

## Identification de l'origine des uréases impliquées dans le traitement de la paille de blé dur à l'urée et caractérisation de la flore microbienne présente

V Yameogo-Bougouma, R Cordesse, A Arnaud, M Inesta

INRA-ENSAM, Unité de zootechnie méditerranéenne,  
place Viala, 34060 Montpellier Cedex 1, France

(Reçu le 15 novembre 1991; accepté le 3 juillet 1992)

**Résumé** — Dans cette étude, nous avons recherché, sur le matériel végétal destiné à subir un traitement à l'urée, s'il existait des micro-organismes à propriétés uréasiques capables de se multiplier, et ainsi d'assurer des conditions favorables à l'hydrolyse complète de l'urée. Dans un premier essai, les uréases d'origine microbienne ou végétale apportées par la farine de soja et la paille de blé dur ont été identifiées. Les échantillons humidifiés à 33% ont été stérilisés (120 °C, 1 h), tyndallisés (90 °C, 1 h, 6 fois à 24 h d'intervalle) ou utilisés en l'état. Les variables mesurées étaient l'activité uréasique et la numération bactérienne. Le second essai a porté sur la cinétique de l'uréolyse, le développement de la population bactérienne et la détermination des souches. Le traitement à l'urée, réalisé à la température de 30 °C, a porté sur les échantillons bruts (0,7 et 7% d'urée par rapport à la MS), stérilisés ou tyndallisés (6,7% d'urée) de la même paille de blé dur. La cinétique de l'uréolyse a été déterminée par la mesure de l'urée résiduelle. La population bactérienne totale a été identifiée par culture sur milieu nutritif complet solidifié, Yeast Extract Malt Peptone Glucose (YMPG) et les souches tolérantes à l'urée ou celles manifestant des propriétés uréasiques par des procédures de repiquages sur milieu liquide spécifique dépourvu d'azote, *Yeast Carbon Base* (YCB) ou avec le même milieu enrichi en urée (YCB + urée). La farine de soja possède des enzymes uréasiques constitutives et des uréases apportées par des micro-organismes, alors que la paille ne possède que des uréases d'origine microbienne. Onze souches bactériennes ont été identifiées sur les pailles initiales, 5 souches étaient présentes après traitement à l'urée, dont 4 possédaient une activité uréasique. Les pailles humidifiées au taux de 33% peuvent être traitées à l'urée sans avoir recours à une source exogène (farine de soja), grâce à la sélection et multiplication d'une flore microbienne uréasique.

**urée / uréases / bactéries / paille / farine de soja**

**Summary** — **Origin of ureases involved in urea treatment of durum wheat straws and characteristics of the associated microbial flora.** In the present study, we attempted to determine whether microorganisms with urease properties present on durum wheat straws were able to multiply after treatment with urea to ensure favorable conditions for complete hydrolysis of urea. In the first experiment, the ureases of microbial or plant origin provided by soya meal and durum wheat straw were identified. After being 33% humidified the samples were sterilized (120 °C for 1 h), tyndallized (90 °C for 1 h, 6 times at 24-h intervals) or used as they were. Urease activity and microbial quantity were

assessed. The kinetics of ureolysis, the development of the bacterial population and the identification of the strain characteristics were studied in the second experiment. The treatment of durum wheat straw was performed at 30 °C with urea: 0.7 and 7% urea vs dry matter for raw material samples, and 6.7% urea vs dry matter for sterilized and tyndallized samples. Urea removal after treatment was assessed by measuring the residual urea. Total bacterial population was identified via a culture on complete media, solidified yeast extract malt peptone glucose (YMPG) and colonies which were  $\text{NH}_3$ -tolerant or had ureolytic properties were identified with specific culture media by serial passaging on specific liquid nitrogen-free media, yeast carbon base (YCB) or with the same media enriched with urea (YCB + urea). The soya meal has constitutive ureasic enzymes and ureases of microbial origin, whereas straw has ureases of microbial origin only. Eleven bacterial colonies were identified in the initial straw but only 5 of them were present after urea treatment and 4 showed urease activity. Because of the selection and the multiplication of microbial flora with urease activity, urea treatment of humidified straws (33% DM) does not need a supply of exogenous urease-containing products such as soya meal.

