

## Ensilages « gnotoxéniques » de fourrages

### III. — Evolution du pouvoir tampon dans des ensilages « gnotoxéniques » <sup>(1)</sup> de luzerne, fétuque et ray grass

par J. BOUSSET \*, Ph. GOUET, J. P. GIRARDEAU, Natalie BOUSSET-FATIANOFF, M. CONTREPOIS

avec la collaboration technique de Annie BARDE-METZGER et Nadine MOUHOUS-RIOU

Laboratoire de Microbiologie, I. N. R. A.,  
Theix, Saint Genès Champanelle 37380 Beaumont, France.

\* Laboratoire de Recherches sur la Viande, I. N. R. A.  
78350 Jouy en Josas, France.

---

**Summary.** « Gnotoxenic » forage silage. III. Evolution of buffer strength in « gnotoxenic » alfalfa, fescue and rye-grass silages.

Buffer strength (PT) was determined in three types of forage silages (alfalfa, fescue and rye-grass) sterilized with  $\gamma$  rays then implanted with different types of pure or mixed bacteria. As compared to standing forage, buffer strength increased considerably in conventional silage, but the augmentation was also marked in axenic silage.

Among the species studied, *Enterobacter* sp. increased buffer strength the most ; it was followed in order by *Lactobacillus brevis*, *L. plantarum* and « branching » L... On the other hand, *St. faecalis* and *Pediococcus* sp. increased it very little.

Buffer strength depended on the types of nitrogen resulting from proteolysis and ammoniogenesis, while acetic and lactic acids did not seem to be involved.

Buffer strength for pH 5 was a good expression of its total value between pH 6 and pH 4.

---

## Introduction.

Le facteur déterminant de la réussite des ensilages réside dans une acidification rapide du fourrage jusqu'à pH 4 qui inhibe l'activité enzymatique végétale et interdit le développement des *Clostridium* producteurs d'acide butyrique et d'ammoniaque. Le pouvoir tampon revêt donc une importance particulière dans la réussite ou l'échec des ensilages. Son étude s'étend généralement entre pH 3,5 et 7 et son origine serait à rechercher selon les auteurs, dans la présence de minéraux (Smith, 1962), dans les protéines et les ions  $Ca^{++}$  (Wilson, 1935), les protéines et les acides aminés qu'elles libèrent ces derniers étant ultérieurement décarboxylés (Mc Donald et Henderson, 1962),

---

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

ainsi que dans les acides organiques (Mc Donald et Henderson, 1962 ; Greenhill, 1964). Les acides acétique et lactique interviendraient dans les fourrages frais pour 68 p. 100 et dans les ensilages pour 80 p. 100 du pouvoir tampon (Playne et Mc Donald, 1966) ; leur activité principale se situerait entre pH 3,5 et 5 alors que les phosphates agirait dans la zone neutre.

Il semble donc bien que l'action tampon soit circonscrite aux protéines pour certains auteurs, aux acétates et aux lactates, avec rôle prédominant des ions acides pour d'autres. Le recours aux techniques de la gnotobiologie devrait permettre de différencier les rôles respectifs des matières azotées et des acides organiques. En effet, Gouet *et al.* (1972), Bousset *et al.* (1972) ont montré au moyen d'ensilages gnotoxéniques que les enzymes végétaux et bactériens avaient des actions très différentes au cours de la conservation, les premiers en solubilisant la fraction protéique du fourrage et les seconds en produisant les acides organiques.

Le présent travail a précisément pour but de définir le rôle des enzymes végétaux et de différentes espèces bactériennes dans l'évolution du pouvoir tampon des ensilages en utilisant des techniques gnotobiologiques.

## Matériel et méthodes

La première coupe d'une luzerne (variété Flamande), d'une fétuque des prés et d'un ray grass (variété Rina) a été ensilée sitôt après la coupe en double dans des piluliers de 50 ml à raison de 20 g par pilulier.

