

801 58 108

CENTRE DE RECHERCHES AGRONOMIQUES DES ANTILLES ET DE LA GUYANE

Station de Recherches Zootechniques
Domaine Duclos

97170 - PETIT BOURG (Guadeloupe)



STAGE EFFECTUE A L'INRA-CRAAG

du 3 Juin 1985 au 27 Septembre 1985

CONSERVATION PAR ENSILAGE DES FEUILLES ET STIPES

DE BANANIER

ASPECTS BIOCHIMIQUES ET MICROBIOLOGIQUES

Frantz MENCE

Université PARIS Val de Marne (Paris XII)

DESS de Productions Animales
et de Technologies agro-alimentaires
en régions chaudes



8629

CENTRE DE RECHERCHES AGRONOMIQUES DES ANTILLES ET DE LA GUYANE

Station de Recherches Zootechniques
Domaine Duclos

97170 - PETIT BOURG (Guadeloupe)

STAGE EFFECTUE A L'INRA-CRAAG

du 3 Juin 1985 au 27 Septembre 1985

CONSERVATION PAR ENSILAGE DES FEUILLES ET STIPES

DE BANANIER

ASPECTS BIOCHIMIQUES ET MICROBIOLOGIQUES

Frantz MENCE

Université PARIS Val de Marne (Paris XII)
DESS de Productions Animales
et de Technologies agro-alimentaires
en régions chaudes

- REMERCIEMENTS -

A mon responsable de stage :

Monsieur François GEOFFROY

Ingénieur I.N.R.A.

qui a permis et facilité la réalisation de cette étude, pour l'apport de ses connaissances. Qu'il trouve ici, le témoignage de ma gratitude.

A Monsieur Aubert PARFAIT

Directeur de la Station de Technologie

Chargé de Recherches

pour m'avoir accueillie au sein de la station dont il est le responsable pour avoir suivi mon travail

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à :

Madame Berthe GANOU-PARFAIT

Technicienne I.N.R.A.

pour l'intérêt qu'elle a témoigné envers ce sujet, pour son aide précieuse en bactériologie, pour sa perpétuelle disponibilité et les conseils nécessaires à la poursuite de ce travail.

Qu'elle soit assurée de ma sympathie.

A Monsieur Alain XANDE

Chargé de Recherches I.N.R.A.

pour l'apport de ses connaissances sur les fourrages tropicaux, pour le suivi et les conseils indispensables à la rédaction de ce mémoire.

Qu'il reçoive mes sincères remerciements.

A Madame Maryse BOUCARD

Secrétaire

qui m'a permis de présenter ce rapport dactylographié

A tous les techniciens de l'animalerie et du laboratoire d'analyses, au personnel des stations de Zootechnie et de Technologie pour l'accueil sympathique qu'ils m'ont toujours réservé, pour leur aide et leur bonne humeur.

Mes sincères remerciements !

SOMMAIRE

INTRODUCTION

I) ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. PRINCIPALES ETAPES DE L'ENSILAGE

I.1.1. Phase respiratoire : action des enzymes de la plante

I.1.2. Phase fermentaire et aspect microbiologique

I.1.3. Influence des facteurs du milieu

I.1.3.1. Facteur externes

I.1.3.2. Facteurs internes

I.1.4. Phase post-fermentaire : ouverture du silo

I.2. APPRECIATION DE LA QUALITE DE CONSERVATION DU FOURRAGE

I.3. LES PERTES A L'ENSILAGE

I.4. TECHNIQUES D'AMELIORATION DE LA QUALITE DE LA CONSERVATION :
UTILISATION DES CONSERVATEURS

I.4.1. Emploi d'adjuvants

I.4.2. Le préfanage

I.5. LES ENSILAGES TROPICAUX

II) ETUDE EXPERIMENTALE

II.1. PLAN EXPERIMENTAL

II.1.1. Le matériel végétal

II.1.2. Le matériel technique

II.1.3. Les traitements

II.1.4. Les mesures

II.1.4.1. Aspects "conservation"

II.1.4.2. Aspects "microbiologique"

