ENSILAGES « GNOTOXÉNIQUES »⁽¹⁾ DE FOURRAGES

II. — CATABOLISME DES GLUCIDES ET MÉTABOLISME FERMENTAIRE
DANS DES ENSILAGES « GNOTOXÉNIQUES » DE LUZERNE, FÊTUQUE
ET RAY-GRASS

J. BOUSSET, Nathalie BOUSSET-FATIANOFF,
Ph. GOUET, et M. CONTREPOIS

avec la collaboration technique de Annie BARDE
Nadine MOUHOU-SRIOU et Marie-France DORBE

Laboratoire de Microbiologie,
Centre de Recherches de Clermont-Ferrand, I. N. R. A.
63 - Saint-Genès-Champagnelle

RÉSUMÉ

Pour dissocier les rôles respectifs des enzymes végétales et bactériennes dans la conservation des fourrages par ensilage, nous avons recouru à la stérilisation des fourrages par irradiation gamma (2 Mrad) suivie d'une inoculation de ces fourrages par différentes souches isolées d'ensilages « holoxéniques » : *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, « branching » *Lactobacillus*, *Streptococcus faecalis*, *Pediococcus* sp. *Enterobacter* sp., *Clostridium tyrobutyricum* et *Clostridium* protéolytique. On a pu montrer que le rôle des bactéries hétérofermentaires (*Lactobacillus brevis*), de la microflore Gram négative (*Enterobacter* sp.) ou anaérobie sporulée (*C. tyrobutyricum* et *C. butyricum*) dans les pertes de matière sèche sous forme gazeuse est nettement plus important que celui de la respiration du végétal. Les fructosanes des graminées sont hydrolysés par les enzymes végétales dont le pH optimum d'action doit être voisin de la neutralité. L'utilisation des glucides solubles n'est jamais totale et son intensité dépend de la souche bactérienne inoculée. L'utilisation maximum est atteinte par *Enterobacter* sp. et *L. brevis* alors que *L. plantarum* (homofermentaire) est limité dans son développement par l'acide lactique qu'il produit. Le « branching » *Lactobacillus* et *Pediococcus* sp. apparaissent très intéressants car ils entraînent un abaissement du pH voisin de celui de *L. plantarum* pour une consommation plus faible de glucides solubles. Les glucides des membranes semblent dégradés à la fois par les enzymes végétales et les enzymes bactériennes mais l'hydrolyse est toujours limitée. La composition centésimale des glucides des pailles est peu affectée.

Dans les témoins « holoxéniques » on assiste à une très forte augmentation du pouvoir tampon qui limite l'abaissement du pH et permet en fin de conservation le développement des *Clostridium* entraînant une forte production d'acide butyrique. Dans les ensilages inoculés avec des souches pures (mono- ou « polygnotoxéniques ») le pH est toujours le plus faible dans le Ray-Grass et le plus élevé dans la Fétuque ; il ne semble pas étroitement lié à la quantité d'acide lactique produit.

Le méthanol et surtout l'éthanol sont toujours présents dans les ensilages et peuvent atteindre des valeurs élevées (2,4 p. 100 sec dans les témoins « holoxéniques ») ; parmi les souches étudiées *L. brevis* et *Enterobacter* sp. sont les deux principaux responsables de leur production.

(1) La terminologie employée dans ce texte est celle proposée par RAIBAUD *et al.* (1966).

La solubilisation importante de l'azote est essentiellement due aux protéases végétales : la glycolyse dépend des actions enzymatiques conjuguées du végétal et des bactéries.

On établit pour chaque souche dans les trois fourrages les bilans de transformation du carbone des glucides solubles en carbone des métabolites fermentaires (acide lactique, acides gras volatils, alcools). Le rapport des poids de carbone est nettement supérieur à l'unité pour l'ensemble des métabolites et même pour l'acide lactique seul dans le cas de *L. plantarum*, *Str. faecalis*, *Pdiococcus* sp. Les glucides solubles ne constituent donc pas l'unique source de carbone des bactéries.

INTRODUCTION

Les recherches ayant pour but de dissocier les actions enzymatiques végétales des actions enzymatiques bactériennes qui se manifestent au cours de la conservation des fourrages par ensilage ont montré le rôle essentiel des protéases végétales dans la solubilisation de l'azote protéique (MABITT, 1951 ; GOUET, FATIANOFF, 1964 ; GOUET, FATIANOFF et BOUSSET, 1970). Par contre, aucune étude n'a été entreprise pour confirmer *in situ* les résultats obtenus *in vitro* par DEWAR, Mc DONALD et WHITTENBURY (1963) révélant une action des hémicellulases végétales aboutissant à une libération de pentoses ; on remarque pourtant fréquemment que la concentration en acides lactique et acétique des ensilages est supérieure à celle que devrait permettre la seule fermentation de la totalité des glucides solubles de la plante verte. Ce phénomène est encore plus accusé si l'on tient compte de ce qu'une partie des glucides est perdue sous forme de gaz carbonique. Il est donc probable que la microflore dispose dans l'ensilage d'une source énergétique autre que celle provenant des glucides solubles initialement présents dans la plante.

Cette étude se propose d'analyser, dans des ensilages « axéniques » et « gnotoxéniques », le rôle des enzymes végétales et de quelques espèces bactériennes vis-à-vis du catabolisme des fractions glucidiques, le taux de transformation de ces glucides en acides et en alcools ainsi que les pertes de gaz qui en résultent.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel

Une luzerne (variété *Flamande*), une Fétuque des prés et un Ray Grass d'Italie (variété *Rina*) de première coupe sont ensilés dans des bocaux de 0,7 l (400 g). Pour chaque fourrage, un bocal sert de témoin « holoxénique » et le contenu des autres est stérilisé par irradiation gamma (2 Mrad) sitôt après remplissage. A l'exception des témoins « axéniques », on inocule dans chacun des bocaux stérilisés, soit une souche pure (ensilages « monoxéniques ») soit un mélange de ces souches (ensilages « polygnotoxéniques »). La préparation des ensilages, le choix des souches bactériennes, et les méthodes de dénombrement sont décrits par GOUET *et al.* (1971). Les bocaux sont ouverts après 100 jours de conservation à 22°C et leur contenu échantillonné en vue des analyses.

Dans le but de déterminer les effets possibles de l'irradiation sur les constituants glucidiques, des échantillons de chaque fourrage sont soumis à trois doses d'irradiation : 1, 2 et 3 Mrad, puis congelés (— 20°C) et lyophilisés.

A l'exception des fractions glucidiques, dosées sur les fourrages lyophilisés et broyés, toutes les analyses sont effectuées sur le produit frais (conservé à — 20°C).

Techniques analytiques

— Matière sèche (MS) : dessiccation à 70°C et correction pour les pertes de composés volatils (FATIANOFF et GOUET, 1969).

Les mesures du pH et du pouvoir tampon, les dosages d'acides gras volatils et d'alcools sont faits à partir d'une macération aqueuse au 1/10 du fourrage frais. Cette macération est placée une nuit au réfrigérateur à 4°C et filtrée.

— pH : mesuré au pH-mètre.

— Pouvoir tampon : deux courbes de titration sont réalisées à l'aide d'un appareil automatique, l'une avec de la soude 0,05 N et l'autre avec de l'acide lactique 0,01 N. Le pouvoir tampon est calculé à partir de ces courbes en sommant le nombre de milliéquivalents d'acide et de base utilisés pour amener le pH de sa valeur initiale à 4 et à 6.

— Acide lactique : selon la méthode de BARNETT (1954).

— Acides gras volatils : purification de l'extrait par double distillation de FRIEDMANN (1938) puis dosage par chromatographie gaz-liquide selon la méthode de James et Martin modifiée par ZELTER et LEROY (1958).

— Alcools : distillation à l'aide d'un appareil microkjeldahl de l'extrait alcalinisé par de la soude pour bloquer les acides gras volatils, puis dosage par chromatographie en phase gazeuse. La colonne en acier inoxydable de 1 m de long et 3 mm de diamètre intérieur est remplie avec du Porapak T 80-100 mesh imprégné avec 5 p. 100 de FFAP. Le gaz porteur est de l'azote U. La chromatographie est réalisée en isotherme à 140°C. La détection se fait par ionisation de flamme.