**urea / urease / bacteria / straw / soya meal**

## INTRODUCTION

L'amélioration de la valeur nutritive de résidus lignocellulosiques, d'origine très variée, par le traitement à l'ammoniac est bien connue. L'urée, grâce à la libération d'ammoniac par hydrolyse pourrait, elle aussi, être utilisée comme agent de traitement. À cet effet, dans de nombreuses études, des uréases d'origine végétale sont ajoutées aux pailles traitées avec l'urée, afin d'accélérer les réactions d'uréolyse (Jayasuriya et Pearce, 1983), de diminuer les quantités d'urée résiduelle (Dias-da-Silva *et al*, 1988), d'augmenter les quantités de matière sèche ingérée (Dias-da-Silva et Sundstol, 1986) et la digestibilité de la matière organique (Solaiman *et al*, 1979; Todorov, 1982; Abdouli et Khorghani, 1987; Kjos *et al*, 1987), de diminuer le taux d'humidité des pailles à traiter (Besle *et al*, 1990; Sahoune, 1990). La farine de soja, connue pour ses propriétés uréasiques, est le produit le plus utilisé.

Ces études ne tiennent pas compte de l'existence possible d'uréases microbiennes à côté des uréases d'origine végétale apportées. Pourtant, Williams *et al*

(1984), Hassoun (1987) ont montré avec des résidus lignocellulosiques humidifiés, que la flore bactérienne présente pouvait être suffisante pour assurer l'uréolyse.

Dans cette étude, nous avons recherché, sur le matériel végétal destiné à subir un traitement à l'urée, s'il existait des micro-organismes à propriétés uréasiques capables de se multiplier, et ainsi d'assurer des conditions favorables à l'uréolyse complète de l'urée. Par ailleurs, au cours d'un tel traitement, il convenait d'essayer de définir quels étaient l'importance et le rôle des uréases d'origine végétale ajoutées pour stimuler l'uréolyse. Dans ce but, deux essais ont été réalisés : 1) l'identification de l'origine des uréases présentes sur le matériel végétal utilisé, par destruction totale des uréases native et microbienne (stérilisation) ou uniquement des micro-organismes (tyndallisation); 2) l'étude de la cinétique de l'uréolyse, du développement et des caractéristiques de la population bactérienne identifiée, par mesure de l'urée résiduelle et observation des cultures bactériennes sur milieux spécifiques (*yeast malt peptone glucose*, *yeast carbone base* et *yeast carbone base + urée*).

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### **Premier essai : identification des activités uréasiques de la farine de soja et de la paille de blé dur**

Le matériel végétal est constitué par de la farine de soja, variété Weber, et une paille de blé dur, variété Arcour, provenant du domaine INRA de Fréjorgues; cette paille est hachée à l'aide d'un broyeur à marteau équipé d'une grille de 5 mm.

Les échantillons d'environ 0,1 g de farine de soja, 1 g de paille de blé, ont été humidifiés au taux de 33% dans des erlenmeyers, protégés de la contamination bactérienne par un bouchon de coton. Ils ont été stérilisés, tyndallisés ou utilisés en l'état.

La stérilisation a été réalisée en autoclave à 120 °C pendant 1h, afin de détruire toute activité microbienne et enzymatique. La tyndallisation qui consiste en des chauffages répétés à des températures inférieures à 100 °C a pour conséquence la destruction progressive des populations bactériennes, sans altération notable de l'activité uréasique (Zelter et Delort-Laval, 1971). Au-delà de cette température, l'activité décroît rapidement et n'est plus que de 2% à 110-120 °C. Dans cet essai, les traitements de tyndallisation ont été effectués à l'étuve à 90 °C pendant 1 h et renouvelés 6 fois à 24 h d'intervalle.

La mesure de l'activité uréasique a été effectuée en utilisant la méthode NFV03-921. C'est par définition, la quantité d'azote ammoniacal libérée en 30 min à 30 °C et exprimée en mg / g de MS de produit. Mais afin d'augmenter la sensibilité de la mesure, l'ammoniac et l'urée ont été dosés par la méthode enzymatique Boehringer Mannheim n° 542-946, qui permet le dosage de l'urée et de l'ammoniac présents dans le même milieu.