II.2. METHODES ANALYTIQUES

II.2.1. Analyse chimique

II.2.2. Analyse microbiologique

II.2.2.1. Expérience 1 : détection de germes anaérobies à pH acide (< 4)

II.2.2.2. Expérience 2 : estimation de l'activité bactérienne globale du fourrage conservé

III) RESULTATS

III.1. ETUDE DE LA PLANTE ENTIERE ENSILEE DURANT UNE SEMAINE

III.1.1. Composition chimique du matériel utilisé

III.1.2. Bilan de conservation

III.1.2.1. Les pertes en Matière Sèche

III.1.2.2. Les caractéristiques fermentaires

III.2. ETUDE DES FOURRAGES DESILES A 30 ET 60 J :

III.2.1. Composition chimique du matériel utilisé

III.2.2. Bilan de conservation

III.2.2.1. Les pertes en Matière Sèche

III.2.2.2. Les caractéristiques fermentaires

III.3. ASPECTS MICROBIOLOGIQUES

III.3.1. Estimation de l'activité bactérienne globale des fourrages traités à l'ensipron et desilés à 30j et 60 j.

III.3.2. Test d'activité de germes anaérobies à pH < 4 sur fourrage plante entière traité à l'ensipron et désilé à 60 j.

IV) DISCUSSION

IV.1. ETUDE DE LA PLANTE ENTIERE ENSILEE DURANT UNE SEMAINE

IV.1.1. Composition chimique du matériel utilisé

IV.1.2. Bilan de conservation

IV.1.2.1. Les pertes en Matière Sèche

IV.1.2.2. Caractéristiques fermentaires

IV.2. ETUDE DES FOURRAGES DESILES A 30 ET 60 J

IV.2.1. Composition chimique du matériel utilisé

IV.2.2. Bilan de conservation

IV.2.2.1. Les pertes en Matière Sèche

IV.2.2.2. Les caractéristiques fermentaires

IV.3. ASPECTS MICROBIOLOGIQUES

IV.3.1. Estimation de l'activité bactérienne globale des fourrages traités à l'ensipron et desilés à 30j et 60 j.

IV.3.2. Test d'activité de germes anaérobies à pH < 4 sur fourrage plante entière traité à l'ensipron et desilé à 60 j.

CONCLUSION

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les techniques de conservation des fourrages s'avèrent essentielles dans les pays à saison sèche marquée puisqu'elles contribuent à combler le déficit fourrager qui accompagne cette période de pénurie alimentaire. De ce fait, elles occupent une place importante au sein du monde agricole tropical et l'intérêt pour l'agriculteur réside dans le choix de la technique la plus simple à mettre en oeuvre, la moins onéreuse et bien sûr la moins dépendante des conditions climatiques. Parmi les plus classiques, on retrouve : la fenaison, la ventilation en grange, l'ensilage, la déshydratation et de gros espoirs ont été fondés sur les espèces fourragères résistant à la sécheresse et suffisamment productives pour permettre la constitution de réserves sur pied utilisables durant cette période creuse. Selon A. XANDE (1978), cette dernière technique serait valable pour des carêmes courts mais nettement insuffisante pour de longues périodes de sécheresse (6 à 7 mois). De toutes ces méthodes de conservation, l'ensilage qui est un processus de stockage par voie fermentaire anaérobie de l'excédent fourrager de la saison des pluies, semble répondre le mieux aux besoins de l'agriculteur.

En effet, il a le gros avantage d'être facilement mécanisable et réalisable (MICHALET-DOREAU 1977) ; de pouvoir être conçu à l'échelle de petits et moyens élevages, ceci d'autant plus que les fourrages tropicaux offrent de bonnes possibilités d'intensification fourragère (in XANDE, 1978), et surtout d'être peu onéreux.

Cependant, cette technique parfaitement maîtrisée dans les régions tempérées, l'est encore mal en pays tropicaux. Ce peu d'intérêt sous les tropiques s'explique également par la faible valeur nutritive des fourrages tropicaux et par les essais d'ensilage infructueux qui ont été réalisés (CELANIE 1982).