— Azote non protéique : azote non précipitable par l'acide trichloracétique à 5 p. 100 en concentration finale, dosé par microkjeldhal.

— Azote ammoniacal : selon la méthode de CONWAY (1956).

— Glucides solubles totaux : extraits par épuisement par l'eau froide du fourrage homogénéisé à l'aide d'un Turmix et dosés selon les méthodes de SOMOGYI (1952) et NELSON (1944).

— Fractions glucidiques :

— les glucides alcoolosolubles et hydrosolubles sont extraits successivement par l'alcool à 95 p. 100 à ébullition, puis par l'eau à 40°C et dosés après hydrolyse (SO_4H_2 0,02 N) selon la méthode de HAGEDORN et JENSEN (1923) ;

— les glucides des parois sont isolés par extraction des produits solubles par le lauryl sulfate de sodium, pH 7, puis fractionnés en hémicelluloses, cellulose et lignine (JARRIGE, 1961). Les acides uroniques des parois sont dosés par acidimétrie (GAILLARD, 1966) ;

— les oses des différentes fractions sont déterminés par chromatographie en phase gazeuse (BOUSSET, 1970).

— Pertes de matière sèche sous forme de gaz : déterminées par pesée des bocaux lors de leur remplissage et après 100 jours de conservation.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Dénombrement bactérien

Les espèces inoculées se sont toutes multipliées dans les ensilages à l'exception du *Clostridium* protéolytique, de sorte que les résultats obtenus pour cette espèce sont à rapprocher de ceux du témoin « axénique » (GOUET *et al.*, 1971).

Modification de la fraction glucidique soluble au cours de la stérilisation des fourrages (fig. 1)

Des différences parfois importantes ont été observées dans la teneur et (ou) la composition en glucides solubles des fourrages avant et après stérilisation à 2 Mrad ; nous avons voulu contrôler l'apparition de ces écarts en utilisant trois doses d'irradiation pour chaque fourrage. Nous préciserons que dans le premier cas (2 Mrad),

les analyses ont été effectuées à partir du contenu de bocaux de 0,7 l et que dans le second, un seul bocal par fourrage a été soumis à un sous-échantillonnage puis irradié aux doses de 1, 2 et 3 Mrad. Les résultats montrent une légère diminution des glucides alcool-et hydrosolubles (fig. 1), principalement pour la Luzerne et la Fétuque, y compris entre les deux échantillons (IS et 2) soumis à la même dose de 2 Mrad. Ces écarts doivent être probablement attribués aux erreurs d'échantillonnage liées à l'hétérogénéité des fourrages, en particulier de la Luzerne. En effet, les résultats obtenus pour chacun des fourrages soumis à trois doses d'irradiation après sous-échantillonnage sont beaucoup plus homogènes ; cependant, la fidélité relative des méthodes d'analyse utilisées est certainement aussi en cause.

FIG. 1. — Concentrations en glucides alcoolosolubles et hydrosolubles dans les fourrages irradiés à 1, 2 et 3 Mrad (en p. 100 de la MS corrigée)

I : Fourrage initial ; IS : fourrage initial stérilisé à 2 Mrad ; 1, 2, 3 : fourrage stérilisé à 1, 2 ou 3 Mrad.
 ——— glucides alcoolosolubles
 - - - - - glucides hydrosolubles

Dans l'ensemble on observe que les remaniements pendant l'irradiation se produisent en deçà de la dose de 1 Mrad, et ne s'accroissent pas entre 1 et 3 Mrad. Ils sont d'ailleurs négligeables dans le cas de la Luzerne irradiée à 2 Mrad où l'on peut noter seulement une tendance à l'augmentation de sa très faible concentration en glucides hydrosolubles. La diminution de la fraction hydrosoluble est presque totalement compensée par l'augmentation de la fraction alcoolosoluble dans le cas du Ray-Grass ; elle l'est en partie seulement pour la Fétuque et ceci entraîne une réduction notable de la concentration en glucides solubles totaux.

Il n'est cependant pas possible, au vu de ces résultats, d'affirmer qu'il s'agit bien d'un effet propre de l'irradiation gamma. Ce traitement nécessite un séjour de 1 h 30 par Mrad dans l'irradiateur et entraîne un réchauffement du fourrage. Dans ces conditions on ne peut donc pas exclure l'existence d'une activité enzymatique végétale.

Évolution des fractions alcoolosoluble et hydrosoluble des fourrages

La fraction glucidique hydrosoluble des graminées est constituée de fructosanes. Ceux-ci sont hydrolysés par les enzymes végétales puisqu'ils disparaissent en quasi-totalité dans les témoins « axéniques » et aussi dans les ensilages inoculés avec *Str. faecalis* dont les pH sont élevés (tabl. 1). Par contre, lorsque le pH baisse par suite de l'acidification lactique, l'activité des enzymes est d'autant plus limitée que l'acidification est rapide et importante. Ainsi, des glucides hydrosolubles restent dans la Fétuque inoculée avec *L. plantarum* (3,20 p. 100 de la MS — pH 4,3) et le Ray-Grass inoculé avec *L. brevis* (2,61 p. 100 de la MS — pH 4,5) et *L. plantarum* (4,41 p. 100 de la MS — pH 4,1). Lorsque les glucides solubles sont peu ou pas métabolisés (témoin « axénique » et *Str. faecalis*) cette hydrolyse contribue à l'accroissement de la fraction alcoolosoluble, dont la concentration devient sensiblement égale à celle des glucides solubles totaux du fourrage vert. Mais nous avons déjà observé (BOUSSER, 1967) que la présence de pentoses modifie alors sa composition.

Les concentrations en glucides solubles totaux présents dans les fourrages initiaux, sont assez élevées pour la Luzerne (8,46 p. 100 de la MS) et la Fétuque (14,42 p. 100 de la M.S.) et très importantes dans le Ray-Grass (25,79 p. 100 de la MS) (tabl. 1). Dans la Luzerne leur taux augmente lors de l'irradiation (+ 16 p. 100) et durant la conservation de l'ensilage « axénique » (+ 42 p. 100) ; dans la Fétuque et le Ray Grass il diminue lors de l'irradiation (respectivement — 20 p. 100 et — 8 p. 100), puis augmente pendant la conservation du fourrage « axénique » (respectivement + 4,37 p. 100 et + 6 p. 100).

L'utilisation des glucides solubles initiaux ou apparus n'est jamais totale (tabl. 1). Dans les témoins « holoxéniques » elle atteint au maximum 77 p. 100 (Luzerne), et, bien que les concentrations en glucides au début soient importantes pour les trois fourrages, les ensilages de Luzerne et de Fétuque ne se sont pas stabilisés (pH respectifs : 6,3 et 6,1). Dans le Ray-Grass, où les glucides solubles utilisés atteignent 16,26 p. 100 de la MS, l'abaissement du pH (4,8) est notable mais encore insuffisant pour inhiber le développement des *Clostridium* (acide butyrique : 3,49 p. 100 de la MS).

