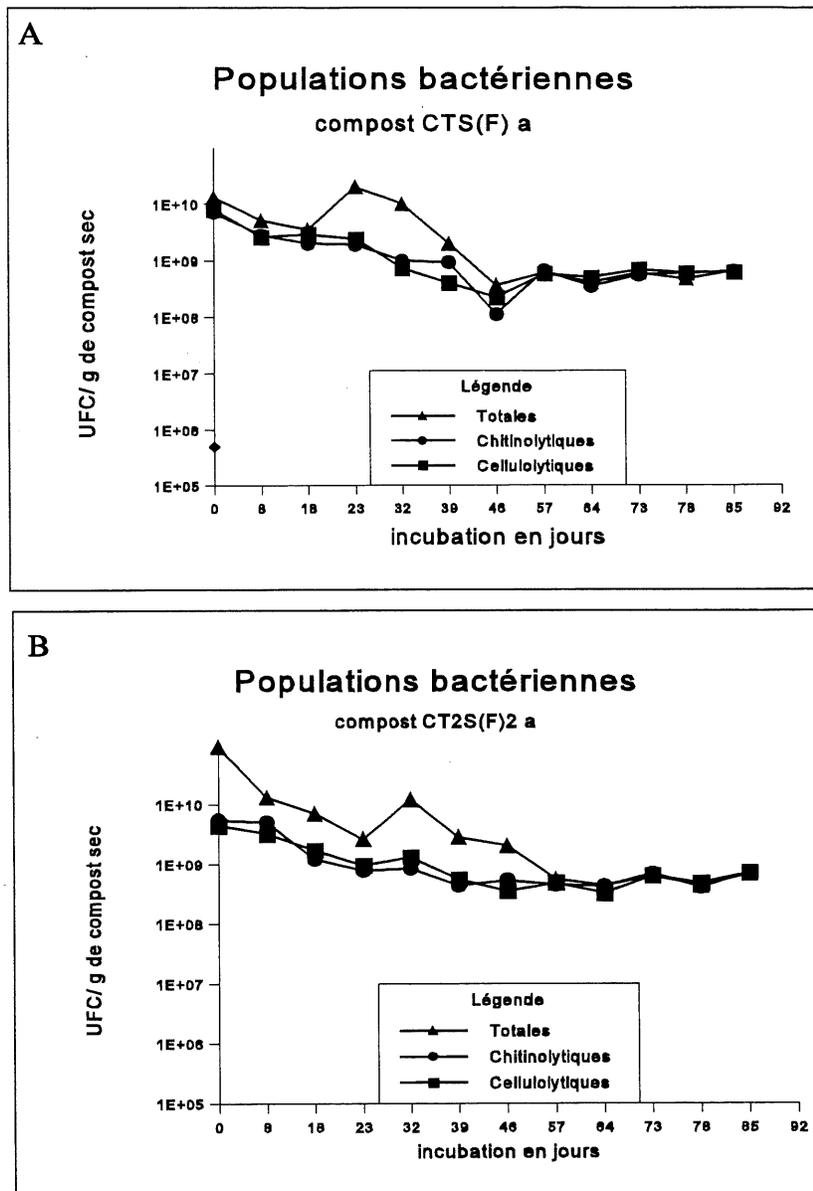


Figure 2. Dénombrement des populations bactériennes viables dans des composts (A) CTS(F) et (B) CT₂S(F)₂ non-amendés. (▲) bactéries viables totales; (●) bactéries chitinolytiques; (■) bactéries cellulolytiques. Les températures imposées suivaient le profil A. Pour A et B, moyenne de 3 échantillons/compost.

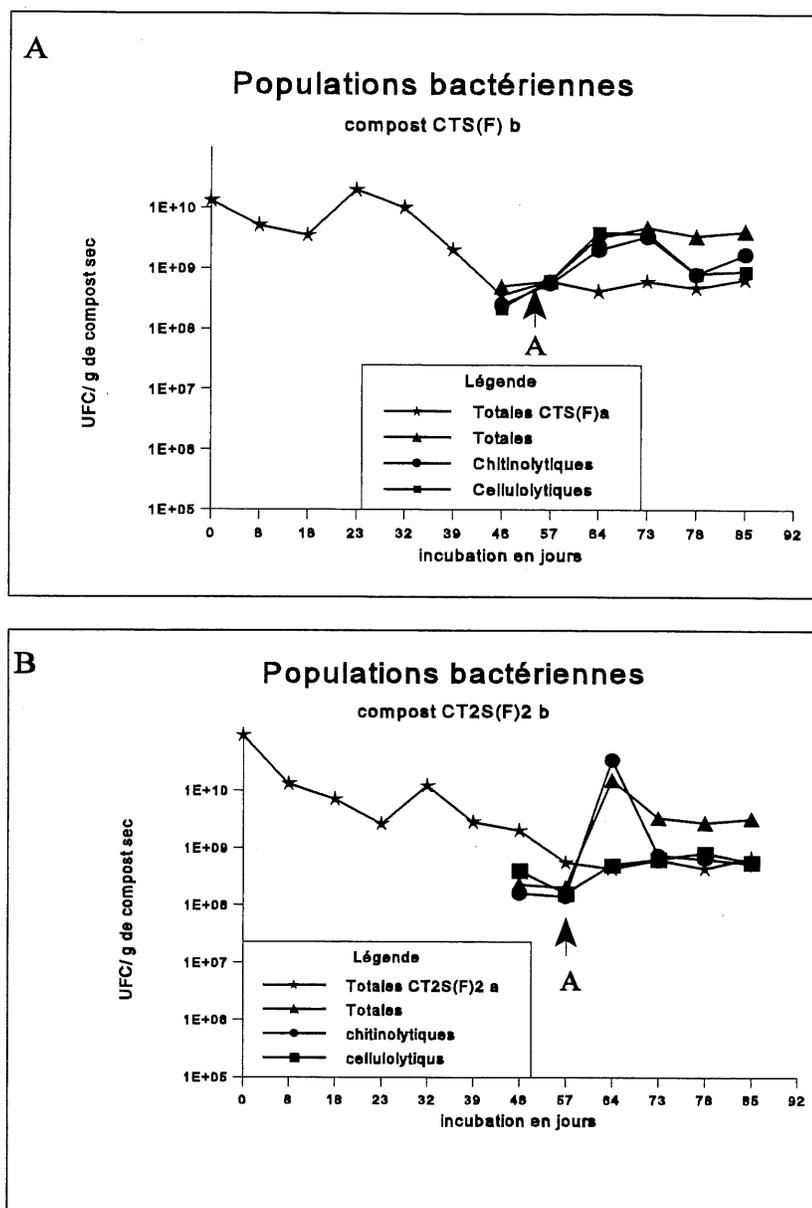


Figure 3. Dénombrement des populations bactériennes viables dans des composts (A) CTS(F) et (B) CT₂S(F)₂. (★) bactéries viables totales dans les composts non amendés; (▲) bactéries viables totales dans les composts amendés; (●) bactéries chitinolytiques; (■) bactéries cellulolytiques; le signe (A↑) indique le moment où l'amendement en carapaces de crevettes de 30% (masse sèche/masse sèche) a été effectué. Les températures imposées suivaient le profil A. Pour A et B, moyenne de 3 échantillons/compost.

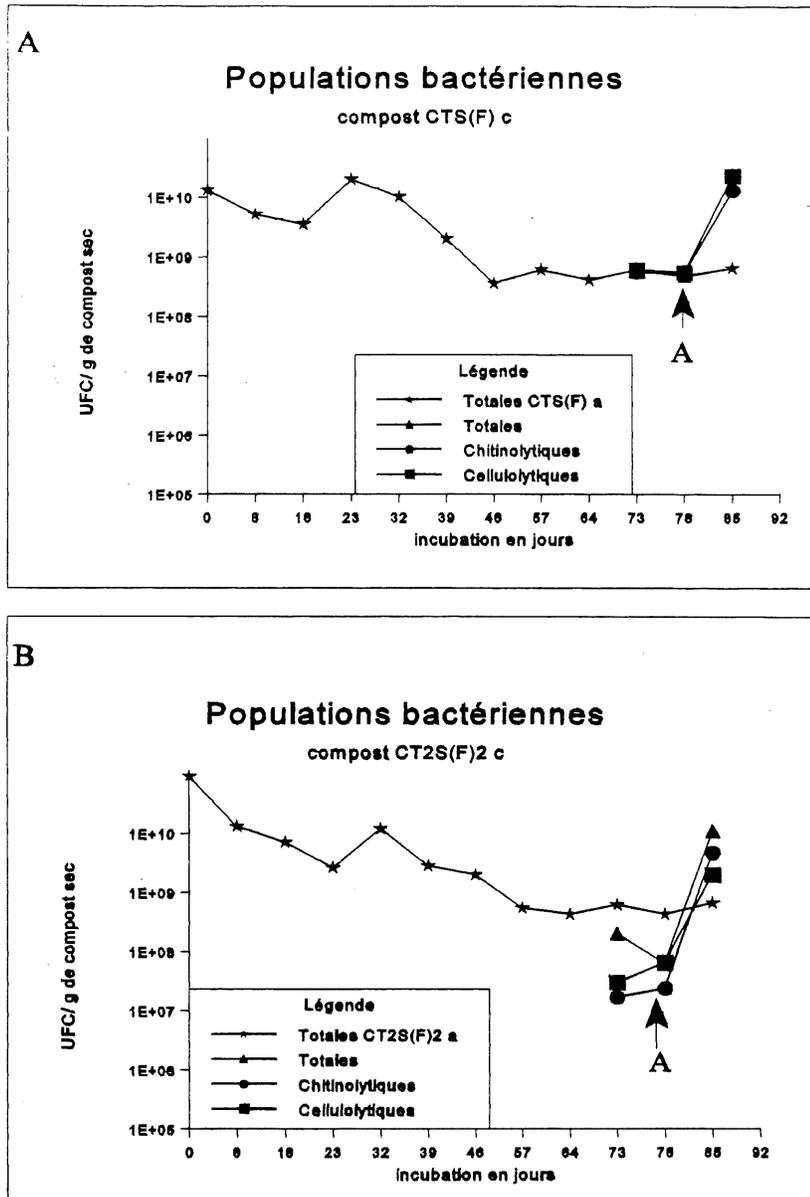


Figure 4. Dénombrement des populations bactériennes viables dans des composts (A) CTS(F) et (B) CT₂S(F)₂. (★) bactéries viables totales dans les composts non amendés; (▲) bactéries viables totales dans les composts amendés; (●) bactéries chitinolytiques; (■) bactéries cellulolytiques; le signe (A) indique le moment où l'amendement en carapaces de crevettes de 30% (masse sèche/masse sèche) a été effectué. Les températures imposées suivaient le profil A Pour A et B, moyenne de 3 échantillons/compost.

Dans tous les essais précédents, nous avons constaté, au milieu de la phase thermophile (entre les jours 30 à 35), l'apparition en grand nombre de bactéries appartenant à la famille des actinomycètes. Leur proportion grandissait de semaines en semaines et lors du retour à la phase mésophile pour la période de maturation, ces actinomycètes étaient largement majoritaires. Elles représentaient entre 80 et 95% des bactéries présentes sur les milieux contenant le carboxyméthylcellulose et la chitine sur lesquels elles sporulaient.