La population bactérienne totale a été identifiée à partir de cultures sur milieu nutritif complet YMPG, coulé dans des boîtes de Pétri maintenues 48 h à 30 °C dans une étuve ventilée. La détermination de la population uréasique est effectuée à partir de repiquage de colonies du milieu solide YMPG sur milieu liquide YMPG, puis sur les milieux spécifiques YCB de Wickerham enrichis ou non en urée comme seule source d'azote. La numération implique

des techniques de dilution en série logarithmique dont les termes sont en progression géométrique de raison  $10^{-1}$ . Le nombre de répétitions a été de 2, avec 3 dosages par répétition.

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

### **Deuxième essai : étude de la cinétique d'uréolyse, du développement et des caractéristiques de la population bactérienne**

La même paille de blé dur a été utilisée. Chaque échantillon, d'un poids moyen de 70 g, a été placé dans un bocal de verre d'une capacité de 2 litres, fermé hermétiquement. L'étanchéité est assurée par un joint en téflon résistant à l'ammoniac. Les paramètres de traitement sont résumés dans le tableau I.

Les échantillons sont humidifiés avant de subir les opérations de stérilisation et de tyndallisation, et ajustés au taux de 33% lors du traitement à l'urée en condition stérile.

Nous avons mesuré sur tous les échantillons l'urée résiduelle, la population bactérienne totale et identifié les souches tolérantes à l'urée et celles manifestant des propriétés uréasiques.

Les méthodes d'analyse sont celles décrites dans l'essai n°1.

## RÉSULTATS

### **Premier essai**

Avec les produits bruts, les résultats enregistrés (tableau II) montrent une activité uréasique importante pour la farine de soja, et négligeable pour la paille de blé. Après un délai de 48 h, cette activité uréasique est augmentée de façon significative ( $P < 5\%$ ) pour les deux produits. La popu-

**Tableau I.** Paramètres expérimentaux de l'essai n° 2.

<i>Paramètres de traitement</i>	<i>Paille de blé brute</i>	<i>Paille de blé tyndallisée</i>	<i>Paille de blé stérilisée</i>
Humidité	33	33	33
Température	30 °C	30 °C	30 °C
Doses d'urée (% MS)	0,7 et 7	6,7	6,7
Durée de traitement	30 min, 3, 7, 30 j	3 et 7 j	3 et 7 j
Nombre de répétitions	2	2	2
Nombre de dosages par répétition	6	6	6

lation bactérienne totale est environ 700 fois plus abondante dans le lot paille. Après un délai de 48 h, cette population a été multipliée par un facteur 10 pour la paille et 10 000 pour la farine de soja.

La stérilisation détruit toute activité uréasique et toute la population bacté-

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

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

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

\* Valeur significative au seuil de 5%.

**Deuxième essai**

Avec la paille brute (tableau III), traitée à la dose de 7% d'urée, l'hydrolyse est rapide puisqu'elle atteint 20% après 30 min, 45% après 3 j, 94% après 7 j et qu'elle est totale après un mois de traitement. Avec les pailles tyndallisées ou stérilisées, l'uréolyse est limitée et relativement constante tout au long du traitement. Elle est comprise entre 4 et 13%, avec une variabilité importante des résultats, malgré l'augmentation du nombre de répétitions.

Les populations bactériennes totales identifiées (tableau III) sur les pailles brutes ou après traitement diffèrent de manière importante. Les échantillons tyndallisés et stérilisés révèlent rarement des traces de bactéries. Dans les échantillons

bruts traités aux doses de 0,7 et 7%, 2 types de population bactérienne sont décelés; elles diffèrent par leur évolution en nombre au cours du traitement (fig 1). En effet, dans un laps de temps de 30 min, la population bactérienne décroît dans les 2 cas, mais de manière plus importante pour les échantillons traités à 7%. Par la suite, pour les échantillons traités à la dose de 0,7%, la population bactérienne croît de manière continue et atteint un palier après un délai de 7 j. On dénombre  $5,8 \cdot 10^9$  bactéries/g MS et la présence de mycélium. En revanche, pour les échantillons traités à la dose de 7%, après 3 j de phase croissante jusqu'à  $1,6 \cdot 10^8$  bactéries/MS, le nombre de bactéries régresse pour atteindre après 30 j de traitement, des valeurs voisines de  $8 \cdot 10^4$  bactéries/g MS.