Les fourrages ensilés sont stérilisés par irradiation gamma puis inoculés avec différentes souches bactériennes pures (ensilages monoxéniques) ou leur mélange (ensilage polyxénique), caractéristiques de la microflore dominante des ensilages conventionnels : *Lactobacillus plantarum*, « branching » *Lactobacillus* (Langston et Bouma, 1960a), *Lactobacillus brevis*, *Streptococcus faecalis*, *Pediococcus* sp., *Enterobacter* sp., *C. tyrobutyricum*. Un pilulier n'est pas stérilisé pour servir de témoin (« holoxénique ») de la fermentation naturelle, alors qu'un autre pilulier n'est pas inoculé après stérilisation pour servir de témoin (« axénique ») de l'activité enzymatique végétale. La conservation est de cent jours à 22 °C. La préparation des ensilages, le choix des souches bactériennes et les méthodes de dénombrement, sont décrits par Gouet *et al.* (1972). Les techniques analytiques sont exposées par Bousset *et al.* (1972).

Le pouvoir tampon est déterminé dans une macération aqueuse au 1/10 (P/V) de 10 g de fourrage ou d'ensilage (18 h à 4 °C) en réalisant deux courbes de titration à l'aide d'un appareil automatique, l'une avec de la soude 0,05 N, l'autre avec de l'acide lactique 0,01 N. A partir du tracé de la courbe nous avons calculé et exprimé en pour cent de la matière sèche corrigée selon Fatianoff et Gouet (1969) le nombre de milléquivalents d'acide et de base nécessaires pour porter le pH de sa valeur initiale à 4 et à 6. Dans cette méthode interviennent seuls les produits solubles dans l'eau et non le fourrage entier. Pour mesurer l'importance des différences éventuelles dues aux autres éléments du fourrage, nous avons déterminé comparativement les pouvoirs tampon sur les filtrats d'une macération normale, d'une macération broyée très finement et de la totalité d'un broyat. Les échantillons gnotoxéniques précédents disponibles étant d'un volume insuffisant, nous avons utilisé pour cette mesure deux fourrages (ray grass, trèfle) et deux ensilages de maïs et de dactyle.

## Résultats et discussion.

L'effet du broyage sur le pouvoir tampon est très important pour les fourrages verts et particulièrement pour le ray grass, plus faible pour le trèfle et les ensilages (fig. 1). Cet effet peut être attribué à la fois à l'éclatement mécanique des cellules et à

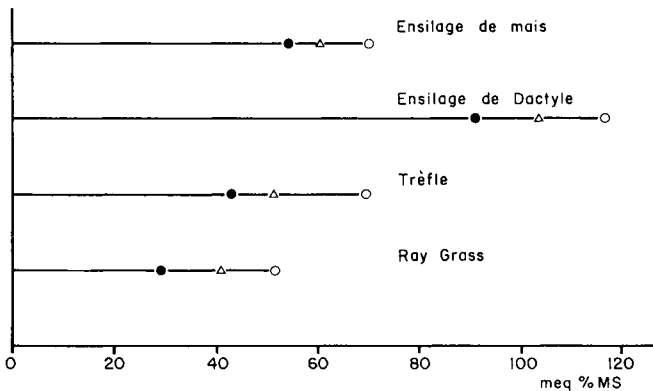


FIG. 1. — Effet du broyage sur le pouvoir tampon de fourrages verts et d'ensilages (meq. p. 100 M. S.

- jus de macération du fourrage entier
- △ jus de macération du fourrage broyé
- broyat complet.

la dispersion des composants qui sont ainsi à même de filtrer et dans les ensilages à la protéolyse et à la plasmolyse des cellules qui vont dans le même sens. L'augmentation considérable du pouvoir tampon enregistré lors de la détermination sur le broyat complet pour le ray-grass et le trèfle, plus faible pour les ensilages, montre qu'une partie importante du pouvoir tampon est due à des composés non extraits par macération, ces produits étant insolubles par nature ou physiquement empêchés. Ces augmentations n'entraînent toutefois pas de modifications dans le classement des valeurs du pouvoir tampon établi à partir des macérations. Aussi, compte tenu de la variation importante du pouvoir tampon lorsque l'on passe des fourrages aux ensilages, on peut établir un classement exact de celui-ci à partir des macérations et ne recourir au broyage que pour la mise en évidence des faibles variations qui doivent se produire dans les premiers temps après la mise en silo. Dans les résultats rapportés ci-après, les variations liées aux traitements et aux espèces bactériennes sont beaucoup plus importantes que celles dues à la technique de préparation des échantillons et les conclusions tirées à partir des résultats des macérations sont donc parfaitement valables.