La fermentation des glucides solubles par les différentes souches est très variable. *L. plantarum*, espèce homofermentaire, les utilise jusqu'au pH très bas de 3,8 dans le Ray-Grass, alors qu'il semble être limité plus rapidement (pH 4,1) dans la Luzerne. Dans la Fétuque, son activité paraît plus complexe : utilisation de 49 p. 100 des glucides solubles initiaux pour un pH de 4,3 et production non négligeable d'acide acétique (1,21 p. 100 de la MS). Ce dernier fait n'est pas classique pour un homofermentaire mais a déjà été noté par HUHTANEN et PENSACK (1963). *L. brevis* et *Enterobacter* sp. sont les souches qui utilisent le plus de glucides ; l'action d'*Enterobacter* sp. semble limitée par d'autres facteurs que le pH car pour des pH finaux très voisins, la quantité de glucides utilisée est d'autant plus faible que celle du fourrage initial est élevée. Les comportements de « branching » *Lactobacillus* et *Pediococcus* sp. sont voisins et leur efficacité fermentaire semble indépendante de la nature du fourrage : 8 à 9 p. 100 de la M.S. des glucides utilisés pour les trois espèces. Néanmoins, il apparaît que leur activité fermentaire se trouve limitée dans la Fétuque puisqu'il subsiste des quantités relativement importantes de glucides alors que le pH de ce

TABLEAU I
Concentrations et variations des glucides dans les fourrages verts et leurs ensilages
(g p. 100 de la matière sèche corrigée)

	Luzerne				Fétuque				Ray-Grass			
	Glucides % MS		Variations glucides totaux		Glucides % MS		Variations glucides totaux		Glucides % MS		Variations glucides totaux	
	alcool soluble	hydro-soluble	points	%	alcool soluble	hydro-soluble	points	%	alcool soluble	hydro-soluble	points	%
Fourrage initial	7,49	0,97	8,46*		6,84	7,58	14,42		10,88	14,91	25,79	
Fourrage initial stérilisé	8,71	1,09	9,80	+ 1,34 + 16**	7,41	4,17	11,58	— 2,84 — 20**	12,70	11,01	23,71	— 2,08 — 8**
Ensilages												
« Axéniques » (témoin) ..	10,72	1,33	12,05	+ 3,59 + 42**	12,73	1,06	13,79	— 0,63 — 4,37**	22,36	1,51	23,87	— 1,92 — 7**
« Holoxéniques » (témoin)	1,59	0,34	1,93	— 6,53 — 77**	3,75	0,49	4,24	— 10,18 — 71**	8,58	0,95	9,53	— 16,26 — 63**
« Polynotoxéniques » ⁽¹⁾			0,59*	— 11,46 — 95			2,06*	— 11,73 — 85			—	—
« monoxéniques » inoculés avec :												
<i>L. plantarum</i>	2,59	0,81	3,40	— 8,65 — 72	4,05	3,02	7,07	— 6,72 — 49	10,86	4,41	15,27	— 8,60 — 36
<i>L. brevis</i>	1,60	0,30	1,90	— 10,15 — 84	1,33	0,50	1,83	— 11,96 — 87	3,76	2,61	6,37	— 17,50 — 73
<i>Str. faecalis</i>	7,47	0,58	8,04	— 4,01 — 33	9,13	0,72	9,85	— 3,94 — 29	20,91	1,53	22,44	— 1,43 — 6
« branching » <i>L.</i>			4,17*	— 7,88 — 65			4,16*	— 9,63 — 70			13,92*	— 9,95 — 42
<i>Pediococcus</i> sp.			4,05*	— 8,00 — 66			6,43*	— 7,37 — 53			14,93*	— 8,88 — 37
<i>Enterobacter</i> sp.			1,87	— 10,18 — 84			4,70	— 9,09 — 66			9,08	— 14,79 — 62
<i>C. proteolytique</i>			13,93*	+ 1,88 + 16			14,35*	+ 0,56 + 4			23,88*	+ 0,01 < 1
<i>C. butyricum</i>			11,87*	— 0,68 — 6			10,50*	— 3,29 — 24			14,87*	— 9 — 38
<i>C. tyrobutyricum</i>			9,76	— 2,29 — 19			10,08	— 3,71 — 27			23,44	— 0,43 — 2

⁽¹⁾ Inoculés avec toutes les souches des ensilages « monoxéniques ».

* Valeurs déterminées sur l'extrait « azote soluble ».

** p. 100 de variation calculé par rapport au fourrage initial — les pourcentages de variation des fourrages inoculés sont calculés par rapport au témoin « axénique ».

fourrage n'est abaissé qu'à 4,4 (contre 4,2 et 3,8 respectivement pour la Luzerne et le Ray-Grass). *Str. faecalis* ne métabolise que très peu de glucides et il ne semble pas que cette souche puisse abaisser le pH au-dessous de 4,6. *C. tyrobutyricum* se développe en produisant des quantités élevées d'acide butyrique directement à partir des glucides solubles et peut donc s'implanter en l'absence d'acide lactique dans les milieux peu acides où il subsiste des glucides solubles. La souche de *C. butyricum* employée catabolise 3,29 p. 100 de la matière sèche des glucides dans la Fétuque en ne produisant qu'une trace d'acide butyrique et de faibles quantités d'acétone et de butanol, tandis que dans le Ray Grass l'utilisation des glucides atteint 9 p. 100 de la MS avec production d'acide lactique (1,17 p. 100 de la MS).

Chromatographie des glucides solubles

Les chromatogrammes des fractions solubles, bien que difficilement interprétables du fait de nombreuses interférences, montrent que le glucose et le fructose sont les deux oses majeurs des fractions alcoolosolubles des fourrages initiaux. Après hydrolyse la fraction hydrosoluble des graminées est essentiellement constituée de fructose (90 p. 100).

Après irradiation, il apparaît deux pics nouveaux dans la fraction soluble de la luzerne. Le premier, situé avant le fructose représente un produit métabolisé par les différentes souches bactériennes, alors que le second, placé immédiatement après le fructose, représente par contre un produit non métabolisé. Ces deux pics avaient déjà été constatés dans une expérience similaire rapportée par BOUSSET, FATIANOFF, GOVER (1970).

En plus du glucose et du fructose on constate après conservation la présence de mannose, galactose, arabinose et xylose, qui ont leur origine dans les « polyholosides non cellulosiques » ; la concentration de ces quatre glucides ne dépasse pas 5 p. 100 de l'ensemble des glucides solubles.

L'étude cinétique n'ayant pas été effectuée il n'est pas possible d'établir une hiérarchie dans l'utilisation des oses qui semblent disparaître simultanément.

Dans les graminées le fructose est moins dégradé que les autres oses car il se trouve dans la plante en partie sous forme de fructosanes qui doivent être d'abord hydrolysés.

Polyholosides non cellulosiques (« hémicelluloses »)

Les acides uroniques (tabl. 2), engagés dans les hémicelluloses par une liaison uronosidyl particulièrement stable, ne sont que très peu utilisés par les différentes bactéries. Seule la microflore complexe des témoins « holoxéniques » dans les graminées et *Str. faecalis* dans la Fétuque manifesteraient une légère action sur cette fraction.

La dégradation partielle de la partie ose des hémicelluloses (tabl. 2) pourrait avoir deux origines : l'activité des enzymes végétales (DEWAR, Mc DONALD et WHITTENBURY, 1963) et celle des bactéries (GOERING *et al.*, 1970). On observe en effet dans les témoins « axéniques » une réduction importante des hémicelluloses. La réduction de la proportion d'arabinose par rapport au xylose enregistrée dans ces ensilages (tabl. 3, 4, 5) rejoint aussi les résultats de DEWAR, Mc DONALD et WHITTENBURY (1963) et les nôtres (BOUSSET, 1967), qui montraient également une dimi-

TABLEAU 2
Concentration en glucides des pavois des fourrages verts et de leurs ensilages
(g p. 100 matière sèche corrigée)

	Luzerne				Fétuque				Ray-Grass							
	Hémicelluloses				lignine	Hémicelluloses				cellulose	lignine	Hémicelluloses			celluloses	lignine
	oses	acides uroniques	totales	cellulose		oses	acides uroniques	totales	oses			acides uroniques	totales			
Fourrage initial	7,27	6,21	13,48	16,56	5,32	16,24	5,79	22,03	21,81	2,85	15,26	5,04	20,30	18,43	2,63	
Ensilages																
« Axéniques » (témoin)	5,62	5,16	10,78	16,45	5,25	14,69	5,58	20,27	21,11	2,75	13,29	5,52	18,81	19,06	2,69	
« Holoxéniques » (témoin)	7,15	6,11	13,26	19,94	6,78	15,26	4,50	19,76	27,18	3,08	15,30	4,94	20,25	24,70	2,95	
« Monoxéniques » inoculés avec :																
<i>L. plantarum</i>	7,25	5,63	12,87	17,87	5,99	15,83	5,05	20,88	24,04	2,59	15,66	5,23	20,89	21,08	2,91	
<i>L. brevis</i>	5,85	6,41	12,26	15,78	6,38	13,62	5,18	18,88	18,29	4,05	11,79	5,40	17,19	15,62	3,71	
<i>Str. faecalis</i>	5,87	5,81	11,69	15,55	6,05	14,27	4,74	19,01	18,63	4,34	11,75	5,01	16,76	14,28	3,55	