**Tableau III.** Cinétique d'uréolyse et évolution de la population microbienne de la paille de blé brute, tyndallisée ou stérilisée. Humidité de la paille : 33%.

<i>Nature du support</i>	<i>Dose durée et nb observations</i>	<i>Durée de traitement</i>	<i>Urée résiduelle (mg d'urée/g MS)</i>	<i>Population bactérienne x 10<sup>6</sup>/g MS (6 observations)</i>
Paille brute	0,7% MS n = 12	30 min	5,25 ± 0,40	15,01 ± 0,55
		3 j	0,20 ± 0,03	2420 ± 265
		7 j	0	5550 ± 550
		30 j	0	5835 ± 590
	7% MS n = 12	30 min	53,26 ± 1,45	9,06 ± 0,78
		3 j	37,02 ± 1,09	161 ± 35
		7 j	4,36 ± 0,27	38,45 ± 2,80
		30 j	0	0,08
Paille tyndallisée	6,7% MS n = 20	30 min	64,61 ± 8,96	0
		3 j	65,44 ± 10,19	0
		7 j	61,51 ± 3,02	Traces
		30 j	58,12 ± 3,02	0
Paille stérilisée	6,7% MS n = 12	3 j	59,63 ± 2,73	0
		7 j	57,76 ± 3,02	0

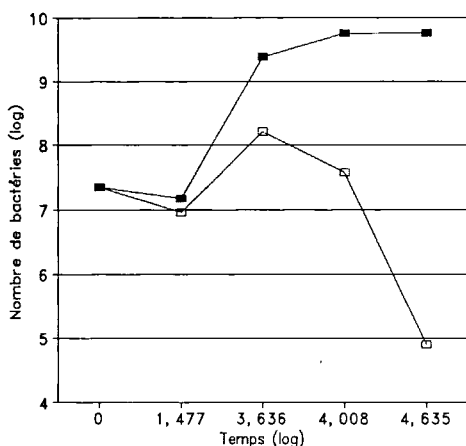


Fig 1. Évolution de la population bactérienne de la paille traitée à l'urée aux doses de 0,7% et 6,7%. Échelle Log.log. —■— Traitée à 0,7%; —□— traitée à 6,7%. En abscisse, 1,477; 3,636; 4,008; 4,635 correspondent à des durées de 30 min; 3 j; 7 j; 30 j; en ordonnée, les valeurs extrêmes sont de  $8 \times 10^4$  et  $5,8 \times 10^9$ .

L'utilisation d'un milieu de culture non spécifique YMPG solidifié a permis d'identifier 11 colonies sur la paille avant traitement, classées de 1 à 11 en fonction de critères de couleur, de forme, de taille et de bordure (tableau IV). Aucune de ces bactéries n'est capable de se développer sur milieu sans azote YCB. Cinq souches (1, 3, 4, 5, 6) présentes sur la paille brute sont retrouvées sur les pailles traitées à 7% d'urée aux temps de 30 min, 3 et 7 j (tableau V). Elles sont donc tolérantes à la présence d'ammoniac. Cultivées sur milieu YCB + urée, les souches 1, 3, 4 et 6 expriment une activité uréasique. La souche 5, tolérante à l'ammoniac, ne possède pas d'uréase. Elle s'est développée sur les pailles traitées à faible taux d'urée et représentait 35, 50 et 95% des colonies après respectivement 3, 7 et 30 j de traitement. Les souches n° 7, 8, 10 et 11 présentent une activité uréasique, mais sont sensibles à l'ammoniac.

## DISCUSSION

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

Au cours de cette mesure, la population microbienne n'a subi aucune pression de sélection par l'urée, absente du milieu.

Les opérations de stérilisation et tyndallisation montrent que l'uréolyse implique des uréases d'origine végétale et bactérienne. En effet, la tyndallisation, méthode plus sélective que la stérilisation, a respecté partiellement les uréases constitutives de la farine de soja. La baisse du niveau d'activité est conforme aux résultats publiés par Zelter et Delort-Laval (1971). En revanche, nous ne retrouvons pas ceux présentés par Abu-Salem *et al* (1975), qui suggèrent la destruction de 93% de l'activité uréasique après un traitement à 75 °C maintenu pendant 45 min. La faible activité uréasique de la paille ne permet pas d'interpréter les résultats. Toutefois, l'augmentation simultanée entre 0 et 48 h de la population microbienne et de l'activité uréasique observée avec les échantillons bruts suggère une relation fonctionnelle entre elles. Cette observation est en accord avec les résultats de Williams *et al* (1984), et Hassoun *et al* (1990).