Au deuxième essai, nous avons voulu étudier l'effet de la source des sciures de bois sur les populations bactériennes. Pour ce faire, nous avons comparé des composts de composition identiques en tous points sauf pour le type de sciures utilisées, soit sciures de feuillus et sciures de résineux. À la fig. 5, les composts ont été faits à base de sciures de feuillus tout comme les composts des fig. 2, 3 et 4. À la fig. 6, les sciures de feuillus ont été remplacées par des sciures de résineux. Comme pour les composts à base de sciures de feuillus (fig. 5), le nombre de bactéries totales viables étaient un peu plus élevé que celui des bactéries cellulolytiques ou chitinolytiques dans les composts à base de sciures de résineux (fig. 6). L'allure des courbes pour les 2 types de composts est très semblable. Cependant, le nombre total de CFU au départ est plus faible que pour les composts précédents. De plus, le même phénomène que pour les composts de l'essai précédent s'est produit pendant la phase thermophile (diminution des 3 types de populations bactériennes des jours 8 à 50). Pour ces essais, 2 amendements successifs en carapaces de crevettes ont été effectués après 50 et 78 jours. Des hausses de populations bactériennes ont été enregistrées à la suite de chaque amendement (fig. 5 et 6).

Jusqu'à maintenant, les composts étudiés avaient subi le profil de température A (fig. 1). Cependant, des essais à plus grande échelle réalisés au C.R.I.Q. démontraient que ce type de compost entrait en phase thermophile pour de courtes périodes. Pour les troisième et quatrième essais, nous avons donc suivi le profil de températures proposé par le C.R.I.Q. que nous avons nommé B (fig. 1).

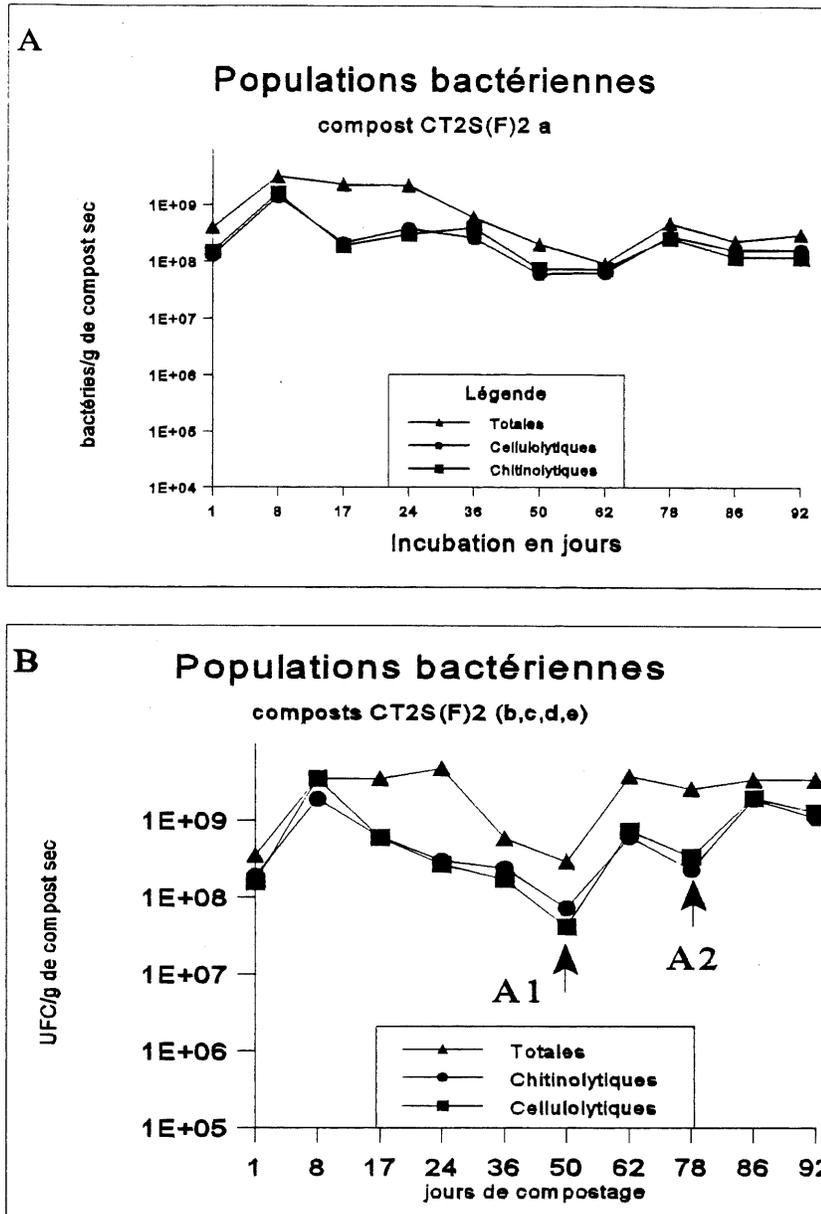


Figure 5. Dénombrement des populations bactériennes viables dans des composts (A) CT₂S(F)₂ non-amendé et (B) amendés. (▲) bactéries viables totales; (●) bactéries chitinoxytiques; (■) bactéries cellulolytiques; les signes (A1↑) et (A2↑) indiquent les moments où les amendements en carapaces de crevettes de 10% (A1) et 30% (A2) (masse sèche/masse sèche) ont été effectués. Les températures imposées suivaient le profil A. Pour A, moyenne de 3 échantillons/compost. Pour B, moyenne provenant de 4 composts identiques et de 3 échantillons/compost.

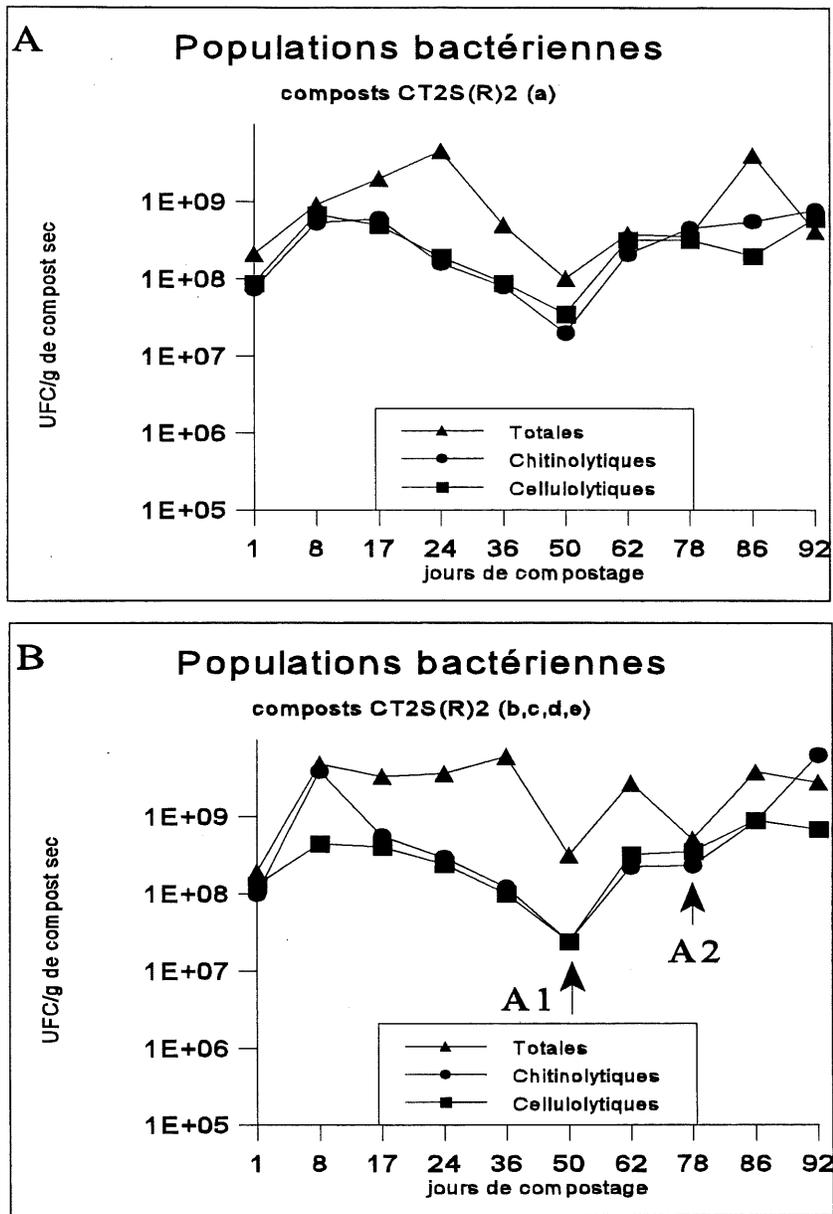


Figure 6. Dénombrement des populations bactériennes viables dans des composts (A) CT₂S(R)₂ non-amendé et (B) amendés. (▲) bactéries viables totales; (●) bactéries chitinolytiques; (■) bactéries cellulolytiques; les signes (A1↑) et (A2↑) indiquent les moments où les amendements en carapaces de crevettes de 10% (A1) et 30% (A2) (masse sèche/masse sèche) ont été effectués. Les températures imposées suivaient le profil A. Pour A, moyenne de 3 échantillons/compost. Pour B, moyenne provenant de 4 composts identiques et de 3 échantillons/compost.

Dans un premier temps, nous avons comparé un mélange $CT_2S(R)_2$ (fig. 7) à un mélange $C_2T_9S(R)_9$ (fig. 8). Dans le mélange $C_2T_9S(R)_9$, les carapaces de crevettes représentent seulement 10 % du volume de départ alors que dans le mélange $CT_2S(R)_2$, elles représentent 20%. Dans un deuxième temps, nous avons élaboré un mélange dans lequel les carapaces de crevettes étaient remplacées par de l'urée dans la formulation de départ (fig. 9). Le taux basal de microorganismes dans ce compost $UT_2S(R)_2$ (fig. 9) était un peu plus bas que pour les autres composts de cette série ($CT_2S(R)_2$ et $C_2T_9S(R)_9$) (fig. 7 et 8). Pour le compost contenant de l'urée, une montée des populations bactériennes a été enregistrée après le jour 12 autant pour le compost amendé que pour le compost non-amendé. Cependant, la montée de microorganismes cellulolytiques et chitinolytiques s'est effectuée plus rapidement dans le compost amendé. Si on compare avec les autres composts $CT_2S(R)_2$ et $C_2T_9S(R)_9$, on remarquait que la montée en microorganismes après l'amendement a été plus rapide pour le compost $CT_2S(R)_2$ que pour les 2 autres composts. Dans les composts témoins (fig. 7A et 8A), les quantités de bactéries ont diminué lors de la deuxième phase thermophile (jours 22 à 28). Pour le composts $UT_2S(R)_2$ (fig. 9A), les populations ont continué d'augmenter durant la deuxième phase thermophile.