nution de la proportion de glucose. Celui-ci doit en fait constituer un glucane associé aux hémicelluloses mais non constitutif de ces dernières ; GAILLARD (1965) le dose avec le « linéaire B » mais ne tient pas compte dans la composition de ce polysaccharide des hémicelluloses. L'action des enzymes végétales est lente et leur pH optimum se situe aux environs de 6 ; elle devient quasiment nulle dès que la fermentation lactique abaisse le pH, ce qui est le cas de *L. plantarum*. Ces enzymes pourraient être définitivement inactivées par une acidification temporaire du milieu, ce qui expliquerait l'absence de dégradation des hémicelluloses dans les témoins « holoxéniques », malgré les pH élevés enregistrés en fin de conservation. Les hémicelluloses sont également assez fortement dégradées en présence de *L. brevis* et *Str. faecalis*. Dans le cas de *L. brevis*, une faible action des enzymes végétales est possible en début de conservation, car les pH s'abaissent moins vite qu'avec *L. plantarum*. Ensuite, les glucides solubles étant épuisés et le pH n'inhibant pas le développement de *L. brevis* cette souche peut trouver son énergie dans les hémicelluloses puisqu'elle fermente les pentoses. L'attaque des hémicelluloses par *Str. faecalis* est du même ordre, mais il faut remarquer que l'utilisation des glucides solubles du fourrage vert ou apparus pendant la conservation, n'est pas totale dans les graminées.

« Hémicellulases » et pectinases

Les enzymes susceptibles de dégrader des polyholosides non cellulosiques n'ont pu être mises en évidence de façon certaine dans notre travail. Nous avons seulement constaté dans l'extrait par le détergent neutre de Van SOEST la présence d'un holoside précipitant dans l'alcool, riche en xylose et en arabinose, qui pourrait appartenir aux substances pectiques. Partiellement entraînées par le détergent au début du fractionnement des constituants membranaires ces substances ne peuvent donc plus être décelées par la suite.

Au vu de nos résultats (tabl. 2, 3, 4, 5) obtenus *in vivo*, il nous semble fort improbable que la libération de pentoses constatée *in vitro* par DEWAR, MC DONALD et WHITTENBURY (1963) puisse être attribuée, comme le suggéraient ces auteurs, à des « hémicellulases » et nous pensons plutôt qu'il s'agit de pectinases.

L'action d'enzymes végétales n'est donc pas à rejeter, et ce d'autant plus qu'une difficulté majeure de cette étude réside dans la caractérisation de ces enzymes qui dépend des polyholosides attaqués, l'identification de ces derniers dépendant de la technique de fractionnement utilisée.

Cellulose et lignine

L'augmentation de la concentration en celluloses (tabl. 2) dans les témoins « holoxéniques » des trois fourrages est importante. Ce fait est assez couramment observé dans les ensilages, surtout lorsqu'ils sont fortement dégradés. Il résulte de la disparition des autres constituants de la matière sèche, comme le démontre la corrélation existant entre les résultats des bilans pondéraux et ceux calculés en considérant la cellulose constante (GOUET, résultats non publiés). De plus, la composition de cette fraction qui englobe la cellulose vraie et les xylanes associés reste invariable (tabl. 3, 4, 5). Ce phénomène se retrouve moins intensément avec *L. plantarum* car les remaniements y sont limités par l'abaissement rapide du pH.

TABEAU 3
Luzerne : concentration en hémicelluloses et celluloses des parois et composition centésimale de ces fractions

	Hémicelluloses					Cellulose			
	Rhamnose	Arabinose	Xylose	Mannose	Galactose	Glucose	Xylose	Mannose	Galactose
Luzerne { 1 { 2 Ensilages	0,16 2,2	1,42 19,7	4,15 57,00	0,16 2,2	0,69 9,5	0,68 9,4	1,26 7,6	0,61 3,7	0,45 2,7
« Axénique » (témoin) { 1 { 2 Ensilages	0,18 3,2	1,87 15,3	3,87 68,1	0,06 1,0	0,34 5,9	0,37 6,5	1,56 9,4	0,68 4,1	0,33 2,0
« Holoxénique » (témoin) { 1 { 2 Ensilages	0,18 2,9	1,4 15,3	5,62 66,9	0,21 2,6	0,50 6,9	0,47 5,5	1,32 7,7	0,67 3,6	0,42 1,3
« Monoxéniques » inoculés avec :									
L. plantarum { 1 { 2 Ensilages	0,21 2,3	1,13 13,0	4,94 70,1	0,19 2,6	0,51 6,2	0,41 5,9	1,39 5,9	0,65 3,0	0,23 1,9
L. brevis { 1 { 2 Ensilages	0,47 2,7	0,76 12,3	4,35 70,9	0,15 2,5	0,41 6,7	0,29 4,7	1,94 11,7	0,76 4,6	0,48 2,9
Str. faecalis { 1 { 2 Ensilages	0,25 4,1	0,74 12,3	4,17 69,6	0,15 2,5	0,42 7,0	0,28 4,6	1,49 9,4	0,70 4,4	0,44 2,8

1 : Concentration en p. 100 MS corrigée.
2 : Composition centésimale.

TABLEAU 4

Ray-grass : concentration en hémicelluloses et cellulose des parois et composition centésimale de ces fractions

	Hémicelluloses					Cellulose				
	Rhamnose	Arabinose	Xylose	Mannose	Galactose	Glucose	Xylose	Mannose	Galactose	Glucose
Ray-Grass { 1 2 }	0,21 1,4	2,83 18,6	9,90 64,9	0,02 0,1	0,47 3,1	1,83 12,0	1,77 9,6	0,07 0,4	0,24 4,4	16,35 88,7
Ensilages										
« Axénique » (témoin) { 1 2 }	0,25 1,9	2,27 17,1	9,73 73,3	0,03 0,3	0,33 2,5	0,75 5,7	2,08 10,9	0,08 0,4	0,84 4,4	16,05 84,2
« Holoxénique » (témoin) { 1 2 }	0,44 2,8	2,75 17,1	11,78 72,7	0,02 0,1	0,32 2,0	0,85 5,3	2,36 9,1	0,42 1,6	0,86 3,3	22,33 86,1
« Monoxéniques » inoculés avec :										
<i>L. plantarum</i> { 1 2 }	0,41 2,6	2,82 18,0	10,84 69,2	— —	0,44 2,8	1,16 7,4	1,60 7,6	0,15 0,7	0,46 2,2	18,87 89,5
<i>L. brevis</i> { 1 2 }	0,15 1,2	2,21 18,0	8,57 69,2	0,02 0,2	0,37 3,0	0,89 7,3	2,52 15,5	0,16 1,0	0,41 2,5	13,14 80,9
<i>Str. faecalis</i> { 1 2 }	0,31 2,6	1,99 16,9	8,39 71,4	0,01 < 0,1	0,35 3,0	0,68 5,8	2,08 14,6	0,13 0,9	0,51 3,6	11,55 80,9

1 : Concentration en p. 100 MS corrigée.

2 : Composition centésimale.

TABLEAU 5
Fétuque : concentration en hémicelluloses et celluloses des parois et composition centésimale de ces fractions

	Hémicelluloses					Cellulose			
	Rhamnose	Arabinose	Xylose	Mannose	Galactose	Glucose	Xylose	Mannose	Galactose
Fétuque { 1 2 Ensilages	0,23 2,6	3,31 20,4	9,99 61,5	0,04 0,2	0,59 3,7	2,10 13,0	1,74 8,0		0,38 1,7
« Axénique » (témoin) { 1 2 Ensilages	0,28 1,9	3,04 20,7	9,99 68,0	0,04 0,3	0,53 3,6	0,81 5,5	2,07 9,8	0,23 1,1	0,44 2,1
« Holoxénique » (témoin) { 1 2 Ensilages	0,26 1,6	3,00 18,7	11,36 70,9	— —	0,53 3,3	0,88 5,5	1,88 6,6	0,26 0,9	0,63 2,2
« Monoxéniques » inoculés avec :									
<i>L. plantarum</i> { 1 2 Ensilages	0,32 2,0	3,01 18,8	10,36 64,8	0,19 1,2	0,45 2,8	1,68 10,5	1,33 6,3	0,11 0,5	0,34 1,6
<i>L. brevis</i> { 1 2 Ensilages	0,40 2,8	2,51 17,5	9,65 66,8	— —	0,71 4,9	1,14 7,9	2,37 12,2	0,14 0,7	0,70 3,6
<i>Str. faecalis</i> { 1 2 Ensilages	0,41 2,9	2,50 17,5	9,70 68,0	— —	0,59 4,1	1,07 7,5	2,48 13,3	0,24 1,3	0,71 3,8

1 : Concentration en p. 100 MS corrigée.
2 : Composition centésimale.