L'hydrolyse de l'urée a été un phénomène rapide puisque 94% de l'apport avait disparu après 7 j de traitement. Ce résultat est en accord avec ceux de Todorov (1982) et Tetlow (1983) avec les pailles. Henning *et al* (1990), Chermiti *et al* (1989),

Sahnoune (1990) n'obtiennent pas une hydrolyse totale après un délai de 30 j, malgré un taux d'humidité équivalent à celui de cette étude. Ces résultats contradictoires ont été soulignés par Dias-da-Silva et Guedes (1990) au cours d'une étude de 24 types de pailles traitées à l'urée dans des conditions identiques. Ils soulignent une hydrolyse de l'urée supérieure à 95% dans 18 échantillons; dans les 6 autres

cas, 5 à 10% de l'apport n'a pas été hydrolysé.

L'hydrolyse résiduelle constatée avec les échantillons tyndallisés ou stérilisés pourrait provenir des uréases non détruites par ces traitements. En effet, selon Zelter et Delort-Laval (1971) même après un traitement thermique à 120 °C (précuisson 0 à 55 min, cuisson 55 à 95 min), il existe encore une activité résiduelle.

**Tableau IV.** Description des colonies de bactéries rencontrées sur la paille de blé non traitée.

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

**Tableau V.** Intensité de croissance des bactéries identifiées sur la paille traitée à 7% d'urée sur milieu liquide complet (YMPG) et sur milieu liquide spécifique complétement en urée (YCB + urée).

<i>Numéro d'identification des colonies présentes sur paille traitée à 7% *</i>	<i>Intensité de croissance</i>	
	<i>Milieu liquide complet YMPG</i>	<i>Milieu liquide spécifique YCB + urée</i>
1	+++	++
3	+++	++
4	+++	++
5	++	-
6	+++	+

Intensité de croissance : +++ très bonne; ++ bonne; + moyenne; - nulle. \* Voir tableau IV.

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

L'évolution de la population bactérienne totale, au cours du traitement à la dose de 7% est en accord avec les études réalisées en milieu non renouvelé de Monod (1942), Larpent et Larpent-Gouraud (1975). Hassoun (1987) et Williams *et al* (1984) ont bien montré que l'uréolyse est sous la dépendance des bactéries uréolytiques, mais ils n'ont pas caractérisé ces populations comme nous avons pu le faire dans cet essai.

## CONCLUSION

Cette étude montre bien que l'urée, agent de traitement des pailles, est hydrolysée dans la paille traitée essentiellement grâce à des uréases d'origine microbienne. La possibilité d'intervention d'uréases végétales n'a pas été prouvée avec ce substrat. En revanche, dans la farine de soja, il est incontestable que l'uréolyse est liée à l'action combinée des uréases végétales et microbiennes, avec une prédominance des premières.

Les pailles humidifiées au taux de 33% et traitées à la dose de 7% d'urée présentent après un délai de 30 j à 30 °C une uréolyse totale et une bonne conservation du produit. Cette dose d'urée provoque la sélection d'une population tolérante à l'ammoniac et possédant des enzymes uréolytiques. Il est donc inutile, dans ces condi-

tions d'humidité (33%) et de température (30°C) élevées, d'avoir recours à une source exogène d'uréases.

Des paramètres favorables au développement d'une flore bactérienne sont nécessaires au bon déroulement de l'uréolyse et doivent encore être précisés.