Pour le quatrième essai, nous avons choisi de présenter l'évolution des populations bactériennes après avoir amendé en carapaces de crevettes 2 composts commerciaux: le compost Aquaterre fabriqué à partir de carapaces de crevettes (fig. 10) et un compost fait à base de feuilles mortes par la ville de Sherbrooke (fig. 11). Ces composts ont subi le profil de température C (figure) car ils ont eu un seul apport en crevettes. Dans les deux composts non-amendés, le nombre de bactéries totales au départ était semblable (autour de 1×10^8 UFC). Au moment de l'amendement, pour le compost Aquaterre, les bactéries cellulolytiques et chitinolytiques sont présentes en plus grand nombre soit environ 8×10^7 UFC que pour le compost de feuilles mortes (8×10^6 UFC). Dans les composts amendés, une forte hausse des microorganismes est enregistrée. La hausse est

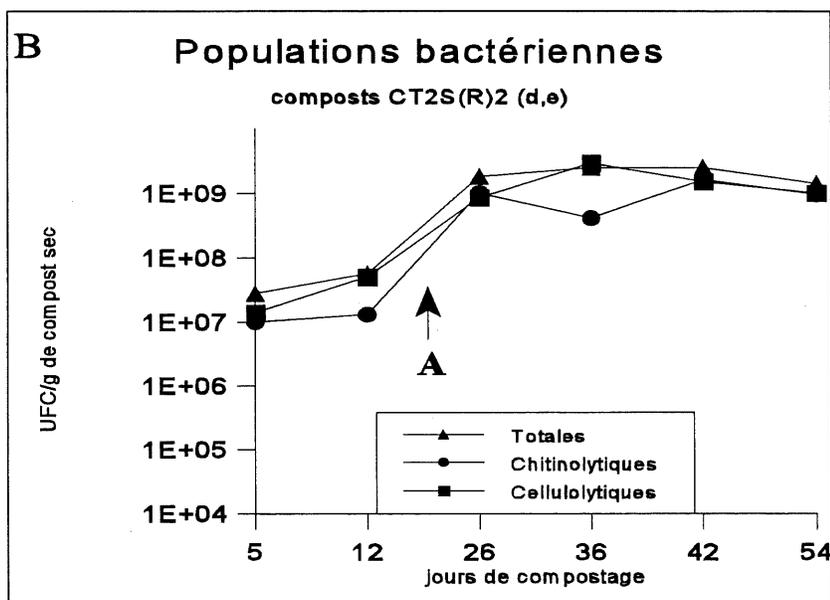
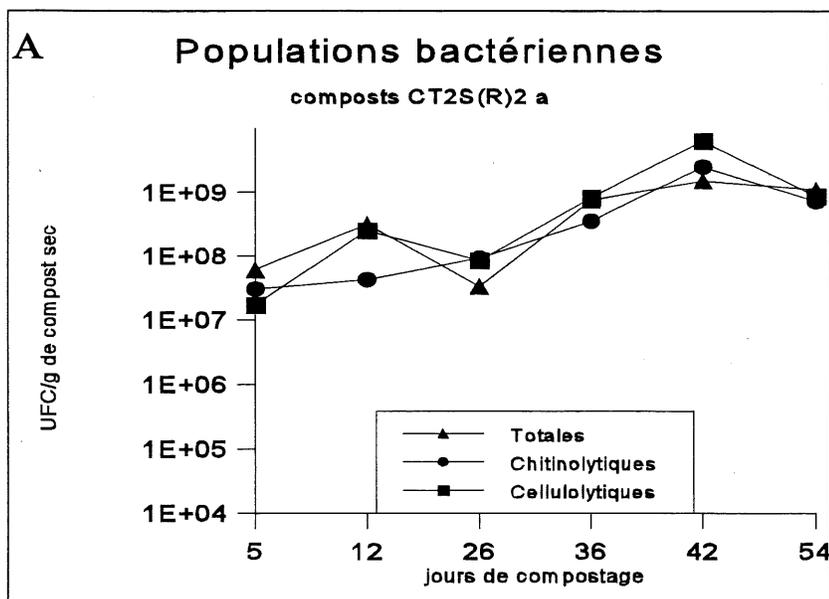


Figure 7. Dénombrement des populations bactériennes viables dans des composts (A) CT₂S(R)₂ non-amendé et (B) amendés. (▲) bactéries viables totales; (●) bactéries chitinolytiques; (■) bactéries cellulolytiques; le signe (A↑) indique le moment où l'amendement en carapaces de crevettes de 33% (masse sèche/masse sèche) a été effectué. Les températures imposées suivaient le profil B. Pour A, moyenne de 3 échantillons/compost. Pour B, moyenne provenant de 2 composts identiques avec moyenne de 3 échantillons/compost.

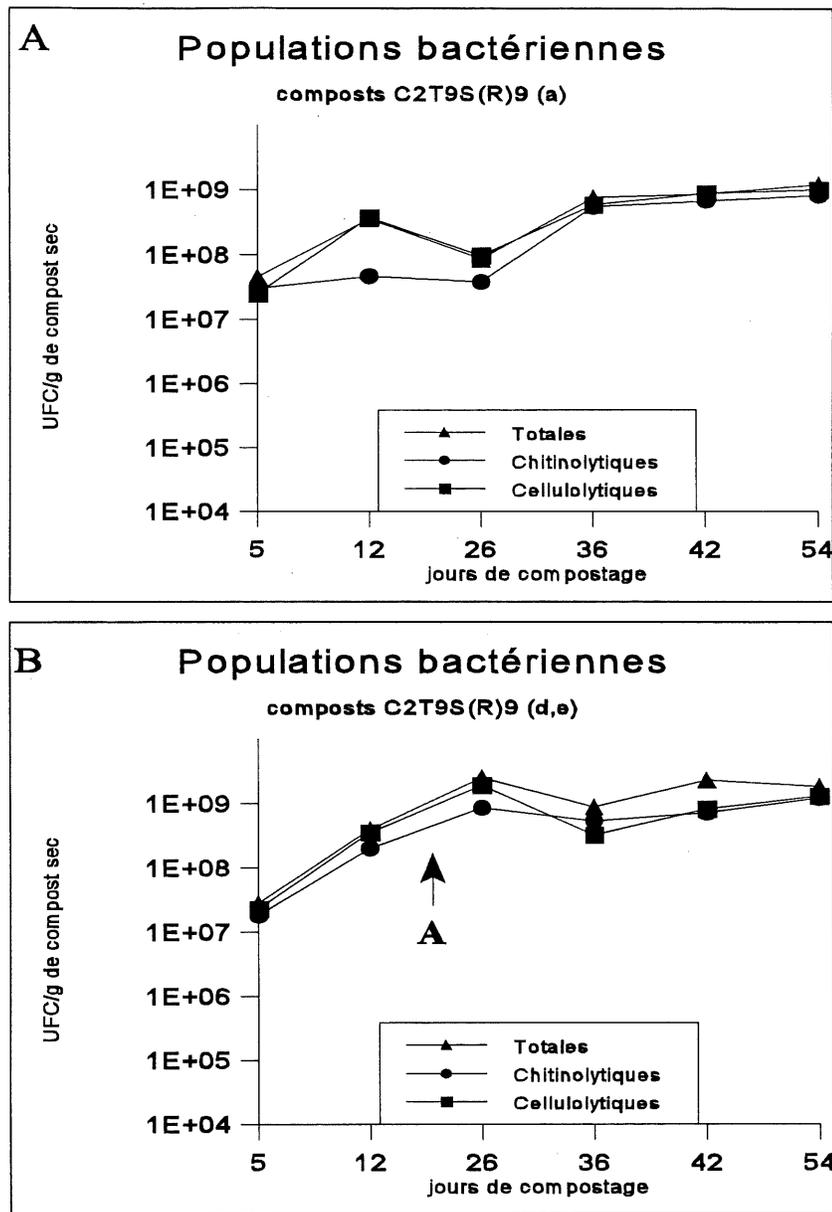


Figure 8. Dénombrement des populations bactériennes viables dans des composts (A) C₂T₉S(R)₉, non-amendé et (B) amendés. (▲) bactéries viables totales; (●) bactéries chitinolytiques; (■) bactéries cellulolytiques; le signe (A↑) indique le moment où l'amendement en carapaces de crevettes de 33% (masse sèche/masse sèche) a été effectué. Les températures imposées suivaient le profil B. Pour A, moyenne de 3 échantillons/compost. Pour B, moyenne provenant de 2 composts identiques avec moyenne de 3 échantillons/compost.

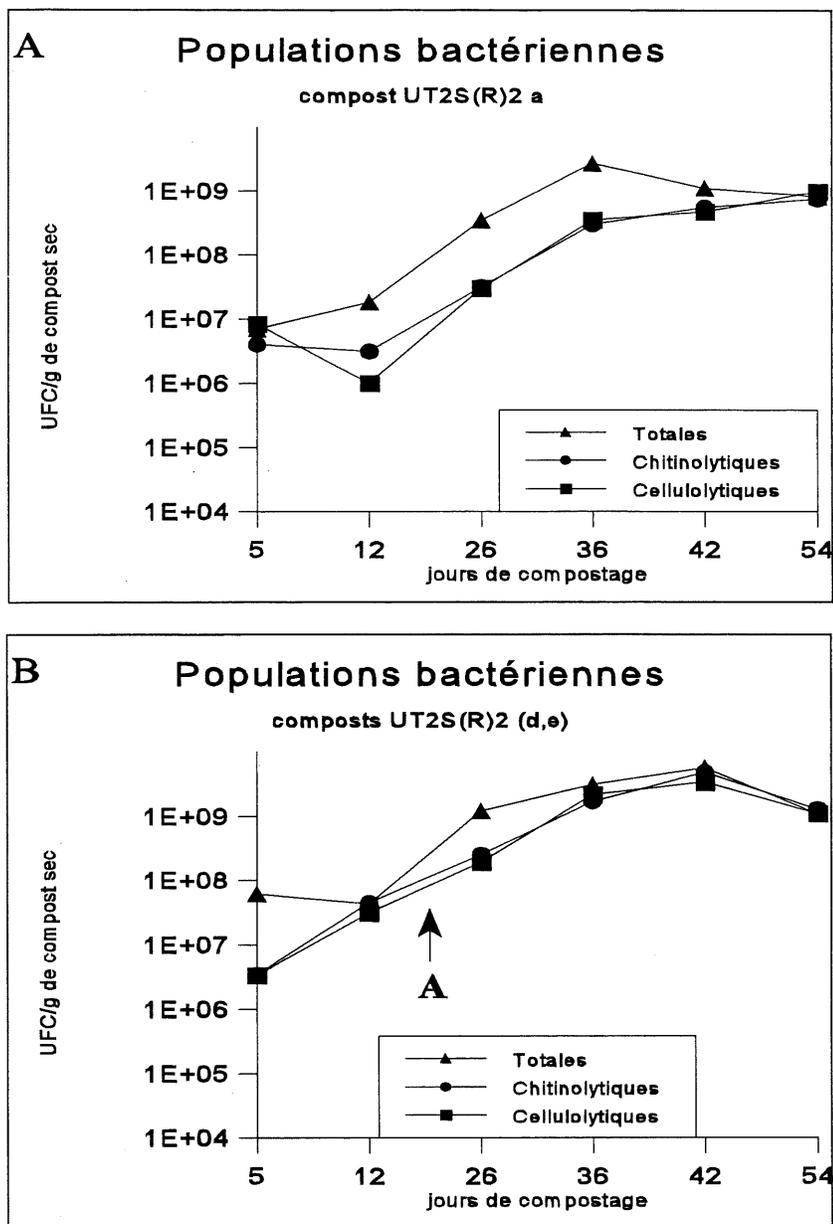


Figure 9. Dénombrement des populations bactériennes viables dans des composts (A) $UT_2S(R)_2$ non-amendé et (B) amendés. (\blacktriangle) bactéries viables totales; (\bullet) bactéries chitinolytiques; (\blacksquare) bactéries cellulolytiques; le signe (A1) indique le moment où l'amendement en carapaces de crevettes de 33% (masse sèche/masse sèche) a été effectué. Les températures imposées suivaient le profil B. Pour A, moyenne de 3 échantillons/compost. Pour B, moyenne provenant de 2 composts identiques avec moyenne de 3 échantillons/compost.