Dans ces ensilages on constate aussi, en général, une augmentation de la concentration en lignine. Ces deux accroissements ne sont pas rigoureusement liés, peut-être du fait de remaniements de ces fractions, que nous ne pouvons mettre en évidence dans le présent travail (absence d'un traceur).

La concentration en cellulose des trois fourrages est fortement réduite en présence de *L. brevis* (tabl. 2). Les tableaux 3, 4, 5 montrent que cette souche métabolise essentiellement le glucose. Ceci prouve que l'attaque porte sur la cellulose vraie et non sur les autres polysaccharides, également dosés dans les fractions cellulosiques. La forte augmentation apparente de la concentration en lignine peut être due en partie à un faible déplacement de la séparation cellulose-lignine. L'activité de *Str. faecalis* semble très comparable à celle de *L. brevis* mais peut être légèrement moins intense. La dégradation des glucides des parois par ces deux souches permet d'expliquer l'accumulation importante de produits de fermentation, en particulier par *Str. faecalis* dont l'utilisation apparente des glucides solubles est très faible.

Production des différents acides, pH, pouvoir tampon

L'augmentation de la concentration en acide lactique que l'on observe toujours dans les témoins « axéniques » (tabl. 7) est trop faible pour expliquer les variations de pH (respectivement — 0,40, — 0,35 et + 0,20 dans la Luzerne, la Fétuque et le Ray-Grass), d'autant plus que l'augmentation simultanée des pouvoirs tampons est importante: + 92 p. 100 pour la Luzerne, + 23 et + 31 p. 100 pour la Fétuque et le Ray-Grass (tabl. 6). Par ailleurs, la méthode de dosage utilisée (BARNETT, 1954), n'est pas rigoureusement spécifique de l'acide lactique et il se pourrait que les faibles quantités trouvées proviennent d'autres composés donnant de l'acétaldéhyde par oxydation sulfurique. Les variations de pH enregistrées peuvent être dues aux remaniements des acides organiques que nous n'avons pas dosés (PLAYNE, STIRLING et

FIG. 2. — Variations du pH en fonction de la concentration en acide lactique et selon les espèces fourragères

TABLEAU 6
Variations du pouvoir tampon et du pH

	Luzerne			Fétuque			Ray-Grass		
	pH	pouvoir tampon (°)	pourcentage d'augmentation (°)	pH	pouvoir tampon (°)	pourcentage d'augmentation (°)	pH	pouvoir tampon (°)	pourcentage d'augmentation (°)
Fourrage vert	5,90	59,9		5,90	61,1		6,20	43,6	
Ensilages									
« Axéniques » (témoin)	5,50	114,8	92	6,10	75,3	23	5,85	57,0	31
« Holoxéniques » (témoin)	6,30	244,7	308	6,10	151,6	148	4,80	102,6	135
« Polygnotoxéniques » (1)	4,30	126,8	112	4,20	109,9	80	—	—	—
« Monoxéniques » inoculés avec :									
<i>L. plantarum</i>	4,40	100,7	68	4,30	104,8	71	3,80	75,3	73
<i>L. brevis</i>	4,50	113,7	90	4,60	101,0	65	4,10	94,4	116
« branching » <i>L.</i>	4,20	91,5	53	4,40	94,6	55	3,75	81,1	86
<i>Str. faecalis</i>	4,70	83,6	40	4,80	79,5	30	4,60	58,4	34
<i>Pediococcus</i> sp.	4,20	85,0	42	4,40	87,0	42	3,90	63,1	45
<i>Enterobacter</i> sp.	5,40	180,6	201	5,60	114,1	87	5,30	110,8	154
<i>C. protolytique</i>	5,40	91,7	53	5,70	71,6	17	5,40	66,4	52
<i>C. butyricum</i>	5,30	92,6	54	5,35	79,2	30	5,30	n.d. (4)	n.d. (4)
<i>C. tyrobutyricum</i>	5,10	100,5	68	4,90	111,0	82	5,00	82,3	89

(1) Inoculés avec toutes les souches des ensilages « monoxéniques ».

(2) Milliéquivalents d'acide ou de base utilisés pour passer de pH 6 à pH 4 pour 100 g de MS corrigée.

(3) Par rapport au pouvoir tampon du fourrage initial.

(4) Non déterminé.

Mc DONALD, 1967; Mc DONALD, HENDERSON et Mac GREGOR, 1968). Dans les témoins « holoxéniques » l'acidification lactique ne compense pas les fortes augmentations du pouvoir tampon respectivement + 135, + 148 et + 308 p. 100 pour le Ray-Grass, la Fétuque et la Luzerne. L'abaissement du pH quant à lui, est insuffisant pour inhiber le catabolisme de l'acide lactique en acide butyrique par les *Clostridium* (ce dernier représente respectivement 7,51, 2,50 et 3,49 p. 100 de la MS dans la Luzerne, la Fétuque et le Ray-Grass). Dans le Ray-Grass il reste néanmoins 3,07 p. 100 de la M.S. sous forme d'acide lactique, ce qui maintient le pH à 4,8. La microflore de ces ensilages étant complexe, les produits du métabolisme sont très diversifiés tant pour les acides gras volatils que pour les alcools (tabl. 7 et 8).

Les pH observés en présence des souches « lactiques » sont toujours les plus faibles dans le Ray-Grass et les plus élevés dans la Fétuque, mais ne sont pas liés aux quantités d'acide lactique accumulées (fig. 2). Nous pensons que l'explication de ce phénomène se trouve dans les évolutions différentes du pouvoir tampon entre ses valeurs initiale et finale parallèlement à la production plus ou moins rapide de l'acide lactique. La valeur initiale du pouvoir tampon n'est pas déterminante dans la comparaison de plusieurs fourrages. Cependant, on peut constater que dans l'ensemble, les concentrations en acide lactique sont beaucoup plus importantes, à pH égal, dans la Fétuque que dans la Luzerne et dans la Luzerne que dans le Ray-Grass.

Les souches homofermentaires de *L. plantarum* et de « branching » *Lactobacillus* acidifient plus efficacement que *L. brevis* (hétérofermentaire) qui produit des quantités importantes d'acide acétique de pK relativement élevé. *Str. faecalis* (homofermentaire), forme aussi de l'acide acétique dans la Luzerne ; il présente dans les autres fourrages une efficacité voisine de celle de *L. brevis*. La production d'acide acétique par *Str. faecalis* et *L. plantarum* dans la Fétuque rejoint les résultats de HUHTANEN et PENSACK (1963) et montre que la notion d'homofermentation n'est pas absolue, mais varie probablement avec les conditions de milieu.

Alcools

Les alcools sont rarement étudiés dans les fourrages ensilés et, en général, seule la concentration globale est déterminée. En fait ces métabolites sont présents dans tous les ensilages que nous avons étudiés (tabl. 7 et 8) et certains d'entre eux en renferment même une gamme assez large. Cependant l'éthanol est toujours dominant et représente 2,4, 2,2 et 2,0 p. 100 de la MS pour la Luzerne, la Fétuque et le Ray-Grass. La formation des alcools est principalement due aux bactéries mais aussi, pour une faible part, aux enzymes végétales (accroissement des concentrations en méthanol et éthanol dans les témoins « axéniques »). Les fermentations sont particulièrement diversifiées dans les témoins « holoxéniques » où l'on trouve en plus du méthanol et de l'éthanol (ce dernier étant nettement dominant), du butanol, du propanol, de l'isobutanol, de l'isopropanol et aussi de l'acétone dans la Luzerne. Parmi les souches étudiées, ce sont surtout *L. brevis* et *Enterobacter* sp. qui produisent des quantités importantes d'alcools et principalement d'éthanol.