## RÉFÉRENCES

- Abdoul H, Khorghani T (1987) Traitement des pailles à l'urée. I. Conditions d'utilisation de l'urée, source d'ammoniac dans le traitement de la paille. *Fourrages* 110, 205-218
- Abu-Salem F, Hussein L, Foda Y (1975) Effect of some variables on the extractability of proteins, urease activity, free alpha-amino groups and soluble carbohydrates from soybean meals. *Qual Plant Plant Foods Hum Nutr* 24, 247-256
- Besle JM, Chenost M, Tisserand JL, Lemoine JP, Faurie F, Saleh H, Grenet N (1990) Ammoniation of straw by urea: extent of ureolysis and improvement of nutritive value with moderate water addition. *Reprod Nutr Dév*, suppl 2, 174s
- Chermiti A, Nefzaoui A, Cordesse R (1989) Paramètres d'uréolyse et digestibilité de la paille traitée à l'urée. *Ann Zootech* 38, 63-72
- Dias-da-Silva AA, Sundstol F (1986) Urea as a source of ammonia for improving the nutritive value of wheat straw. *Anim Feed Sci Technol* 14, 67-79
- Dias-da-Silva AA, Mascarenhas Ferreira A, Guedes CVM (1988) Effects of moisture level, treatment time and soya bean addition on the nutritive value of urea-treated maize stover. *Anim Feed Sci Technol* 19, 67-77
- Dias-da-Silva AA, Guedes CVM (1990) Variability in the nutritive value of straw cultivars of wheat, rye and triticale and response to urea treatment. *Anim Feed Sci Technol* 28, 79-89
- Hassoun P (1987) Amélioration de la valeur nutritive de la bagasse de canne à sucre par un traitement à l'ammoniac (généré par hydrolyse de l'urée) et son utilisation par les ruminants. Rôles des micro-organismes sur l'uréolyse. Thèse USTL, Montpellier II, 225 p



- Hassoun P, Geoffroy F, Saminadin G, Prior P, Beramis M (1990) Studies on the ammoniation of sugar-cane bagasse by urea. Effects of moisture, urea levels, urease source and treatment periods on compostion, *in vitro* dry matter digestibility and evolution of ureolytic bacteria. *Anim Feed Sci Technol* 29, 113-129
- Henning JC, Dougherty CT, O'Leary J, Collins M (1990) Urea for preservation of moist hay. *Anim Feed Sci Technol* 31, 193-204
- Jayasuriya MCN, Pearce GR (1983) The effect of urease enzyme on treatment time and the nutritive value of straw treated with ammonia as urea. *Anim Feed Sci Technol* 8, 271-281
- Kjos NP, Sundstol F, Mc Burney MI (1987) The nutritive value of weather damaged and good quality straw of barley, wheat and oat, untreated and treated with ammoniac or sodium hydroxide. *Adv Anim Physiol Anim Nutr* 57, 1-15
- Knapp WR, Holt DA, Lechtenberg VL (1974) Anhydrous ammonia and propionic acid as hay preservatives. *Agron J* 66, 823
- Knapp WR, Holt DA, Lechtenberg VL (1975) Hay preservation and quality improvement by anhydrous ammonia treatment. *Agron J* 67, 766-769
- Larpen JP, Larpen-Gourgaud M (1975) Mémento technique de microbiologie : la cellule bactérienne-métabolisme systématique, bactéries utiles, milieux de cultures et réactifs. Tech Doc, Paris, 269 p
- Monod J (1942) *Recherches sur la croissance des cultures bactériennes*, 2<sup>e</sup> ed. Hermann, Paris, 210 p
- Sahnoune S (1990) Le traitement des pailles à l'ammoniac produit par hydrolyse de l'urée : étude biochimique de l'uréolyse. Techniques d'application. Fermentation des pailles en milieu ruminal. Thèse UER sciences Clermont II, 104 p
- Solaiman SG, Horn GW, Owens FN (1979) Ammonium hydroxide treatment on wheat straw. *J Anim Sci* 49, 802-808
- Tetlow RM (1983) The effect of urea on the preservation and digestibility *in vitro* of perennial ryegrass. *Anim Feed Sci Technol* 10, 49-63
- Todorov NA (1982) Ensiling waste roughage with urea to increase energy and protein value. *Nutr Abstr Rev Série B*, 53, N°9
- Williams PEV, Innes GM, Brewer A (1984) Ammonia treatment of straw via the hydrolysis of urea. II. Additions of soya bean (urease), sodium hydroxide and molasses: effects on the digestibility of urea-treated straw. *Anim Feed Sci Technol* 11, 115-124
- Zelter SZ, Delort-Laval J (1971) Traitement thermique et qualité des protéines du soja. II. Préparation des tourteaux en atelier expérimental et estimation de leur degré de cuisson au moyen de tests biochimiques. *Ann Zootech* 20, 17-29