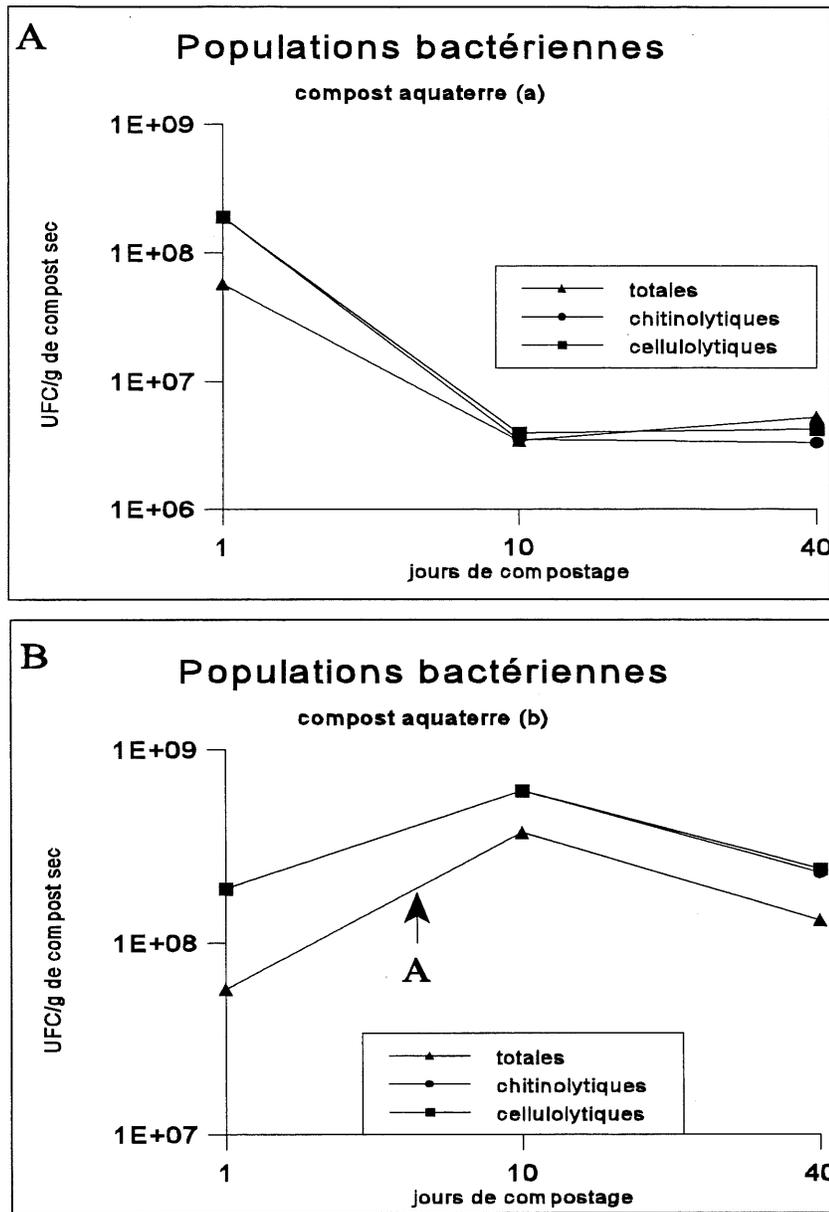


Figure 10. Dénombrement des populations bactériennes viables dans un compost commercial Aquaterre (A) non-amendé et (B) amendé. (▲) bactéries viables totales; (●) bactéries chitinolytiques; (■) bactéries cellulolytiques; le signe (A↑) indique le moment où l'amendement en carapaces de crevettes de 30% (masse sèche/masse sèche) a été effectué. Les températures imposées suivaient le profil C. Pour A et B, moyenne de 3 échantillons/compost.

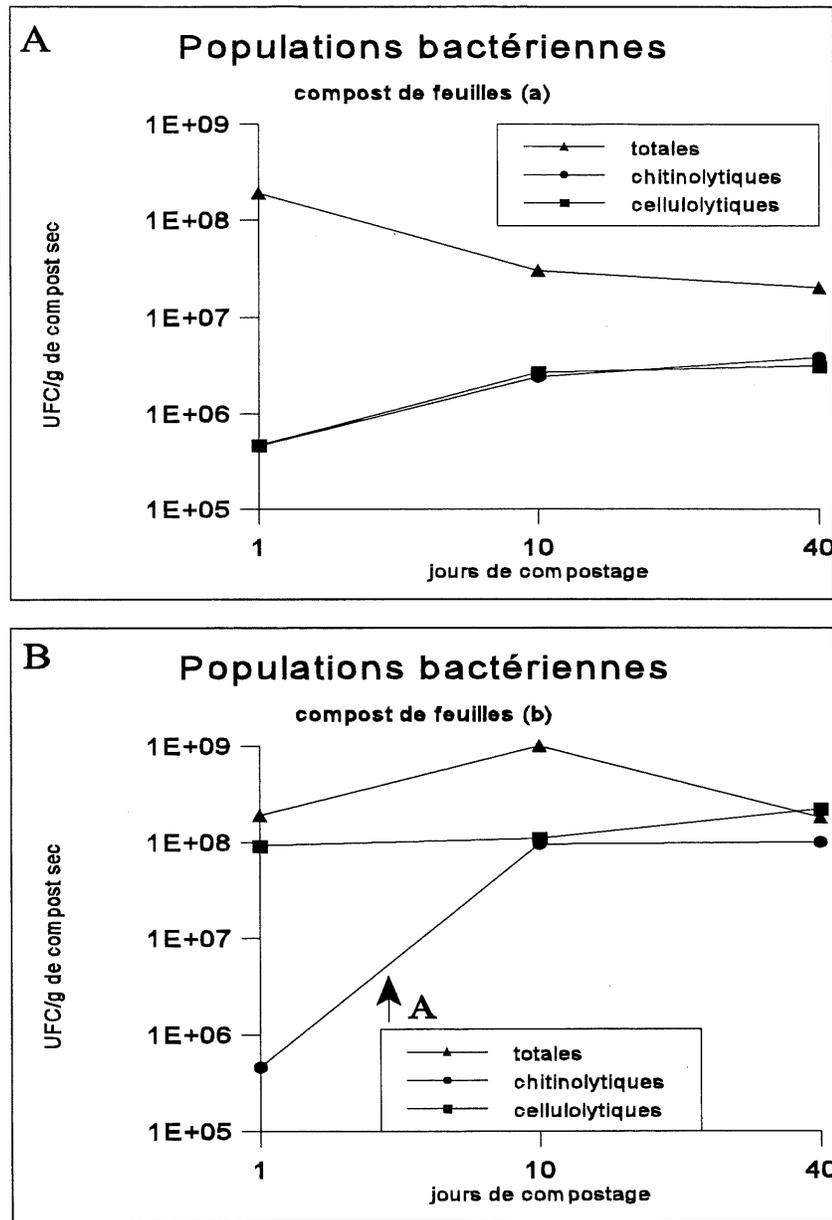


Figure 11. Dénombrement des populations bactériennes viables dans un compost à base de feuilles mortes (A) non-amendé et (B) amendé. (▲) bactéries viables totales; (●) bactéries chitinolytiques; (■) bactéries cellulolytiques; le signe (A↑) indique le moment où l'amendement en carapaces de crevettes de 30% (masse sèche/masse sèche) a été effectué. Les températures imposées suivaient le profil C. Pour A et B, moyenne de 3 échantillons/compost.

forte pour les populations cellulolytiques et chitinolytiques dans les 2 types de composts et elle est beaucoup plus drastique pour le compost de feuilles (de 8×10^5 à 1×10^8).

2.2 Comparaison entre le dénombrement des bactéries totales viables et le dénombrement direct des bactéries totales avec l'utilisation d'un fluorochrome.

Nous avons voulu, pour le cinquième et dernier essai, comparer deux techniques qui permettent d'obtenir des décomptes de microorganismes soit la technique de dénombrement direct utilisant un fluorochrome et la technique de dénombrement des bactéries viables sur milieux de cultures. Nous avons comparé ces 2 techniques sur des composts de type CT₂S(R)₂ non-amendés et amendés (fig. 12). Le patron de température utilisé était le A (fig. 1).

On remarque tout d'abord que l'allure des courbes obtenues par les deux méthodes étaient relativement semblable sauf que les quantités de microorganismes diffèrent (fig. 12). Dans les deux cas, nous avons noté une baisse des populations bactériennes totales au cours de la phase thermophile (jours 15 à 50). Puis, lors du retour à la phase mésophile, les populations se sont stabilisées (compost non-amendé) ou ont augmenté drastiquement de 10 à 100 fois (compost amendé). Les décomptes obtenus par la méthode utilisant la fluorescence étaient cependant plus élevés (de 10 à 100 fois) que ceux obtenus avec la méthode de dénombrement des bactéries totales viables.

2.3 Profil des acides gras microbiens retrouvés au cours du compostage.

Au cinquième essai, nous avons également analysé les acides gras microbiens tout au cours du processus de compostage. Seulement certains acides gras ont été étudiés (i15:0, a15:0, 15:0,

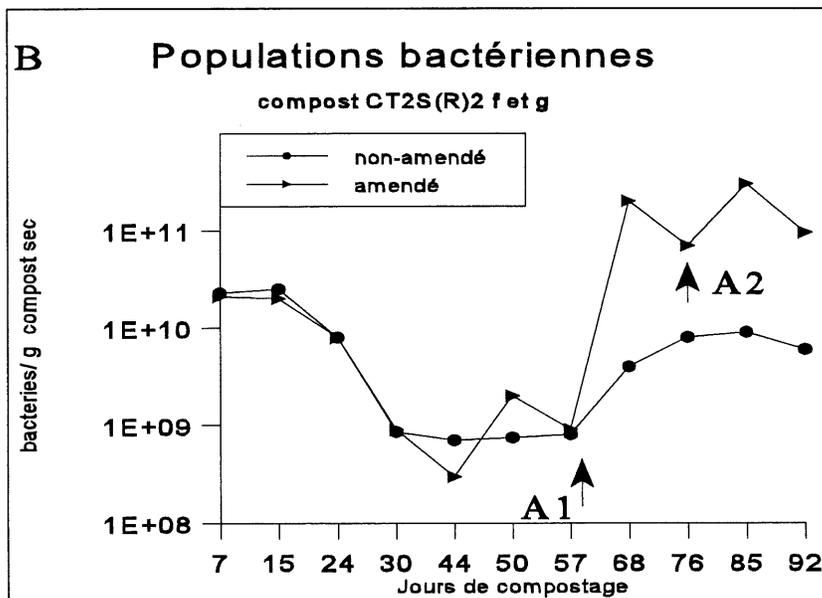
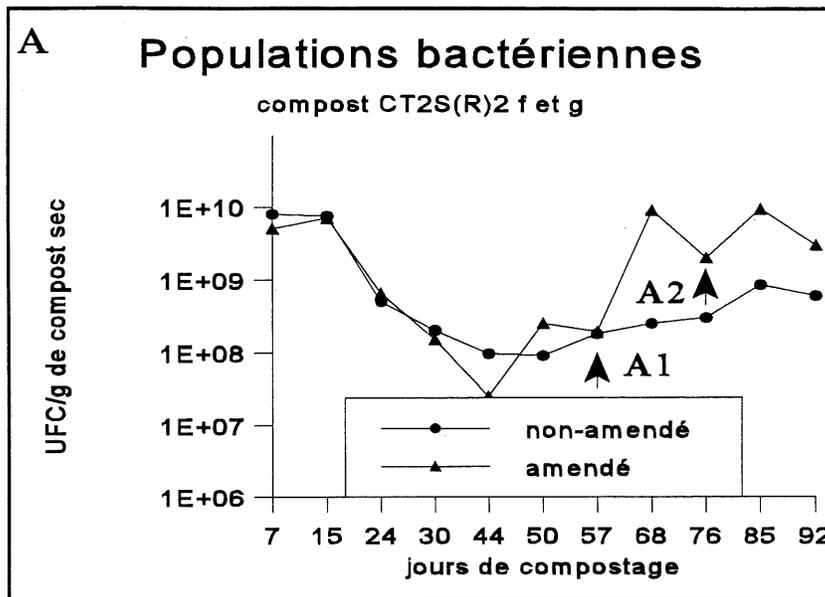