Comparativement au fourrage vert, le pouvoir tampon des ensilages holoxéniques (fig. 2) s'accroît d'une façon très importante : 2,5 fois pour les graminées (43,6-111,5 meq p. 100 M. S. pour le ray grass et 61,1-159,1 meq p. 100 M. S. pour la fétuque) et de 4 fois pour la luzerne (59,4-273,1). Il augmente mais dans une moindre mesure pour les ensilages axéniques : multiplié par 1,3 pour le ray grass et par 1,2 pour la fétuque, il double dans la luzerne.

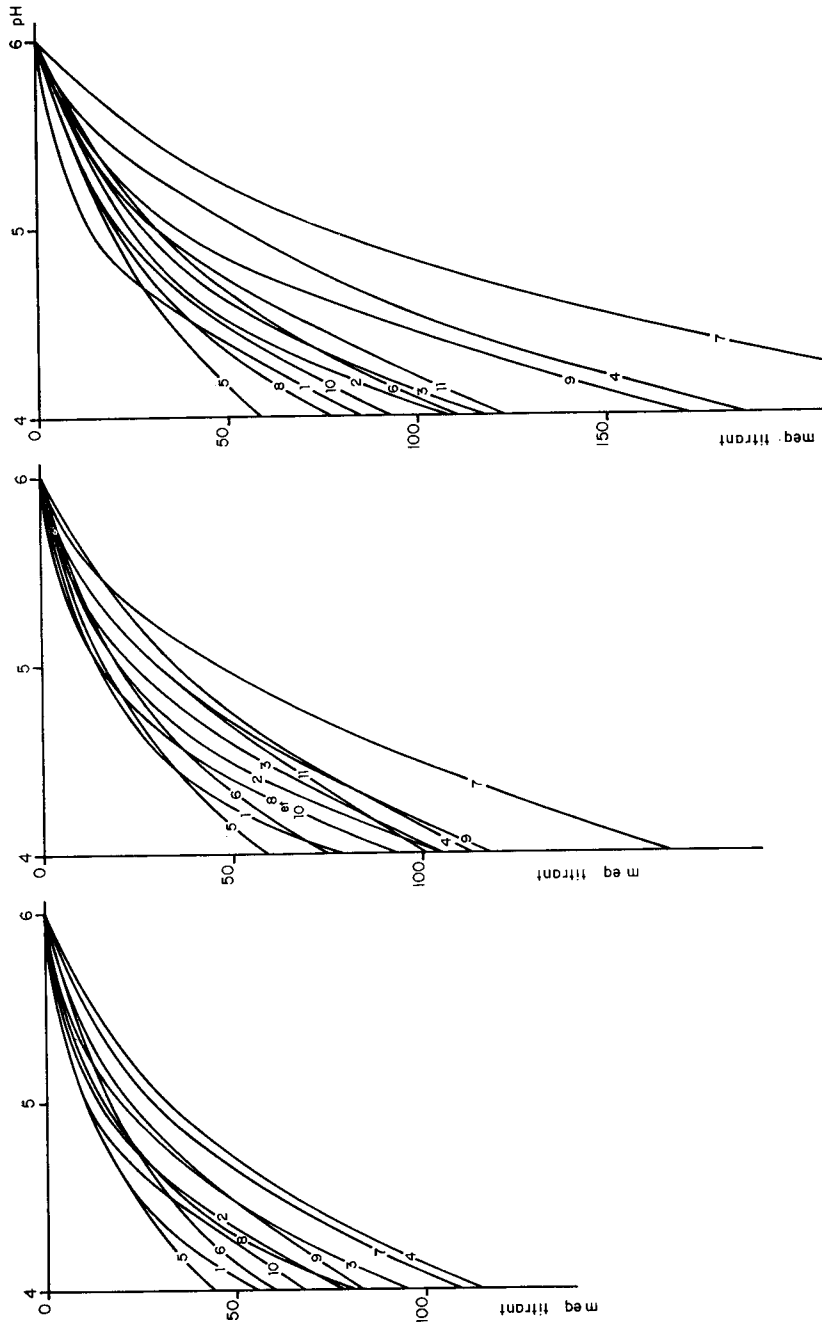


FIG. 2. — Variations du pouvoir tampon (en milliéquivalents p. 100 M. S.) entre pH 4 et 6 des ensilages gnotobiontiques de ray grass, fêtuque et luzerne.

1. *St faecalis* ; 2. *L. plantarum* ; 3. *L. brevis* ; 4. *Enterobacter* sp. 5. fourrage vert ; 6. Axénique ; 7. Holoxénique ; 8. « branching » L ; 9. *Cl. Tyrobutyricum* ; 10. *Pediococcus* sp. ; 11. polyxénique.

TABLEAU 1

Concentration des différentes formes d'azote dans les trois espèces fourragères  
(en g de N p. 100 de la M. S. corrigée)  
L : Luzerne, F : Fétuque, R. G. : Ray grass

	Azote total			Azote soluble			Azote non protéique			Ammoniaque		
	L	F	R. G.	L	F	R. G.	L	F	R. G.	L	F	R. G.
Fourrage vert .....	3,63	2,17	2,06	1,33	1,16	0,89	0,69	0,38	0,30	trace	trace	trace
Axénique .....	3,25	2,13	1,69	2,60	1,79	1,36	2,35	1,27	1,05	0,11	0,08	0,07
Holoxénique .....	3,58	2,27	1,83	2,90	1,86	1,45	2,66	1,64	1,14	0,51	0,37	0,14