L'étude présente, outre l'évaluation biochimique des principaux produits rencontrés dans le fourrage ensilé, porte l'accent sur la recherche de l'existence à pH acide (< 4) de bactéries anaérobies responsables de la dégradation dudit fourrage.

Au rappel des travaux déjà effectués sur cette technique de conservation fera suite la méthodologie et la réalisation pratique mises en oeuvre et enfin, dans une discussion, nous tenterons de faire un parallèle entre les résultats biochimiques et les résultats microbiologiques.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I) ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE :

I.1. - PRINCIPALES ETAPES DE L'ENSILAGE

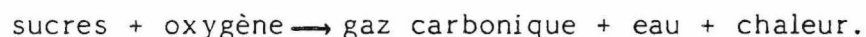
L'ensilage est un processus de fermentation anaérobie visant à conserver les fourrages verts ou d'autres aliments à l'état humide; avec le minimum de pertes de matière sèche et de valeur nutritive, sans formation de produits de fermentation dangereux pour la santé des animaux (MICHALET -DOREAU, 1977).

Pour cela les microorganismes préexistant sur la plante en particulier les bactéries lactiques doivent former très rapidement au détriment des sucres contenus dans la plante une quantité d'acide lactique entraînant une acidification du fourrage permettant ainsi une conservation prolongée sous un état stable (in DEMARQUILLY, 1973 ; A. XANDE, 1978).

Classiquement, on distingue trois phases dans la dynamique de l'ensilage dont la première est le fait des enzymes du fourrage, la deuxième est typiquement microbiologique et la troisième prend place à l'ouverture du silo. Il est à noter que les deux premières phases se déroulent durant la période de stockage.

I.1.1) Phase respiratoire : action des enzymes de la plante

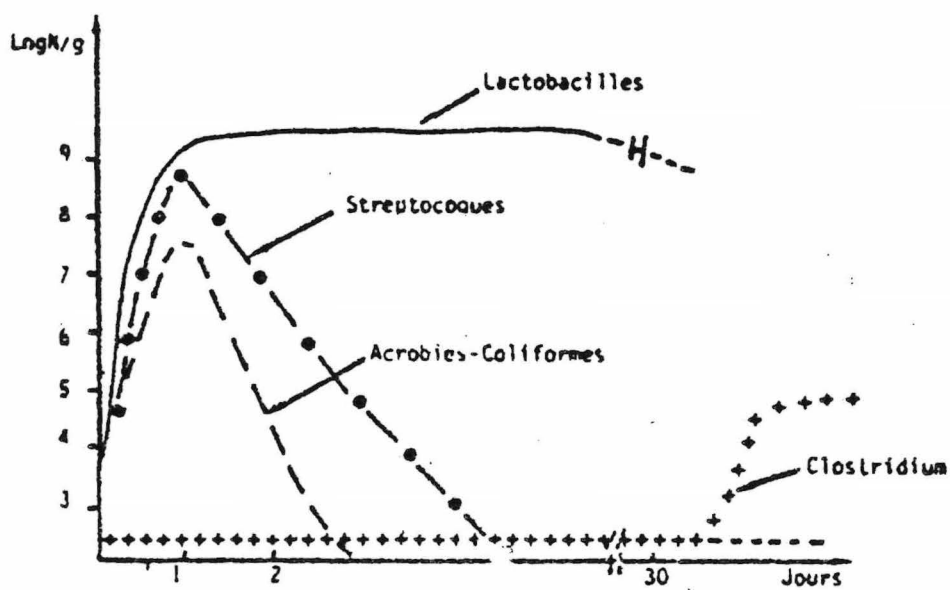
Le fourrage introduit dans un silo respire encore et les cellules de la plante continuent à utiliser l'oxygène de l'air disponible selon la réaction :



La respiration, outre la perte de matière sèche et l'augmentation de température s'accompagne d'une diminution de la quantité de sucres ; sucres nécessaires au développement microbien ultérieur, ainsi que d'une consommation d'oxygène qui entraîne l'établissement de l'anaérobiose, porte ouverte au démarrage de l'étape fermentaire. Cet oxygène provient de la masse d'air emprisonnée dans le fourrage ensilé, il faut donc pour limiter