Figure 12. Suivi des populations bactériennes totales par (A) dénombrement sur boîtes de Pétri et (B) par dénombrement direct avec l'utilisation d'un fluorochrome. (▲) bactéries totales dans un compost amendé; (●) bactéries totales dans un compost non-amendé; les signes A1↑ et A2↑ indiquent le moment où les amendements en carapaces de crevettes de 30%(masse sèche/masse sèche) ont été effectués. Les températures imposées suivaient le profil A. Pour A et B, moyenne de 3 échantillons/compost.

i16:0, 16:1, i17:0, a17:0, 17:0, 17:0cyc., 18:0 et 18:2) car ce sont les principaux acides gras des microorganismes (Pennanen, 1996). Les tableaux 2 et 3 montrent les pourcentages des différents acides gras microbiens isolés du compost en fonction du temps. Avant l'amendement (jours 8 à 49), on observait peu de variations au niveau du pourcentage d'acides gras retrouvés dans les deux composts analysés. Seulement à six occasions, un écart de plus du double a été trouvé entre le pourcentage d'un acide gras entre les deux essais. La phase thermophile (jours 15 à 50) a provoqué peu de changement dans la composition globale des acides gras si ce n'est qu'une baisse de l'acide gras 16:1 a été notée au cours de cette phase. En ce qui a trait à l'étude des acides gras branchés (formes iso et antéiso: i15:0, a15:0, i16:0, i17:0, a17:0) versus non-branchés (15:0, 16:1, 17:0, 17:0cyc., 18:0) (figure 13), nous avons remarqué que le rapport acides gras branchés/acides gras non-branchés était plutôt stable au début du compostage (jours 8 à 15) et pendant la phase thermophile (jours 15 à 50). Cependant, lors du retour progressif à la phase mésophile (après le jour 51), la proportion des acides gras branchés a augmenté par rapport aux acides gras non-branchés et ce, pour le compost non-amendé et le compost amendé. Cependant, l'augmentation a été plus forte pour le compost amendé.

Dans ce travail, nous n'avons pas suivi les populations de champignons dans les composts mais nous pouvons estimer leur présence en étudiant la composition en acides gras. L'acide gras 18:2 a été utilisé comme indicateur de la biomasse fongique et sa présence est corrélée avec la quantité d'ergostérol, un stérol retrouvé seulement chez les champignons (Pennanen, 1996).

Le rapport acides gras fongiques/acides gras bactériens était faible au début du processus de compostage (figure 14) mais a augmenté au cours de la phase thermophile (des jours 15 à 50). Lors du retour en phase mésophile, la proportion d'acides gras de champignons est demeurée élevée pour le compost non-amendé mais a diminué énormément pour le compost amendé de carapaces de crevettes.

Tableau 1. Pourcentage des acides gras microbiens pour un compost CT₂S(R)₂ non-amendé

a.g.*	jours de compostage												
	8	16	22	33	42	49	56	61	65	73	82	89	99
i15:0	1,2 ^{a)}	1,5	1,3	1,8	1,3	1,3	2,1	1,4	1,3	2,6	2,3	1,5	2,2
a15:0	2,3	3,5	1,9	2	1,8	1,4	2,1	1,3	1,3	3,2	2,7	1,5	2,1
15:0	0,3	0,5	0,5	0,6	0,8	0,6	1,2	0,4	0,5	0,9	0,7	0,8	0,8
i16:0	1,9	3	1,8	2,1	4,1	2,3	2,1	1,4	2,6	3	2,6	1,8	1,8
16:1	2,7	1,8	0,85	0,95	1,4	1,9	1,5	1	3,4	2	2,2	1,4	1,4
i17:0	0,9	0,9	0,7	0,9	0,9	0,9	2,1	1,3	0,7	2,6	1,6	1,4	1,4
17:0▲	2	2,2	1,9	1,6	1,4	1,3	3,1	0,4	0,9	1,1	0,7	0,5	0,5
17:0	0,5	3,6	0,8	0,9	0,8	0,9	5,2	0,7	0,7	1,2	1,1	1,3	1,3
18:2	2	3,8	2,9	8,3	8,8	11,5	14,2	20,6	15,6	8,6	10,5	20,6	20,6
18:1	13,7	10,4	12,6	15,6	16	16,9	16,7	19	18,5	14,8	16,5	12,8	12,8
18:0	4,4	41	7	6,6	10,2	9,4	8,7	6,2	4,4	6,9	6,9	7,8	7,8

Légende:

a.g.*: acides gras

a) : les résultats présentés sont la moyenne obtenue à partir de 2 échantillons par compost.

Tableau 2. Pourcentage des acides gras microbiens pour un compost CT₂S(R)₂ amendé

a.g.*	jours de compostage												
	8	16	22	33	42	49	56	61	65	73	82	89	99
i15:0	0,8 ^{a)}	1,5	1,3	1,8	0,9	1,6	1,3	3,3	4,4	3,3	3,4	3,5	3,2
a15:0	1,6	3,5	1,9	2,1	0,9	1,4	1,1	5,1	5,5	5,2	4,6	4,4	3,7
15:0	0,3	0,5	0,5	0,5	0,4	0,6	0,4	0,4	0,6	0,9	1,3	0,8	1
i16:0	1,2	3	1,8	2,2	1,1	2,1	1,2	3,7	4,5	4,8	4,9	5	4,1
16:1	3	1,8	0,9	0,8	1,1	1,4	0,8	4,9	7,6	3,5	3,4	2,6	2,5
i17:0	0,7	0,9	0,8	0,9	0,6	1,1	0,8	1,5	2,4	3	2,6	3	2,5
17:0▲	11	2,2	2	1,1	0,8	2	0,3	1,5	1,6	0,9	1,4	1	0,9
17:0	0,5	3,6	0,8	1,1	0,7	1,2	0,6	0,94	0,8	1,1	1,4	1,1	1,1
18:2	0,1	3,8	2,9	7,4	12,6	6,3	3,9	1,9	3,4	3,5	2,6	4,2	0,6
18:1	14,6	10,4	12,7	15,3	15,8	12,9	18	27	17	12,5	15,2	16	11,3
18:0	4,9	4,1	7	7,6	4,7	8,8	5,8	6,3	3,7	5,5	6	5,3	6,2

Légende:

a.g.*: acides gras

a) : les résultats présentés sont la moyenne obtenue à partir de 2 échantillons par compost.

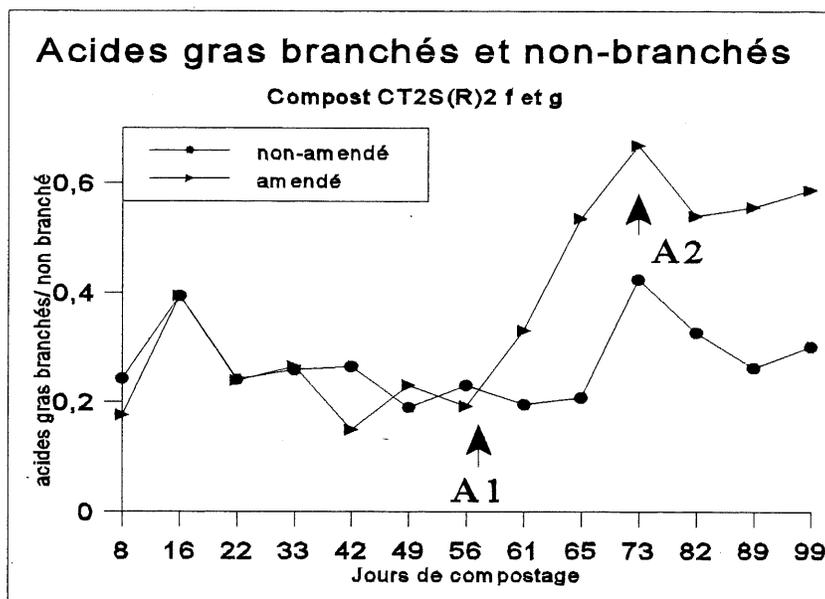


Figure 13. Étude du rapport des acides gras branchés sur les acides gras non-branchés au cours du compostage. (▲) compost CT₂S(R)₂ amendé; (●) compost CT₂S(R)₂ non-amendé; les signes A1↑ et A2↑ indiquent le moment où les amendements en carapaces de crevettes de 30%(masse sèche/masse sèche) ont été effectués. Les températures imposées suivaient le profil A. Les résultats présentés sont la moyenne de 2 échantillons/compost.

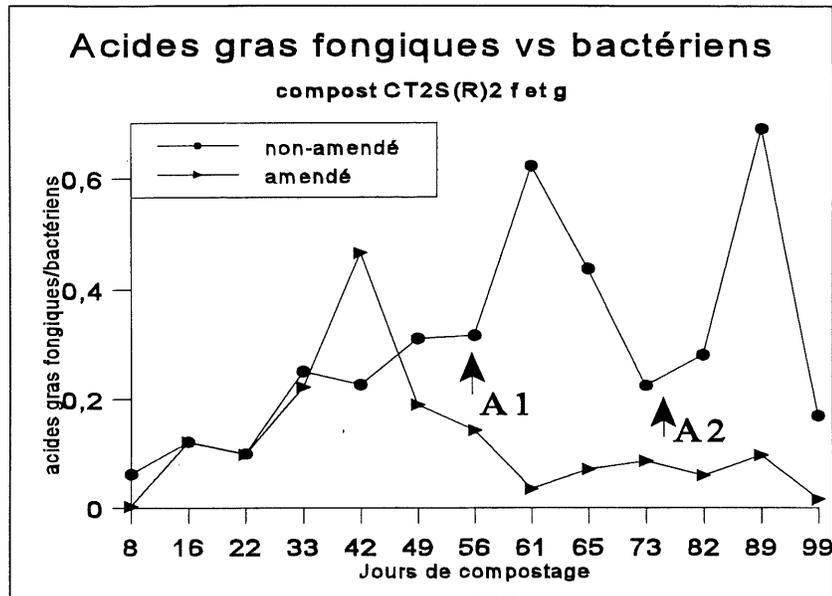


Figure 14. Étude du rapport des acides gras fongiques sur les acides gras bactériens au cours du compostage. (▲) compost CT₂S(R)₂ amendé; (●) compost CT₂S(R)₂ non-amendé ; les signes A1↑ et A2↑ indiquent le moment où les amendements en carapaces de crevettes de 30%(masse sèche/masse sèche) ont été effectués. Les températures imposées suivaient le profil A. Les résultats présentés sont la moyenne de 2 échantillons/compost.

CHAPITRE 3

DISCUSSION

Le but général de ce projet multidisciplinaire est de produire, à partir de résidus chitineux marins, un compost ayant de bonnes qualités fertilisantes et des propriétés phytoprotectrices et fongistatiques. Notre objectif spécifique était d'étudier la dynamique de certaines populations bactériennes (totales, cellulolytiques et chitinolytiques) tout au cours du processus de compostage. Une meilleure compréhension de la microbiologie des composts pourrait permettre de déterminer des critères microbiologiques de qualité.