Polyxénique .....	3,66	2,25	—	2,60	1,44	—	2,03	0,89	—	0,23	0,09	—
Monoxénique inoculés avec :												
L. plantarum .....	3,23	2,04	1,78	2,20	1,46	1,32	1,82	1,11	0,94	0,07	0,04	0,04
L. brevis .....	3,11	2,10	1,68	2,22	1,50	1,22	2,00	1,04	0,83	0,17	0,04	0,08
« branching » L. ....	3,33	2,04	1,70	2,34	1,63	1,27	1,95	1,22	0,82	0,08	0,04	0,05
St. faecalis .....	3,52	2,22	1,61	2,50	1,49	1,22	2,06	1,14	0,86	0,15	0,12	0,09
Pediococcus sp. ....	3,34	2,19	2,00	2,19	1,74	1,48	1,65	1,23	0,86	0,13	0,07	0,08
Enterobacter sp. ....	3,17	2,24	2,36	2,64	1,64	1,82	2,22	1,14	1,26	0,43	0,15	0,16
C. tyrobutyricum .....	3,52	2,16	1,88	2,32	1,63	1,52	1,99	1,24	1,05	0,08	0,06	0,11

La figure 2 révèle le rôle particulièrement net des espèces bactériennes qui agissent par leurs métabolites fermentaires (acides lactique et acétique, ammoniaque). Quelle que soit l'espèce fourragère ensilée, on constate qu'un même ordre s'établit dans l'accroissement du pouvoir tampon entre les espèces bactériennes : *St. faecalis*, *Pediococcus* sp., « branching » *Lactobacillus*, *L. plantarum*, *Cl. tyrobutyricum*, *L. brevis*, *Enterobacter* sp., Cette classification ne subit que des inversions d'une place dans les différents fourrages. Quant au pouvoir tampon des ensilages polyxéniques où le groupe des bactéries à métabolisme lactique domine manifestement, il se situe très près du fourrage vert pour les graminées mais beaucoup plus loin pour la luzerne.