Figure 1 : d'après GOUET 1979, I)

EVOLUTION CINETIQUE DES PRINCIPAUX GROUPES BACTERIENS DANS LES ENSILAGES.



ce catabolisme des sucres, tasser au maximum le fourrage dans le silo, remplir et fermer le plus rapidement possible. Le tassement a pour effet de chasser l'air emprisonné dans le silo et surtout d'empêcher à la fois son renouvellement. C. DEMARQUILLY (1973) a montré qu'en silos très étanches ou mieux hermétiques, l'air est totalement épuisé de son oxygène en 5 ou 6 h pour un ensilage de maïs ou de luzerne refermé dès la fin du remplissage du silo et en 72 h seulement si, pour ces mêmes ensilages, la fermeture est retardée de 48 h.

Simultanément à cette phase respiratoire, les glucides sont rapidement hydrolysés en leurs monomères, le glucose et le fructose qui constituent les principales sources d'énergie des micro-organismes.

En parallèle, s'installe également sous l'action des enzymes de la plante (HUNTER, 1921 in Mc DONALD 1981) une protéolyse intense des constituants azotés du végétal jusqu'au stade acides aminés, peptides et même amides (BRADY in Mc DONALD, 1981).

KEMBLE et Mc PHERSON montrèrent en outre que le taux d'azote non protéique pouvait augmenter de 20 à 50 % en 3 à 5 jours (in Mc DONALD, 1981). Cette protéolyse beaucoup plus lente que l'hydrolyse des glucides ne s'arrête que quand le pH est inférieur à 4,3 (Mc PHERSON in Mc DONALD, 1981).

I.1.2) Phase fermentaire et aspect microbiologique :

Elle fait suite à la phase respiratoire surtout après épuisement du milieu en oxygène. A cet instant, la plasmolyse engendre une libération des sucs cellulaires favorable au développement des microorganismes présents sur le fourrage vert. On assiste alors à une succession de genres bactériens selon les conditions de milieu. En effet, au départ la grande majorité de ces germes est représentée par des bactéries aérobies strictes qui ne contribuent pas à la conservation de l'ensilage. Du fait de l'appauvrissement du milieu en O_2 , elles disparaissent progressivement au profit d'une flore aérobie facultative et anaérobie. (cf. figure ci-contre).

a) Les bactéries coliformes, aérobies facultatives que sont les bactéries acétiques sont les premières à se développer. Elles transforment les sucres en acide acétique surtout mais aussi en alcool, en acide

lactique et en gaz carbonique. Elles contribuent donc à un début d'acidification de l'ensilage mais avec un rendement assez faible. Elles s'attaquent aussi aux acides aminés qu'elles transforment en NH_3 et en amines. Leur action généralement limitée dans le temps est stoppée dès que le pH est inférieur à 4,5 par suite de l'acidification rapide due au développement simultané des bactéries lactiques (DEMARQUILLY, 1973).

La réussite ou non de l'ensilage dépend de l'activité de deux genres bactériens principaux : les bactéries lactiques (*Lactobacillus*) et les bactéries butyriques (*Clostridies*).

Si la fermentation lactique est suffisante, on assiste à une baisse rapide du pH et aussi à un état stable de conservation du fourrage, généralement obtenu à pH 4 en régions tempérées. Mais au cours de cette phase critique, des bactéries butyriques peuvent se développer et transformer les sucres résiduels et l'acide lactique formé en acide butyrique. Ces bactéries ont également une action protéolytique et dégradent les acides aminés en ammoniac et en amines.

b) Les bactéries lactiques appartiennent au groupe des bactéries Gram +, non sporulées, strictement anaérobies. Elles sont présentes sur le fourrage frais en quantité fort variable (10^5 à 10^6 par gramme de fourrage frais (in CELANIE 1982).