Dans tous les composts analysés, la diversité microbienne était grande en début de compostage c'est-à-dire que les populations microbiennes étaient nombreuses et que plusieurs types de colonies se retrouvaient sur les milieux de culture. Les populations bactériennes varient en fonction de différents facteurs comme les changements de températures et les amendements en cours de compostage. Nous avons remarqué que lors des augmentations de températures à 50°C (phases thermophiles), les populations bactériennes connaissent des chutes importantes. Ce phénomène est tout à fait normal puisque une température de 50°C devient un facteur limitant à la croissance de certains organismes qui sont tout simplement tués ou qui entrent en dormance sous forme de spores (Mustin, 1987; Blaine, 1993). Un amendement durant le compostage peut être effectué pour obtenir un compost contenant encore des oligomères de chitine en fin de compostage ou pour stimuler des populations microbiennes spécifiques. Un amendement en carapaces de crevettes favorise la prolifération des microorganismes capables d'exploiter le gros polymère qu'est la chitine. C'est pourquoi l'augmentation de la quantité de microorganismes chitinolytiques après les amendements n'a rien de surprenant car ceux-ci ont eu lieu à des moments où le compost était pauvre en nutriments facilement assimilables. Les autres types de populations augmentent aussi suite à un amendement. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que les

carapaces de crevettes sont souvent contaminées avec des morceaux de chair renfermant des protéines facilement exploitables par une foule de microorganismes.

Peu d'études ont été réalisées sur la microbiologie des composts au niveau du suivi des populations microbiennes. Les études précédentes sur la microbiologie du compostage ne présentent pas de suivi des populations à de courts intervalles de temps tout au cours du processus. La plupart des études n'ont analysé que quelques échantillons (Environ 4 à 6) pendant le compostage par la méthode de dénombrement des bactéries viables (Andrews, 1994). Les décomptes obtenus pour leurs composts (bactéries totales viables sur Nutrient agar) ressemblaient aux décomptes obtenus pour nos composts non-amendés soit une oscillation entre 10^7 et 10^8 UFC (Andrews, 1994). Pour ce qui est de l'étude de la microbiologie des composts à base de résidus chitineux, nous sommes les pionniers.

Dans tous les composts analysés, nous avons constaté l'apparition en grand nombre de bactéries appartenant à la famille des actinomycètes au milieu de la phase thermophile. Leur proportion grandissait de semaines en semaines et lors du retour à la phase mésophile pour la période de maturation, alors qu'il ne reste dans les composts que de grands polymères comme la cellulose, ces actinomycètes étaient largement majoritaires. Ils représentaient entre 80 et 95% des bactéries présentes sur les milieux contenant le carboxyméthylcellulose et la chitine. Plusieurs souches d'actinomycètes ont été isolées à partir des différents composts. Leurs parois contenaient l'acide LL-diaminopimélique et leurs morphologies nous indiquent qu'elles appartiennent au genre *Streptomyces*. Ces actinomycètes, qui pour la plupart croissaient à 30 et à 50°C, démontraient de fortes activités chitinolytiques et cellulolytiques (résultats non-montrés). Dans quelques études, on parle de l'abondance des actinomycètes dans les processus de compostage. Riffaldi et al. (1986) ont remarqué que la dégradation de la cellulose pendant la phase de maturation était effectuée essentiellement par des actinomycètes très nombreux et par certains champignons. Les actinomycètes colonisent plus lentement les substrats frais des composts que les autres types de

bactéries mais sont largement majoritaires en fin de compostage dans les conditions plus difficiles (Finstein et Morris, 1975). D'ailleurs, l'augmentation de leur proportion est corrélée avec la diminution des autres groupes de bactéries durant le processus de compostage (Kostov et Petkova, 1995).

On peut aussi remarquer que, dans presque tous les essais, les courbes des populations cellulolytiques et chitinolytiques sont très souvent semblables. Nous en sommes venus à conclure qu'un grand nombre des bactéries dénombrées sur les milieux chitine et CMC sont à la fois cellulolytiques et chitinolytiques tout comme le sont les actinomycètes isolés (résultats non-montrés). Dans son étude, Rifaldi (1986) a étudié les bactéries cellulolytiques pendant le compostage des boues usées avec de la paille. Dans ses composts, le nombre des bactéries cellulolytiques augmentait progressivement et se stabilisait à un taux élevé jusqu'à la fin du compostage. Dans notre cas, les bactéries cellulolytiques sont à un taux basal assez élevé et ne varient pas énormément pendant le compostage sauf lorsqu'il y a amendement. Si l'amendement en chitine devrait faire augmenter les bactéries chitinolytiques et qu'il fait augmenter aussi les bactéries cellulolytiques, l'hypothèse que les bactéries chitinolytiques soient aussi cellulolytiques est fort plausible.

Au deuxième essai, nous avons voulu étudier la possibilité de composter des sciures de résineux au lieu des sciures de feuillus. Ceci dans l'optique qu'au Québec, et en particulier dans les régions maritimes où se retrouvent les résidus chitineux, ce sont les types de copeaux et de sciures qui sont les plus accessibles. Advenant l'ouverture d'une usine de compostage à grande échelle, elle se trouverait probablement à proximité des sites de production des carapaces de crevettes et l'usage de sciures de résineux serait plus pratique (F. Thiffault, communication personnelle). Les sciures de résineux contiennent toutes sortes de composés phénoliques qui pourraient affecter la croissance de certains microorganismes. Le fait d'utiliser un type de sciures ou l'autre ne semble pas affecter la dynamique des populations bactériennes. Nous remarquons en effet

sensiblement les mêmes phénomènes que pour la première série soit des baisses de populations bactériennes totales, cellulolytiques et chitinolytiques à la phase thermophile et une stabilisation en phase mésophile ou une forte augmentation dans les composts amendés. Nous pouvons donc conclure que le fait d'employer des sciures de résineux ne semble pas affecter la microflore quant à son nombre. Les sciures de résineux ne sont donc pas une biomasse problématique à composter.

Pour le troisième essai, nous avons voulu déterminer si le fait d'ajouter les carapaces de crevettes en cours de processus de compostage plutôt qu'au début pouvait nuire à leur dégradation. Les composts qui ont des résidus chitineux dans leur mélange initial possèdent vraisemblablement une microflore chitinolytique qui est associée aux substrats. Cette microflore peut ensuite être restimulée par un amendement en résidus chitineux. Cependant, il est intéressant de voir comment, dans un compost sans résidus chitineux dans sa composition initiale, les populations chitinolytiques vont se modifier lors d'un amendement en résidus chitineux au cours du compostage. Un mélange contenant de l'urée $UT_2S(R)_2$ a été conçu, l'urée agissant comme source d'azote pour les microorganismes. Ce mélange a été comparé au mélange habituel $CT_2S(R)_2$ et à un mélange $C_2T_9S(R)_9$, contenant un plus petit volume de carapaces de crevettes. Le but de cet essai est aussi d'optimiser la quantité de chitine qu'il faut composter pour obtenir les effets désirés (hypothèses de propriétés fongistatiques et phytoprotectrices) au cas où les carapaces de crevettes deviendraient un facteur limitant. Pour cet essai, nous avons modifié le patron de températures imposées. En effet, pour les 2 premiers essais, nous avons établi un patron de températures avec une phase mésophile de 2 semaines suivi d'une phase thermophile de 4-5 semaines. Finalement une longue phase mésophile de maturation suivait, phase durant laquelle se produisaient les amendements (fig. 1A). Des essais de compostage à moyenne échelle (120 litres) de carapaces de crevettes ont été effectués au C.R.I.Q. Ils ont été remarqués que le compost entrait très rapidement en phase thermophile en présence de carapaces de crevettes (au départ et lors des amendements). Les phases thermophiles étaient très courtes et la température s'élevait autour de 65-70°C (L. Côté, communication personnelle). Nous avons suivi les patrons

de température que le C.R.I.Q. (fig. 1B) nous a soumis pour que nos essais se rapprochent le plus possible de la réalité à moyenne et grande échelle.

Le fait d'avoir remplacé les carapaces de crevettes par de l'urée pure dans le compost $UT_2S(R)_2$ peut vraisemblablement expliquer les populations bactériennes plus faibles dans ces types de composts au début du processus. La quantité d'azote disponible était probablement différente dans ces composts. Le pH du compost contenant l'urée pure au départ est plus acide que les composts de carapaces de crevettes et c'est probablement un autre facteur qui expliquerait les populations plus faibles. Aussi, des décomptes ont été effectués à partir de différents intrants. Les carapaces de crevettes renferment beaucoup plus de microorganismes que les sciures et la tourbe (résultats non-montrés). Le fait d'avoir remplacé les carapaces de crevettes par l'urée qui ne renferme que très peu de microorganismes expliquerait peut-être en partie la quantité de microorganismes plus faible au départ.

Par contre, le compost $UT_2S(R)_2$ a bien réagi à l'amendement (augmentation des populations). La microflore chitinolytique semble donc être présente dans d'autres intrants que les carapaces de crevettes et, par conséquent, l'apport en carapaces de crevettes n'est pas essentiel pour que celles-ci soient efficacement décomposées après les amendements. Il se pourrait aussi fort bien que la microflore chitinolytique soit tout simplement transportée par les carapaces de crevettes.

Pour cet essai, il n'y a pas eu de baisse des populations bactériennes habituellement associée à la phase thermophile. De même, lorsque les amendements sont effectués, la phase thermophile imposée est très courte. Il est donc normal que les populations augmentent pendant la phase thermophile car elles sont stimulées par l'apport en carapaces de crevettes. Les amendements effectués lors des 2 premiers essais avaient eu lieu à la phase mésophile qui suivait la longue phase thermophile. Pendant la phase thermophile, il n'y avait aucun apport en nutriments facilement utilisables. Il était donc normal de voir diminuer les populations. Si l'amendement avait été

effectué en phase thermophile, nous aurions probablement remarqué une augmentation des populations bactériennes.

Au quatrième essai, nous avons voulu vérifier la possibilité de donner à un compost commercial les effets bénéfiques de la chitine (phytoprotection) en l'amendant avec des carapaces de crevettes. Le compost Aquaterre est fabriqué à partir de carapaces de crevettes alors que le compost de feuilles n'a jamais été en contact avec une biomasse chitineuse. C'est probablement ce qui explique le faible taux basal de bactéries chitinolytiques dans le compost de feuilles. Par conséquent, suite à l'amendement, la hausse des populations est beaucoup plus impressionnante que pour le compost Aquaterre qui avait un taux de bactéries chitinolytiques près de 100 fois plus élevé au départ. C'est un phénomène normal puisque le compost Aquaterre est fait à partir de résidus chitineux et donc le taux basal de microorganismes chitinolytiques est plus élevé. Il ne semble donc pas y avoir de problème à ajouter des carapaces de crevettes sous forme d'amendement dans un compost commercial afin de lui donner les propriétés recherchées.

Pour le dernier essai, nous avons refait certains mélanges qui s'avéraient les plus prometteurs en ce qui a trait aux caractères phytoprotecteurs et fongistatiques (C. Labrie, communication personnelle, 1996). Le patron de températures utilisé est celui des 2 premiers essais (figure 1A). Pour ce dernier essai, en plus de la technique de dénombrement des cellules viables sur milieux de cultures, 2 autres techniques (décompte direct par épifluorescence et l'analyse des acides gras) ont été utilisées pour étudier les populations microbiennes.