Les trois ensilages monoxéniques avec *Enterobacter* sp. et les trois ensilages axéniques ont en commun une très faible concentration en acides organiques (Bousset *et al.*, 1972) et une forte protéolyse (72,1-59,8 et 62,2 p. 100 d'azote soluble pour la luzerne, fétuque, ray-grass dans l'axénique (fig. 3 et tabl. 1). Il est aussi notable que parmi les espèces bactériennes étudiées, *Enterobacter* sp. est celle qui augmente le plus le pouvoir tampon.

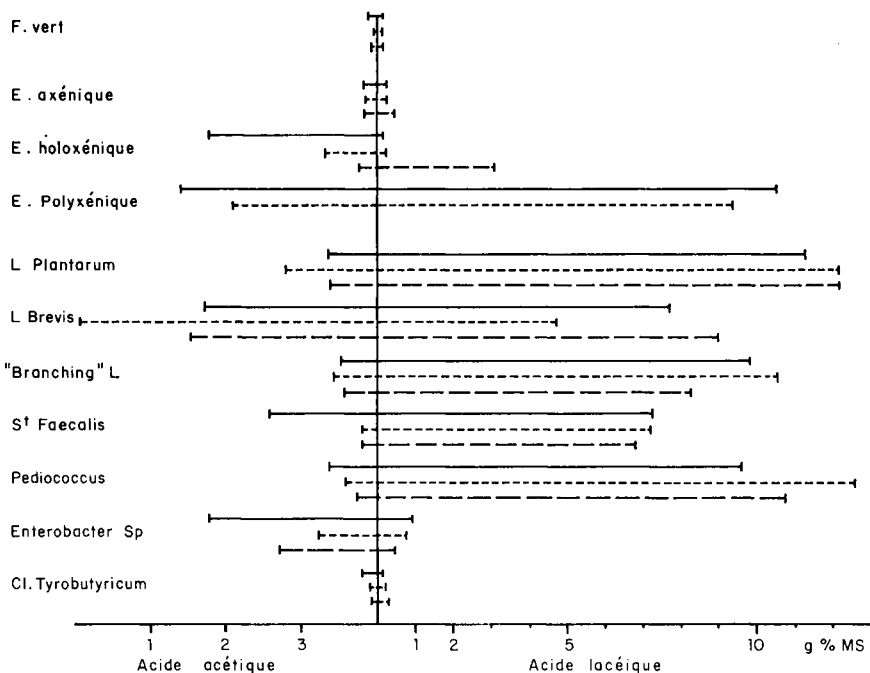


FIG. 3. — Concentrations en acides lactique et acétique produits dans le fourrage vert et les différents ensilages expérimentaux.

———— Luzerne ..... Fétuque — — — — Ray grass

L'examen de la figure 3 et du tableau 1 révèle que les espèces homofermentaires à métabolisme lactique, en souches pures ou en mélange (polyxéniques), produisent selon l'espèce fourragère de 7 à 12 g d'acide lactique pour 100 g de M. S. alors que les concentrations en azote soluble et en azote ammoniaque de ces ensilages sont les

plus faibles. A l'opposé on constate que les ensilages holoxéniques se sont très mal conservés et possèdent les concentrations les plus élevées en azote soluble et ammoniacal et les plus faibles en acide lactique. Les ensilages holoxéniques et monoxéniques avec *Enterobacter* sp. ont des concentrations en métabolites et en fractions azotées peu différentes.

Le rapprochement entre cet ensemble de résultats et les variations du pouvoir tampon nous conduit à penser que les acides organiques formés par les bactéries ne sont pas les responsables principaux de ces variations qui semblent beaucoup plus en liaison avec les formes d'azote résultant de la protéolyse.

L'étude statistique par régression linéaire des différentes données obtenues confirme cette interprétation. Le tableau 2 donne les valeurs de « r » des différentes régressions et leur signification pour  $p = 0,1$  ;  $0,05$  ;  $0,001$ . Nous voyons que ce sont les formes dégradées de l'azote qui interviennent et ceci d'autant plus que l'azote est plus dégradé.