« Facteurs de transformation »

Nous avons établi pour chaque souche dans les 3 fourrages les « facteurs de transformation » (F) des glucides en calculant le rapport du poids de carbone des

TABLEAU 7

Concentrations en acides lactique, acétique et en alcools dans les fourrages verts et leurs ensilages
(p. 100 matière sèche corrigée)

	Acide lactique			Acide acétique			Méthanol			Éthanol		
	Luzerne	Fétuque	Ray-Grass	Luzerne	Fétuque	Ray-Grass	Luzerne	Fétuque	Ray-Grass	Luzerne	Fétuque	Ray-Grass
Fourrage vert	0,13	0,10	0,14	0,11	0,05	0,07	0,15	0,04	0,05	traces	traces	traces
Ensilages												
« Axéniques » (témoin)	0,20	0,25	0,45	0,19	0,17	0,17	0,31	0,06	0,09	0,14	0,07	0,12
« Holoxéniques » (témoin) ..	0,13	0,21	3,07	2,22	0,70	0,23	0,46	0,09	0,10	2,39	2,19	2,02
« Polynotoxéniques » ⁽¹⁾ ...	10,48	9,33	—	2,59	1,94	—	0,36	0,09	n.d. ⁽²⁾	0,81	0,40	n.d. ⁽²⁾
« Monoxéniques » inoculés												
avec :												
<i>L. plantarum</i>	11,25	12,10	12,13	0,66	1,21	0,56	0,39	0,07	0,07	0,09	0,06	0,05
<i>L. brevis</i>	7,69	4,72	8,95	2,33	3,92	2,48	0,40	0,08	0,07	2,20	2,49	1,65
« branching » <i>L.</i>	9,20	10,55	8,25	0,47	0,58	0,44	0,46	0,07	0,07	0,09	0,06	0,11
<i>Str. faecalis</i>	7,25	7,17	6,88	1,42	0,20	0,21	0,44	0,08	0,09	0,08	0,03	0,12
<i>Peitococcus</i> sp.	9,60	12,68	10,76	0,63	0,42	0,27	0,40	0,09	0,08	0,09	0,05	0,07
<i>Enterobacter</i> sp.	0,90	0,75	0,42	2,24	0,77	1,30	0,33	0,08	0,11	1,15	1,13	3,06
<i>C. protobiotique</i>	0,20	0,26	0,27	0,33	0,19	0,21	0,38	0,08	0,08	0,04	0,03	0,06
<i>C. butyricum</i>	0,18	0,19	1,17	0,60	0,56	0,83	0,38	0,08	n.d. ⁽²⁾	0,06	0,05	n.d. ⁽²⁾
<i>C. tyrobutyricum</i>	0,14	0,21	0,30	0,15	0,05	0,07	0,38	0,07	0,10	0,08	0,09	0,07

⁽¹⁾ Inoculés avec toutes les souches des ensilages « monoxéniques ».

⁽²⁾ Non dosé.

TABLEAU 8

Concentrations en acides gras volatils (autres que l'acide acétique) et en alcools (autres que méthanol et éthanol)
(p. 100 de la matière sèche corrigée)

	Alcools				Acides			
	Alcools	Luzerne	Fétuque	Ray-Grass	Acides	Luzerne	Fétuque	Ray-Grass
Ensilages « Axéniques » (témoins) « Holoxéniques » (témoins)	butanol	0,18	traces	(iso) 0,03	propionique	1,14	0,19	0,06
	propanol	0,08	0,09		butyrique	7,51	2,50	3,49
	isobutanol	0,04			isobutyrique	0,54	0,22	0
	acétone	0,27			valériannique	0	0,52	0
« Polygnotoxéniques »	butanol	0,12	0,09		butyrique	0	0,57	—
	isobutanol	0,06						
« Monoxéniques » inoculés avec : <i>L. plantarum</i> <i>L. brevis</i>	butanol		traces					
	butanol		traces					
	isobutanol		0,07					
	butanol	0,04				0	0	0,83
<i>Pediococcus</i> sp. <i>C. protolytique</i> <i>C. butyricum</i>	butanol	0,06		n.d. (1)	butyrique	0,01	0	0
	butanol	0,33	0,76		propionique	0,25	0,23	0
	acétone	0,10	0,21		butyrique			
					propionique	0,10	0,13	0
<i>C. tyrobutyricum</i>					butyrique	2,71	3,73	2,83

(1) n.d. : non dosé.

métabolites formés (carbone de l'acide lactique seul (fig. 3), puis carbone de l'ensemble acide lactique + acides gras volatils + alcools (fig. 4) au poids de carbone de glucides solubles disparus. Ces « facteurs de transformation » ont donc été calculés à partir des métabolites que nous avons dosés et les valeurs trouvées ne présentent pas des valeurs absolues.

Ce mode d'expression permet de voir que pour l'ensemble des souches la composition du milieu exerce une action assez importante. Ainsi le « facteur de transformation » de l'acide lactique pour *L. plantarum* augmente de 38 p. 100 lorsque l'on passe de la Luzerne (1,301) à la Fétuque (1,801) ; il varie de 48 p. 100 avec *L. brevis* si l'on considère encore la Luzerne (0,758) et la Fétuque (0,395) ; il progresse de 270 p. 100 avec *Str. faecalis* lorsque l'on compare la Luzerne (1,808) ou la Fétuque (1,820) au Ray-Grass (4,811). De plus on constate que les glucides solubles ne constituent pas toujours la seule source de carbone ni même parfois la source préférentielle des bactéries puisque (F) est nettement supérieur à l'unité pour l'ensemble des métabolites et même pour la seule production d'acide lactique dans le cas de *L. plantarum*, *Str. faecalis* et *Pediococcus* sp. Compte tenu de leur concentration dans la Luzerne les acides organiques jouent probablement un rôle important. Dans le Ray-Grass

FIG. 3. — Variations du facteur de transformation :
glucides solubles → acide lactique suivant les fourrages et les espèces bactériennes

———— Luzerne
 - - - - - Fétuque
 Ray-Grass

FIG. 4. — Représentation graphique du « facteur de transformation » (F) et des glucides solubles fermentés pour chaque ensilage (C : Carbones, Ac. L. : Ac. Lactique, AGV : Acides gras volatils, Alc : Alcools, gluc. Sol. : glucides solubles)

les glucides disponibles étant en large excès nous pensons que l'origine du carbone est plutôt à rechercher dans les acides aminés nécessaires pour le métabolisme azoté.

Les « facteurs de transformation » de l'acide lactique inférieurs à l'unité correspondent aux souches hétérofermentaires (*L. brevis*, *Enterobacter* sp., *C. butyricum* et *C. tyrobutyricum*) car dans ces cas une partie du carbone des glucides est perdue avec le gaz carbonique. Parmi ces hétérofermentaires *L. brevis* joue un rôle très important car les ensilages « polygnotoxéniques » ont un (F) inférieur à l'unité.

Pour le *Clostridium* protéolytique dans les 3 fourrages et pour l'ensilage « axénique de Luzerne il ne nous a pas été possible de calculer (F) du fait de l'augmentation des glucides solubles (0,01 à 3,59 points) par rapport à leurs témoins respectifs.

TABLEAU 9

Concentrations en matière sèche et pertes de matière sèche sous forme de gaz

	MS* corrigée en p. 100			MS perdue sous forme de gaz en p. 100 de la MS ensilée		
	Luzerne	Fétuque	Ray-Grass	Luzerne	Fétuque	Ray-Grass
Fourrage vert.....	19,9	23,4	20,5			
Ensilages						
« Axéniques » (témoin)	19,2	22,9	21,0	n.d. ⁽²⁾	n.d. ⁽²⁾	n.d. ⁽²⁾
« Holoxéniques » (témoin)	18,1	20,8	18,8	—	—	—
« Polygnotoxéniques » ⁽¹⁾	17,6	21,5	—	9,1	4,0	—
« Monoxéniques » inoculés avec :						
<i>L. plantarum</i>	18,9	21,7	19,1	1,1	2,9	2,6
<i>L. brevis</i>	18,7	21,0	18,9	2,5	7,0	4,1
« branching » <i>L.</i>	18,3	22,2	19,0	3,8	0,7	3,3
<i>Str. faecalis</i>	18,2	21,2	19,6	4,4	6,0	< 0,1
<i>Pedococcus</i> sp.	18,8	20,7	19,3	1,3	7,6	2,0
<i>Enterobacter</i> sp.	18,4	20,9	15,6	4,5	7,7	22,0
<i>C. protéolytique</i>	19,4	22,3	19,8	— 1,8	0,2	0,9
<i>C. butyricum</i>	17,8	21,6	17,9	6,6	4,4	10,2
<i>C. tyrobutyricum</i>	18,1	21,2	19,3	5,8	5,9	1,9

* MS = Matière sèche.