L'allure des courbes de populations bactériennes totales obtenues par les 2 méthodes soient le dénombrement direct par fluorescence et le dénombrement des bactéries viables sur milieux de culture sont presque identiques. Cependant et, comme prévu, (Atlas et Bartha, 1993; Kepner, 1994) les dénombrements avec l'utilisation du fluorochrome sont toujours plus élevés que les dénombrements de cellules viables. Ces dénombrements élevés peuvent être attribués à 2 facteurs.

Premièrement, ce ne sont pas toutes les bactéries présentes dans un échantillon qui peuvent croître sur le milieu riche (GPCA). Donc, certaines bactéries qui n'ont pas été dénombrées sur le milieu de culture en boîte de Pétri se retrouvaient bel et bien dans l'échantillon et ont été dénombrées par la technique utilisant la fluorescence. La méthode classique de dénombrement des cellules viables offre donc une sous-estimation des populations présente dans un échantillon. Deuxièmement, le colorant que nous utilisons colore les bactéries vivantes mais aussi les bactéries mortes que l'on retrouve dans l'échantillon.

La dernière technique que nous avons utilisé est l'étude des acides gras microbiens. Aucune étude semblable n'a été proposée jusqu'à ce jour soit de suivre l'évolution des acides gras dans le temps au cours du processus de compostage. Cependant, certaines études d'écologie microbienne ont utilisé cette technique pour étudier les microorganismes des sols. Par exemple, Pennanen (1996) a utilisé l'analyse des acides gras pour différencier les patrons d'acides gras des différentes populations microbiennes dans des sols pollués par des métaux lourds.

Nous avons tout d'abord étudié le rapport entre les acides gras branchés (types iso et antéiso) et les acides gras non-branchés. Le rapport acides gras branchés/acides gras non-branchés a augmenté dans le temps surtout après la phase thermophile et cette augmentation a été encore plus forte dans le cas des composts amendés. Ceci voudrait dire que les microorganismes possédant de forts pourcentages d'acides gras branchés se sont développés à partir de la fin de la phase thermophile et que ceux-ci se sont trouvés avantagés par l'amendement en carapaces de crevettes. Comme vu dans la section des résultats, des bactéries appartenant au groupe des actinomycètes deviennent majoritaires au milieu de la phase thermophile et augmentent en proportion par rapport aux autres bactéries à la phase mésophile qui suit et encore plus lors des amendements. Les actinomycètes sont reconnus pour avoir de très forts pourcentages d'acides gras branchés (Suzuki, 1988) et leur augmentation coïncide avec l'augmentation de la proportion des acides gras branchés. Après la phase thermophile, il ne reste plus dans le compost que de longs

polymères comme la cellulose ou la chitine (amendement). Les actinomycètes sont aussi bien connus pour leur capacité à dégrader les grands polymères. De plus, après les amendements, ces bactéries augmentent en nombre tout comme la proportion des acides gras branchés. Beaucoup d'actinomycètes sont chitinolytiques; certains chercheurs proposent même d'utiliser des milieux contenant de la chitine comme seule source de carbone pour estimer leurs populations dans un environnement donné (Hsu et Lockwood; 1975).

L'augmentation de la température se traduit chez la plupart des bactéries par une diminution de l'acide gras insaturé 16:1 alors que d'autres acides gras insaturés comme le 18:1 sont en général peu affectés par une hausse thermique (Hardwood et Russell, 1984). Dans notre essai, la phase thermophile correspond au moment où le taux de l'acide gras 16:1 est à son plus bas. Cette baisse serait probablement due à une adaptation des bactéries à une hausse de température.

Par cette même méthode d'analyse des acides gras, nous avons voulu vérifier la présence des champignons dans les composts. Pour ce faire, l'acide gras 18:2 a été utilisé comme indicateur de la biomasse fongique en comparaison aux autres acides gras d'origine bactérienne (Pennanen, 1996). Nous avons étudié le rapport acides gras fongiques/acides gras bactériens au cours du processus de compostage. Comme la proportion d'acides gras fongique est faible au début du processus, cela porte à croire que les champignons sont peu abondants ou sont sous forme de spores. Au cours de la phase thermophile, la proportion d'acides gras fongiques a augmenté ce qui indique que les champignons ont dû se développer pendant cette phase. L'amendement semble s'accompagner d'une baisse des populations fongiques. Cette baisse n'est pas observée dans le compost non-amendé. Ceci pourrait résulter du fait que la présence de chitine en haute concentration nuirait à la croissance des champignons.

Certaines études ont démontré que les produits intermédiaires de dégradation de la chitine et du chitosane exercent une action fongistatique en limitant la croissance d'un bon nombre de

champignons phytopathogènes (Allan et Hadwiger, 1979; Hirano et Nagao, 1989). Au début du processus, alors que la concentration en chitine est forte, les populations fongiques sont faibles. Cependant, après 3 ou 4 semaines de compostage, la quantité de chitine présente devait avoir considérablement diminué et c'est probablement ce qui a permis l'augmentation des populations de champignons correspondant à la phase thermophile. Ceci est un peu étonnant puisque d'après Blaine (1993) les populations de champignons sont habituellement faibles pendant la phase thermophile. Ensuite lorsque le compost a été amendé de carapaces de crevettes, la quantité de champignons aurait diminué drastiquement pour la même raison. Étant donné que nous avons effectué deux amendements successifs, la concentration de chitine présente est demeurée élevée, ce qui aurait empêché les champignons d'avoir une bonne croissance. Quelques champignons ont été isolés à partir des composts. Ils avaient tous une bonne croissance à 30°C et à 50°C. De plus, un test de croissance sur le milieu chitine a révélé qu'ils croissaient peu ou pas en présence de ce polymère (résultats non-montrés). Il faudrait dans un essai futur suivre les populations de champignons pendant le compostage pour savoir si les indications données par l'étude des acides gras s'avèrent justes pour suivre les populations fongiques.

CONCLUSION

Nous avons étudié la dynamique des populations microbiennes (bactéries totales, cellulolytiques et chitinolytiques) au cours du processus de compostage des résidus chitineux. Leurs nombres augmentent ou diminuent selon les phases de températures et les amendements en carapaces de crevettes. Les trois types de populations étudiées diminuaient pendant la phase thermophile et se stabilisaient lors du retour à la phase mésophile. Les amendements ont toujours eu comme effet de provoquer de fortes hausses de populations bactériennes chitinolytiques mais aussi cellulolytiques et totales. Des essais de compostage ont été réalisés avec des sciures de résineux ou des sciures de feuillus et les résultats se sont avérés similaires au niveau des populations. Les sciures de résineux ne semblent donc pas affecter au niveau du nombre de microorganismes et le produit final est relativement semblable (S. Roy, communication personnelle).

Il a aussi été prouvé que les carapaces de crevettes ne devaient pas obligatoirement se retrouver comme intrant en début de compostage mais qu'on pouvait simplement les ajouter sous forme d'amendements en cours de compostage. La microflore chitinolytique est soit présente dans les différents intrants ou elle est amenée par les carapaces de crevettes et n'a pas besoin d'une première stimulation afin de dégrader les carapaces de crevettes efficacement lors d'un amendement ultérieur. Des essais d'amendement de composts commerciaux avec des carapaces de crevettes ont aussi été réalisés. Encore une fois, la microflore chitinolytique a su se développer pour dégrader les résidus chitineux. Dans chacun des essais de compostage, nous avons noté une importante prolifération d'actinomycètes à partir du milieu de la phase thermophile. Ces bactéries demeuraient en nombre élevé lors du retour en phase mésophile et étaient à nouveau stimulées par des amendements.

Pour la dernière série de compostage, deux techniques ont été utilisées pour dénombrer la microflore. Une technique de comptage direct des bactéries totales avec l'utilisation d'un fluorochrome a été comparée à la technique de décompte des bactéries totales viables. Comme prévu par la théorie, les décomptes directs sont de 10 à 100 fois plus élevés. L'étude des acides gras nous a aussi fourni des indices sur la présence dans les compost de certains microorganismes. À partir de la phase

thermophile et après les amendements, le compost s'est enrichi d'acides gras branchés. Les actinomycètes ont justement un fort pourcentage de ces acides gras. Nous avons donc pu établir certains liens entre les populations microbiennes et l'étude des acides gras. Nous avons aussi pu suivre l'évolution de la biomasse fongique lors du compostage par l'étude d'un acide gras particulier. Cette méthode semble être appropriée mais il faudrait la corrélérer avec d'autres techniques pour avoir confirmation de nos dires.

Il est certain que cette étude fait partie d'un tout. Les résultats des études au niveau de la qualité du compost (capacité d'échange cationique, conductivité, tests de phytotoxicité, pH, suivi des oligomères de chitine) effectués par Sébastien Roy et de l'aspect phytoprotection effectué par Cinthia Labrie doivent venir se greffer aux résultats de la caractérisation microbiologique afin de tirer les conclusions finales pour ce projet multidisciplinaire. Nous pourrions ainsi décider de la quantité nécessaire de carapaces de crevettes et de la proportion de chaque intrant pour obtenir un produit final fongistatique, phytoprotecteur et fertilisant. Ainsi, à la lueur des résultats combinés, nous pourrions donner des indices microbiologiques permettant de juger de la maturité ou de l'évolution d'un compost. Cette étude pourrait mener à la commercialisation d'un produit tout nouveau qui pourrait fortement intéresser les artisans de certaines cultures souvent menacées par les champignons microscopiques. Si un tel produit naturel était efficace, on pourrait même penser à réduire ou à éliminer l'emploi de fongicides afin de contrer ces champignons phytopathogènes.

Bibliographie

ALLAN, C.R., L.A. HADWIGER. 1979. The fungicidal effect of chitosan on fungi of varying cell wall composition. *Mycol.* 3:285-287.

ANDREWS, S.A., H. LEE, J.T. TREVORS. 1994. Bacterial species in raw and cured compost from large-scale urban composter. *J. Ind. Microbiol.* 13:177-182.

ATLAS, R.M., G. SAYLER, R.S. BURLAGE, A.K. BEJ. 1992. Molecular approaches for environmental monitoring of microorganisms. *Biotechniques* 12: 706-718.

ATLAS, R.M., R. BARTHA. 1993. *Microbial ecology: fundamentals and applications*. 3rd edition. The benjamin/cummings publishing company, inc. 390 Bridge Parkway, Redwood city, CA 94065. 563p.

BEJ, A.K., R.J. STEFFAN, J. DICESARE, L. HAFF, R. M. ATLAS. 1990. Detection of coliform bacteria in water by polymerase chain reaction and gene probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 307-314.

BERGSTROM, I., A.HEINANEN, K. SALONEN. 1986. Comparison of acridine orange, acriflavine, and bisbenzimidazole stains for enumeration of bacteria in clear and humic water. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 664-667.

BLAINE METTING JR. F. 1993. *Soil microbial ecology: applications in agricultural and environmental management*. New York, Basel, Hong Kong. Marcel Dekker Inc. 646p.

BLIGH, E.G., W.J. DYER. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 911-917.

BRODIE, H.L., L.E. CARR, A.T. TOLLEY. 1994. Crab scrap compost demonstration. *American Society of Agricultural Engineers*. 37 : 853-856.

BURGE, W.D., W.N. CRAMER, E. EPSTEIN. 1978. Destruction of pathogens in sewage sludge by composting . *Trans. ASAE* : 510-514.

CATHCART T.P., F.W. WHEATON, R.B. BRINSFIELD. 1986. *Agricultural wastes*. 15 : 269-287.

DUPUY. A.C. 1991. Hydrolyse enzymatique de la chitine et de son produit déacétylé, le chitosane, effectuée par des actinomycètes isolés à partir de différents sols canadiens. Mémoire de M.Sc. Université de Sherbrooke.