TABLEAU 2

Valeur du coefficient de régression du pouvoir tampon dans les trois espèces fourragères, en fonction des principaux métabolites

Espèces fourragères	n	acide acétique	acide lactique	acides lactique + acétique	N soluble	Nnp	NH <sub>3</sub>
Luzerne.....	13	-0,245	0,651 *	-0,020	0,662 *	0,648 *	0,945 **
Féтуque .....	13	0,038	0,293	0,092	0,601 *	0,691 **	0,747 **
Ray grass .....	11	0,026	0,563 +	0,106	0,595 +	0,614 *	0,761 **

n : nombre de données ; + :  $p = 0,10$  ; \* :  $p = 0,05$  ; \*\* :  $p = 0,01$ .

L'examen des trois groupes de courbes de la figure 2 fait nettement ressortir que pour un même fourrage les variations importantes du pouvoir tampon se font dans la zone pH-6-pH 4,5, les courbes devenant ensuite sensiblement parallèles, à l'exception de celle de *St. faecalis*. Après étude des valeurs tangentes à différents pH, nous avons calculé qu'une bonne expression du pouvoir tampon dans les limites de pH 6 à pH 4, était obtenue à partir de celle à pH 5 :  $Y = 93,28 X + 24,60$  ;  $r = 0,97$  ; Y = pouvoir tampon du fourrage ; X = tg à pH 5.

On peut conclure que le pouvoir tampon du fourrage vert est toujours augmenté au cours de la conservation par ensilage et de ce fait, les quantités d'acide lactique nécessaires à une bonne acidification seront toujours supérieures à celles que l'on pourrait déterminer par acidification artificielle du fourrage vert par cet acide.

Il est clair maintenant que l'augmentation du pouvoir tampon est due pour l'essentiel à la protéolyse d'origine végétale. Le seul moyen d'agir sur celle-ci réside dans une acidification forte et rapide. La voie biologique la plus intéressante consiste à favoriser une fermentation lactique aussi intense que possible en lui réservant le maximum de glucides. Ceci implique un fort tassement qui bloque la respiration de la

plante et l'inhibition de groupes bactériens nuisibles comme ceux qui constituent la flore Gram négative (*Enterobacter*) (Bousset *et al.*, 1972). Un ensemencement avec des lactobacilles homofermentaires bien adaptés au fourrage s'implantant rapidement dès les premiers jours de la conservation et produisant très peu d'acide acétique pourrait apporter une solution à ce problème tout en assurant l'appétence optimum pour l'animal.

Reçu en avril 1977.

Accepté en juin 1977.

### Références

- BOUSSET J., BOUSSET-FATIANOFF N., GOUET Ph., CONTREPOIS M., 1972. Ensilages « gnotoxéniques » de fourrages. II-Catabolisme des glucides et métabolismes fermentaires dans les ensilages « gnotoxéniques » de luzerne, fétuque et ray-grass. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, **12**, 453-477.
- 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**, 407-418.
- GOUET Ph., CONTREPOIS M., BOUSSET J., BOUSSET-FATIANOFF N., 1972. Ensilage « gnotoxéniques » de fourrages. I-Etude cinétique du développement bactérien dans des ensilages « gnotoxéniques » de luzerne, fétuque et ray-grass. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, **12**, 159-172.
- GREENHILL W. L., 1964. The buffering capacity of pasture plants with special reference to ensilage. *Aust. J. Agric.*, **15**, 511-519.
- LANGSTON C. W., BOUMA C., 1960a. Types and sequence change of bacteria in orchard grass and alfalfa silages. *J. Dairy Sci.*, **43**, 1575-1584.
- Mc DONALD P., HENDERSON A. R., 1962. Buffering capacity of herbage samples as a factor in ensilage. *J. Sci. Fd. Agric.*, **13**, 395-400.
- PLAYNE M. J., Mc DONALD P., 1966. The buffering constituents of herbage and of silage. *J. Sci. Fd. Agric.*, **17**, 264-268.
- 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.
- SMITH L. H., 1962. Theoretical carbohydrate requirement for alfalfa silage production. *Agron. J.*, **54**, 291.
- WILSON J. K., 1935. The neutralizing power forage crops for organic and mineral acids. *J. Dairy Sci.*, **18**, 407-418.