⁽¹⁾ Inoculés avec toutes les souches des ensilages « monoxéniques ».

⁽²⁾ Non déterminés.

Ce facteur ne permet cependant pas de classer les espèces en fonction de leur efficacité vis-à-vis de la fermentation lactique dont on sait l'importance primordiale dans l'abaissement du pH et la bonne conservation de l'ensilage. Ainsi *Str. faecalis*, dont l'activité fermentaire est assez modérée passe nettement, avec cet indice, au premier rang : 1,808, 1,820, 4,811 respectivement dans la Luzerne, la Fétuque et le Ray-Grass. Le classement de l'efficacité des espèces doit donc se faire d'après les concentrations d'acide lactique (tabl. 7) produites dans les 3 fourrages : 1 *L. plantarum*, 2 *Pedococcus* sp., 3 « branching » *Lactobacillus*, 4 *L. brevis*.

Pertes durant la conservation

Les teneurs en matière sèche corrigée des ensilages sont toujours plus faibles que celles des fourrages initiaux et les pertes sous forme de gaz atteignent dans certains cas, des valeurs très élevées : respectivement 22 et 10 p. 100 dans le Ray-Grass en présence d'*Enterobacter* sp. et de *C. butyricum* (tabl. 9) ; l'effet des souches sur les pertes varie beaucoup selon le fourrage fermenté, les pertes les plus faibles se trouvent avec *L. plantarum*. Nous avons admis que l'ensilage avec *C. protéolytique* (qui ne s'est pas développé) pouvait être considéré comme un ensilage « axénique » ; on constate que les pertes dues aux enzymes végétales sont alors extrêmement réduites et de l'ordre des erreurs expérimentales. Par contre, dans l'ensilage « polygnotoxénique » de Luzerne qui s'est très bien conservé les pertes sont anormalement élevées (9,1 p. 100 de la MS ensilée) ; elles nous semblent beaucoup plus « normales » dans l'ensilage « polygnotoxénique » de Fétuque.

Le substrat fermenté (Luzerne, Fétuque, Ray-Grass) est un facteur déterminant de l'intensité des pertes gazeuses, car les différences entre fourrages sont du même

FIG. 5. — Relation entre les pertes de matière sèche des ensilages et la variation de leur taux de matière sèche

1. Cette droite représente la diminution du taux de MS des ensilages si l'on admet que les pertes sont dues à la seule combustion des glucides.
2. Droite de régression de la perte de MS des ensilages en fonction de la diminution de leur taux de matière sèche.

ordre de grandeur que celles entre souches. La Fétuque paraît plus vulnérable que les autres fourrages, excepté pour « branching » *Lactobacillus*, *C. butyricum* et *Enterobacter* sp.

Les ensilages étant réalisés dans des bocalux non drainés, les jus sont conservés et seuls les gaz peuvent s'échapper au niveau des joints. Ceci permet de mettre en évidence une corrélation étroite ($r = 0,97$) entre les pertes gazeuses et les variations de concentration de la matière sèche des fourrages pendant la conservation. Sur la figure 5 la droite (2) de régression ($y = 4,90 \times - 3,91$) correspond sensiblement à la translation selon l'axe des abscisses de la courbe (1) que nous avons calculée en admettant que la matière sèche soit perdue par la seule combustion des glucides. La valeur de l'abscisse à l'origine (+ 0,8) représente l'abaissement du taux de matière sèche engendré par l'eau produite lors des fermentations diverses (lactique, acétique, alcoolique, etc.).

CONCLUSION

Les résultats obtenus dans cette étude, pour la plupart originaux permettent de distinguer selon les cas des effets très nets de l'espèce fourragère ou de l'espèce bactérienne.

Au plan du métabolisme glucidique on constate que les enzymes végétales catalysent un certain nombre de réactions mais toujours avec une intensité très nettement inférieure à celle que l'on note pour la fraction azotée. Une publication prochaine rendra d'ailleurs compte en détail de l'étude du métabolisme azoté dans ces mêmes ensilages. Ainsi, tant que le pH reste élevé les fructosanes sont hydrolysés en fructose, et d'autres enzymes, probablement pectinases et (ou) « hémicellulases » hydrolysent une fraction des polyholosides non cellulosiques en libérant principalement du xylose et de l'arabinose. Ce phénomène est particulièrement marqué dans la Luzerne où l'augmentation de concentration des glucides solubles atteint 42 p. 100 dans le témoin « axénique ».

Une part de l'augmentation du pouvoir tampon est due aux enzymes végétales et son importance varie beaucoup avec l'espèce fourragère ; dans le cas de la Luzerne elle peut expliquer les difficultés rencontrées pour obtenir des ensilages de qualité. Parmi les alcools trouvés, l'éthanol se forme dans les trois ensilages « axéniques » ainsi que le méthanol qui atteint 0,3 p. 100 de la MS dans la Luzerne. On note dans ces ensilages de très faibles quantités d'acides acétique et lactique.

L'action des bactéries sur le métabolisme des glucides solubles et leur fermentation en acide lactique et acides gras volatils est incomparablement supérieure à celle des enzymes végétales. Il faut souligner que les glucides solubles ne sont jamais fermentés en totalité et que l'on en retrouve dans les ensilages des quantités parfois importantes ; ils ne constituent donc en aucun cas le facteur limitant du développement bactérien. L'épargne de ces glucides est d'autant plus grande que le fourrage vert initial est plus riche en glucides (Ray-Grass) et que l'espèce bactérienne produit plus d'acide lactique (*L. plantarum* et *Pediococcus* sp.).

On retiendra également les différences d'efficacité importantes entre les souches vis-à-vis du métabolisme fermentaire et le rôle primordial de *Lactobacillus plantarum* qui fournit dans les trois fourrages des quantités d'acide lactique nettement supé-

rieures à celles des glucides solubles consommés et dont nous nous sommes demandés l'origine. Or, si *L. brevis* et *Str. faecalis* agissent directement sur la cellulose dans les trois fourrages et sur les polyholosides non cellulosiques dans le Ray-Grass seulement, il ne semble pas que ce soit le cas pour *L. plantarum*. Il est probable pour cette dernière espèce que les acides organiques toujours abondants dans la Luzerne jouent un rôle aussi important que les glucides. Pour les graminées la réponse semble plus complexe et les sources de métabolites fermentescibles doivent être multiples.

Par ailleurs, nous avons remarqué des productions très importantes d'éthanol par *L. brevis* et *Enterobacter* sp., cette dernière espèce se montrant trois fois plus active dans le Ray-Grass que dans les autres fourrages. Dans les ensilages « holoxéniques » la concentration en éthanol est comparable à celle des ensilages « monoxéniques » précédents et elle est même très nettement supérieure à celle de l'acide acétique. Ce résultat doit être souligné car l'importance des alcools a sans doute été sous-estimée dans les recherches effectuées sur les ensilages. Enfin la compétition bactérienne dans les ensilages « polygnotoxéniques » n'a pas permis à *L. brevis* de produire de l'éthanol en concentrations aussi importantes que dans les ensilages « monoxéniques ».

L'action des bactéries vis-à-vis du pouvoir tampon se traduit toujours par une augmentation qui est particulièrement notable, en présence d'*Enterobacter* sp. et même de *L. brevis*. Dans les ensilages « holoxéniques » la dominance fréquente de ces deux espèces associées à des espèces protéolytiques (*Clostridium* par exemple) peut expliquer l'élévation importante du pouvoir tampon que l'on y enregistre.