- FAUCHER, E., E. PARADIS, C. GOYER, N.C. HODGE, R. HOGUE, R.E. STALL, C. BEAULIEU. 1995. Characterization of Streptomyces causing deep-pitted scab potato in Quebec, Canada. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45: 222-225.
- FINSTEIN, M.S., F.C. MILLER, P.F. STROM. 1986. *Biotechnology 8 : Waste treatment composting as a controlled system.* Pp 363-398.
- FINSTEIN, M.S., MORRIS, M.L. 1975. Microbiology of municipal solid waste composting. *Adv. Appl. Microbiol.* 19: 113-151.
- FROSTEGARD, A., A. TUNLID, E. BAATH. 1993. Phospholipid fatty acid composition, and activity of microbial communities from two soil types experimentally exposed to different heavy metals. *Appl. Environ. Microbiol.* 59 : 3605-3617.
- GOLDSTEIN, N. 1988. Steady growth for sludge composting. *Biocycle* 29: 27-36.
- GRAY, K.R., K. SHERMAN, A.J. BIDDLESTONE. 1971. Review of composting part 2- The practical process. *Process. Biochem.* 6: 22-28.
- GREENWOOD, D.J. 1961. The effect of oxygen concentration on the decomposition of organic materials in soil. *Plant Soil* 14: 360-376.
- HADWIGER, L.A., C. CHIANG, S. VICTORY, D. HOROWITZ. 1989. The molecular biology of chitosan in plant/pathogen interaction and its application in agriculture. Pp.119-138 dans *Chitin and Chitosan sources, chemistry, biochemistry, physical properties and applications.* Editeurs: G. Skjak-broek, T. Anthonsen, P. Sanford. Elsevier Applied Science, London and New York 835p.
- HADWIGER, L.A., T. OGAWA, H. KUYAMA. 1994. Chitosan polymer sizes effective in inducing phytoalexin accumulation and fungal suppression are verified with synthesised oligomers. *Mol. Plant-Micro. Interac.* 7:531-533.
- HIRANO, S., N. NAGAO. 1989. Effects of chitosan, pectic acid, lysosyme, and chitinase on the growth of several phytopathogens. *Agric. Biol. Chem.* 53 : 3065-3066.
- HOITINK, H.A. 1980. Composted bark, a lightweight growth medium with fungicidal properties. *Plant Dis.* 64: 142-147.
- HSU, S.C., J.L. LOCKWOOD. 1975. Powdered chitin agar as a selective medium for enumeration of actinomycetes in water and soil. *Appl. Microbiol.* 29: 422-426.

INSAM, H., K. AMOR, M. RENNER, C. CREPAZ. 1996. Changes in functional abilities of the microbial community during composting of manure. *Microbiol. Ecol.* 31:77-87.

JERIS, J.S., W.R. REGAN. 1973. Controlling environmental parameters for optimum composting. *Compost sci.* 14: 16-22.

JEUNIAUX, C., M.-F. VOSS-FOUCART, M. POULICEK, J.-C. BUSSERS. 1989. Sources of chitin, estimated from new data on chitin biomass and production. Pp.3-11 dans *Chitin and Chitosan sources, chemistry, biochemistry, physical properties and applications*. Editeurs: G. Skjak-broek, T. Anthonsen, P. Sanford. Elsevier Applied Science, London and New York;835p.

KENDRA, D.F., L.A. HADWIGER. 1984. Characterisation of the smallest chitosan oligomer that is maximally antifungal to *Fusarium solani* and elicit pisatin formation in *Pisum sativum*. *Exp. Mycol.* 8: 276-281.

KENDRA, D.F., D. CHRISTIAN, L.A. HADWIGER. 1989. Chitosan oligomers from *Fusarium solani*/pea interactions, chitinase/ β -glucanase digestion of sporelings and from fungal wall chitin actively inhibit fungal growth and enhance disease resistance. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 35 : 215-230.

KEPNER, R.L. , J.R. PRATT.. 1994. Use of fluorochrome for direct enumeration of total bacteria in environmental samples: past and present. *Microbiological Reviews.* 58 : 603-615.

KOSTOV, O., G. PETKOVA. 1995. Microbial indicators for sawdust and bark compost stability and humification processes. Elsevier Science Limited. p.193-200.

KUROSAKI, F., N. TASHIRO, A. NISHI. 1986. Induction of chitinase and phenylalanine ammonia-lyase in cultured carrot cells treated with fungal mycelial walls. *Plant Cell Physiol.* 27: 1587-1591.

LEHMAN, R.M., F.S. COLWELL, D.B. RINGELBERG, D.C. WHITE. 1995. Combined microbial community-level analyses for quality assurance of terrestrial subsurface cores. *J. Microbiol. Meth.* 22:263-281.

MACGREGOR, S.T., F.C. MILLER, K.M. PSARIANOS, M.S. FINSTEIN. 1981. Composting process control based on interaction between microbial heat output and temperature. *Appl. Environ. Microbiol.* 41:1321-1330.

MATHUR, S.P. J.-Y. DAIGLE, M. LÉVESQUE, H. DINEL. 1985. Peat as a medium for composting fish and crab wastes. *Proc. Symposium 85. A technical and Scientific Conference on Peat and Peat Lands.* 279-290.

MATHUR, S.P., J.-Y. DAIGLE, M. LÉVESQUE, H. DINEL. 1986. The feasibility of preparing high quality composts from fish scrap and peat with seaweeds or crab scrap. *Biol. Agric. and Horticult.* 4 : 27-38.

MATHUR, S.P., J.-Y. DAIGLE, J.L. BROOKS, M. LÉVESQUE, J. ARSENAULT. 1988. Composting seafood wastes. *Biocycle sept* : 44-49.

MCCARTHY, A.J. 1987. Lignocellulose-degrading actinomycetes. *FEMS Microbiol. Rev.* 46: 146-163.

MCCARTHY, A.J., S.T. WILLIAMS. 1991. Actinomycetes as agents of biodegradation in the environment-a review. *Gene* 115: 189-192.

MCKINLEY, V.L., J.R. VESTAL. 1984. Biokinetic analysis of adaptation and succession: microbial activity in composting municipal sewage sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 47: 933-939.

MILLER, F.C. 1989. Matric water potential as an ecological determinant in compost, a substrate dense system. *Microb. Ecol.* 18: 59-71.

MILLER, F.C., FINSTEIN, M.S. 1985. Material balance in the composting of sewage sludge affected by process control strategy. *J. Water Pollut. Control. Fed.* 57: 122-127.

MUSTIN, M. 1987. *Le compost: gestion de la matière organique.* Editions François Dubusc. 75015 Paris. 954p.

NAKASAKI, K., M. SHODA, H. KUBOTA. 1985. Effect of temperature on composting sewage sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 50: 1526-1530.

OISHI, K., F. ISHIKAWA, M. NOMOTO. 1989. Chitinolytic and lysosymic activities in plants. Pp.185-195 dans *Chitin and Chitosan sources, chemistry, biochemistry, physical properties and applications.* Editeurs: G. Skjak-broek, T. Anthonsen, P. Sanford. Elsevier Applied Science, London and New York 835p.

PARADIS, E., C. GOYER, N.C. HODGE, R. HOGUE, R.E. STALL, C. BEAULIEU. 1994. Fatty acid and protein profiles of *Streptomyces scabies* strains isolated in eastern Canada. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44: 561-564.

PENNANEN, T., A. FROSTEGARD, H. FRITZE, E. BAATH. 1996. Phospholipid fatty acid composition and heavy metal tolerance of soil microbial communities along two heavy metal-polluted gradients in coniferous forests. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 420-428.

PENNISI, E. 1993. Chitin craze. *Sciences News*. 144: 72-74.

PERRAKIS, A., K.S. WILSON, I. CHET, A.B OPPENHEIM, C.E. VORGIAS. 1993. Phylogenetic relationships of chitinases. Pp. 217-231 dans *Chitin Enzymology*. Editeur: R.A.A. Muzarelli. Eur. Chitin Soc., Ancona.

RANDLE, P., P.B. FLEGG. 1985. The effect of duration of composting on compost bulk density and the yield of mushrooms. *Sci. Hortic*. 27: 21-31.

RIFFALDI, R., R. LEVI-MINZI, A. PERRA, M. DE BERTOLI. 1986. Evaluation of compost maturity by means of chemical and microbial analyses. *Waste Management and Research*. 4:387-396.

SANDFORD, P.A. 1989. Chitosan: commercial uses and potential applications. Pp.51-69. dans *Chitin and Chitosan sources, chemistry, biochemistry, physical properties and applications*. Editeurs: G. Skjak-broek, T. Anthonsen, P. Sanford. Elsevier Applied Science, London and New York 835p.

SAVAGE, J., T. CHASE, J.D. MACMILLAN. 1973. Population change in enteric bacteria and other microorganisms during aerobic thermophilic composting of sewage sludge. *Appl. Microbiol*. 26: 969-974.

SENG, J.M. 1988. Chitine, chitosane et dérivés: de nouvelles perspectives pour l'industrie. *Biofutur* : 88-93.

SHAIKH, S.A., M.V. DESHPANDE. 1993. Chitinolytic enzymes: their contribution to basic and applied research. *J. Micro. Biotech*. 9: 468-475.

SHALLENBERG, M.J., J. KALFF, J.B. RASMUSSEN. 1989. Solutions to problems in enumerating sediment bacteria by direct counts. *Appl. Environ. Microbiol*. 55: 1214-1219.

SHULZE, K.L. 1962. Continuous thermophilic composting. *Appl. Microbiol*. 10: 108-122.

SIMONET, P., M.C.GROSJEAN, A.K. MISRA, S. NAZARETH, B. COURNOYER, P. NORMAND. 1991. *Frankia* genus-specific characterization by polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol*. 57: 3278-3286.

STEFFAN, R.J. , R.M ATLAS. 1988. DNA amplification to enhance detection of genetically engineered bacteria in environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol*. 54: 2185-2191.

STROM, P.F. 1985. Effect of bacterial diversity in thermophilic solid waste composting. *Appl. Environ. Microbiol*. 50: 899-905.

STRUSZCZYK, H., H. POSPIESZNY, S. KOTLINSKI. 1989. Some new applications of chitosan in agriculture. Pp. 733-742. dans Chitin and Chitosan sources, chemistry, biochemistry, physical properties and applications. Editeurs: G. Skjak-broek, T. Anthonsen, P. Sanford. Elsevier Applied Science, London and New York 835p.

SULER, D.J., M.S. FINSTEIN. 1977. Effect of temperature, aeration and moisture on CO₂ formation in bench-scale, continuously thermophilic composting of solid waste. Appl. Environ. Microbiol. 33: 345-350.

SUZUKI, K. 1988. Cellular fatty acid analysis in actinomycete taxonomy. Pp. 251-256 dans Biology of actinomycetes. Editeurs: T. OGAMI, T. BEPPU, H. OGAWARA. Japan, Scientific press.

THOMSON, I.P., M.J. BALEY, R.J. ELLIS, K.J. PURDY. Subgrouping of bacterial populations by cellular fatty acids composition. FEMS Microbiol. Ecol. 102: 75-84.

WILEY, B.B, S. WESTERBERG. 1969. Human pathogens in composted sewage. Appl. Microbiol. 18: 994-1001.

ZIMMERMANN, W., P. BRODA. 1989. Utilization of lignocellulose from barley straw by actinomycetes. Appl. Microbiol. Biotechnol. 30: 103-109.