Des trois fourrages, la Fétuque subit les pertes gazeuses les plus importantes ; celles-ci sont dues essentiellement aux fermentations bactériennes et peuvent atteindre avec *L. brevis*, *Enterobacter* sp. et les *Clostridium*, des valeurs élevées et comparables à celles des ensilages rencontrés dans la pratique courante. Ces résultats prouvent aussi que les pertes attribuées à la respiration du végétal ont sans doute été surestimées tout au moins dans les ensilages réalisés dans de bonnes conditions de remplissage et d'étanchéité.

La diminution très sensible des pertes par gaz avec *L. plantarum*, la parfaite et rapide acidification des ensilages, l'économie de glucides solubles réalisée, soulignent si besoin est, tout l'intérêt du contrôle et de l'orientation de la microflore des ensilages.

Reçu pour publication en février 1972.

SUMMARY

« GNOTOXENIC » FORAGE SILAGES. II. — CATABOLISM OF CARBOHYDRATES AND METABOLISM OF FERMENTATION IN « GNOTOXENIC » SILAGES OF LUCERNE, FESCUE AND RYEGRASS

To distinguish the respective roles of plant and of bacterial enzymes in the preservation of forage by ensiling, we had recourse to sterilization of the forage by γ -irradiation (2 Mrad) followed by inoculation of this forage with different strains isolated from « holoxenic » silages *Lactobacillus plantarum*, *L. brevis*, « branching » *Lactobacillus*, *Streptococcus faecalis*, *Pediococcus* sp. *Enterobacter* sp. *Clostridium tyrobutyricum* and proteolytic *Clostridium*. It could be shown that the roles of the heterofermentative bacteria (*L. brevis*), of the gram-negative microflora (*Enterobacter* sp.) or

sporulating anaerobes (*C. tyrobutyricum* and *C. butyricum*) in the loss of dry matter as gases were markedly more important than the role of plant respiration. The fructosans of grasses were hydrolyzed by plant enzymes for which the optimum pH of activity is probably close to neutrality. Utilization of soluble carbohydrates was never complete and its intensity depended on the bacterial strain inoculated. Maximum utilisation was attained with *Enterobacter* sp. and *L. brevis*, while *L. plantarum* (homofermentive) was limited in its action by the lactic acid which it produced. The « branching » *Lactobacillus* and *Pediococcus* sp. seemed to be of great interest since they caused a lowering of pH close to that of *L. plantarum* for a smaller consumption of soluble carbohydrates. The carbohydrates of the plant membranes seemed to be degraded both by the plant enzymes and the bacterial enzymes, but the hydrolysis was always limited. The percentage composition of the carbohydrates of the cell-wall was little affected.

In the « holoxenic » controls there was a large increase in the buffering capacity which restricted the lowering of the pH and at the end of the preservation allowed the development of *Clostridium* which resulted in production of much butyric acid. In the silages inoculated with pure strains (« mono- » or « polygnotoxenic ») the pH was always lowest with ryegrass and highest with fescue ; it did not seem to be closely related to the amount of lactic acid produced.

Methanol, and especially ethanol were always present in the silages and could reach high values (2.4 percent of dry matter in the « holoxenic » controls) ; among the strains studied *L. brevis* and *Enterobacter* sp. were the two mainly responsible for their production.

The high solubilization of nitrogen was essentially due to plant proteases ; glycolysis depended on the combined enzymic activity of plant and bacteria.

Balance of transformation of carbon of soluble carbohydrates into carbon of the metabolites of fermentation (lactic acid, volatile fatty acids, alcohols) was established for each strain in the three forages. The ratio of the amount of carbon was distinctly greater than unity for the combined metabolites, and even more for lactic acid only, in the case of *L. plantarum*, *Str. faecalis*, *Pediococcus* sp. Thus the soluble carbohydrates were not the only source of carbon of the bacteria.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BARNETT A. J. G., 1954. *Silage Fermentation*. Butherworths. Sc. Publ., London.
- BOUSSET J.-A., 1967. Modifications induites par l'ensilage dans la composition de la fraction glucide « soluble » d'un Ray-Grass d'Italie (*Lolium italicum*). *C. R. Acad. Sci.*, Paris, **265**, 1550-1553.
- BOUSSET J.-A., FATIANOFF N., GOUET Ph., 1970. Étude cinétique au cours de la conservation, des fractions glucidiques de deux ensilages de luzerne axénique et conventionnel. *C. R. Acad. Sci.*, Paris, **270**, 1174-1177.
- CONWAY E. S., 1956. *Microdiffusion analysis and volumetric error*. Crossby., London.
- DEWAR W. A., Mc DONALD P., WHITTENBURY R., 1963. The hydrolysis of grass hemicelluloses during ensilage. *J. Sci. Fd. Agric.*, **14**, 411-417.
- FATIANOFF N., GOUET Ph., 1969. Relation permettant de corriger rapidement et avec précision la matière sèche des ensilages séchés à l'étuve. *Ann. Zootech.*, **18**, 607-608.
- FRIEDMANN T. E., 1938. The identification and quantitative determination of volatile alcohols and acids. *J. Biol. Chem.*, **123**, 161-184.
- GAILLARD B. D. E., 1965. Comparison of the hemicelluloses from plants belonging to two different plant families. *Phytochem.*, **4**, 631-634.
- GAILLARD B. D. E., 1966. Calculation of the digestibility for the ruminants of the roughages from the content of cell wall constituents. *Neth. J. Agric. Sci.*, **14**, 215-223.
- GOERING H. K., SMITH L. W., LAKSMANAN S., GORDON C. H., 1970. Fate of carbon - 14 labeled cell walls in silage fermentation. *Agron. J.*, **62**, 532-536.
- GOUET Ph., FATIANOFF N., 1964. Les bactéries de l'ensilage. I. Tentative de différenciation entre les actions enzymatiques végétales et des cellules bactériennes dans la glycolyse et la protéolyse d'un ensilage de luzerne. *Ann. Inst. Pasteur*, **107**, 711-723.
- GOUET Ph., CHEVALIER R., 1966. The evolution of Gram negative microflora in direct harvested and wilted alfalfa silages. *Proceed. Xth Int. Grassl. congress.* Helsinki.
- GOUET Ph., CONTREPOIS M., BOUSSET J., Nathalie BOUSSET-FATIANOFF, 1972. *Ensilages « gnotoxéniques » de fourrages*. I. Étude cinétique du développement bactérien dans des ensilages « gnotoxéniques » de Luzerne, Fétuque et Ray-Grass., **12**, 159-171.
- HAGEDORN M. C., JENSEN B. N., 1923. *Bioch. Z.*, **135**, 45. Cité par LOISELEUR J. *Techniques de laboratoire*, Masson, Paris.
- HUHTANEN C. N., PENSACK J. M., 1963. Gnotobiotic silage. *Applic. Microbiol.*, **11**, 529-531.
- JARRIGE R., 1961. Analyse des constituants glucidiques des plantes fourragères. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, **1**, 163-212.

- Mc DONALD P., HENDERSON A. R., Mac GREGOR A. W., 1968. Chemical changes and losses during the ensilage of wilted grass. *J. Sci. Fd. Agric.*, **19**, 125-132.
- NELSON W. L., 1944. Photometric adaptation of the SOMOGYI methods for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.*, **153**, 375-381.
- PLAYNE J., STIRLING A., Mc DONALD P., 1967. Changes in organic acids composition during incubation of aseptically grown grass. *J. Sci. Fd. Agric.*, **18**, 19-20.
- RAIBAUD P., DICKINSON A. B., SACQUET E., CHARLIER M., MOCQUOT G., 1966. La microflore du tube digestif du Rat. IV. Implantation contrôlée chez le rat gnotobiotique de différents genres microbiens isolés du rat conventionnel. *Ann. Inst. Pasteur*, **111**, 193-210.
- SOMOGYI M., 1952. Note on Sugar determination. *J. Biol. Chem.*, **195**, 19-23.
- ZELTER S.-Z., LEROY F., 1958. Azote uréique et activité bactérienne *in vitro* au niveau du rumen. *Ann. Zootechn.*, **3**, 173-183.
- MABBITT L. A., 1951. The role of plant cells in the ensilage process : an approach to the problem. *Proc. Soc. Appl. Bact.*, **14**, 147-150.
-