Leur activité dépend de l'absence totale d'oxygène dans le silo et de la présence de sucres libérables rapidement en quantité suffisante. Elles sont de deux sortes utilisant des voies métaboliques différentes (PETER. MC. DONALD, 1981) :

- les bactéries homofermentaires :

1 glucose ou 1 fructose $\rightarrow$ 2 acides lactiques

1 pentose $\rightarrow$ 1 acide lactique + 1 acide acétique

- les bactéries hétérofermentaires :

1 glucose $\rightarrow$ 1 acide lactique + 1 éthanol + 1 CO_2

3 fructose $\rightarrow$ 1 acide lactique + 2 mannitol + 1 acide acétique + 1 CO_2

1 pentose $\rightarrow$ 1 acide lactique + 1 acide acétique

Le taux de production d'acide lactique est inférieure avec les hétérofermentaires et varie suivant la proportion respective de glucose et de fructose (MICHALET -DOREAU, 1977)

Récemment BECK démontra les changements qualitatifs de lactobacillus survenant durant la fermentation : au début, l'acidification est assurée par les homofermentaires et quatre jours après l'ensilage 85 % de lactobacillus présents étaient des espèces hétérofermentaires (BECK, in Mc DONALD, 1981).

c) Les bactéries butyriques : Il s'agit d'une flore anaérobie qui se présente sous forme de spores apportées essentiellement par la terre, qui doivent germer avant d'entrer en activité. Leur développement démarre donc toujours après celui de la flore lactique.

Ces bactéries utilisent les sucres résiduels et l'acide lactique selon deux modes (Mc DONALD, 1981) :

- sucres résiduels et acide lactique $\rightarrow$ acide butyrique + acide acétique + gaz carbonique.

- 2 acides lactiques $\rightarrow$ acide butyrique + 2 CO₂ + 2 H₂.

En outre ces microorganismes s'attaquent aux acides aminés (DEMARQUILLY, 1973) selon :

- acides aminés $\rightarrow$ ammoniac, acide acétique, propionique, isobutyrique + Gaz carbonique.

- acides aminés $\rightarrow$ amines (histamine, putrécine, cadavérine...)

Il s'agit alors d'une véritable putréfaction qui conduit à une instabilité de l'ensilage. Toutefois le devenir de ce dernier est difficile à prévoir dans la mesure où interviennent un grand nombre de facteurs jouant un rôle très important dans le processus de fermentation et que nous allons envisager.

I.1.3) Influence des facteurs du milieu :

Les facteurs intervenant dans l'orientation des fermentations se classent en facteurs internes liés à la plante et en facteurs externes liés au milieu.

1.1.3.1.) Facteurs externes :

* $\frac{1}{2}O_2$:

Il est très important d'atteindre et de maintenir des conditions anaérobies durant l'ensilage car c'est seulement sous ces conditions que peuvent proliférer les bactéries lactiques et dominer alors la fermentation.

Cependant, il est très rare en pratique de maintenir un tel environnement d'une part parce que les fourrages sont généralement trop humides, et que d'autre part les silos de ferme sont d'une taille telle qu'ils ne peuvent être remplis en une seule fois.

De plus, à la fermeture, il y a toujours un volume résiduel d'air emprisonné dans le fourrage ou une infiltration indésirable durant la période de stockage (Mc DONALD, 1981).

* la température :

La température de la masse ensilée a un effet direct sur la vitesse de croissance des microorganismes et un effet sélectif sur les espèces bactériennes. Cet aspect est particulièrement important car le développement des clostridium est optimum à une température de 37-39°C, tandis que celui des bactéries lactiques l'est à 30°C environ (CELANIE 1982).

L'élévation de température dans un silo a pour origine le processus de respiration qui s'y déroule, elle dépend donc de la masse d'air emprisonnée lors de la réalisation du silo et de la possibilité de renouvellement de cet air.

Généralement dans le silo hermétique, à une phase active au cours de laquelle la température augmente de quelques degrés succède une

phase de stabilisation au cours de laquelle la température s'abaisse lentement jusqu'à atteindre une valeur proche de la température ambiante (MICHALET DOREAU, 1977). En général, il faut éviter toute élévation de température car la quantité de sucres ultérieurement utilisables pour la fermentation lactique diminue (respiration) ; la température optimale de développement des clostridies est vite atteinte ; il y a un risque à température élevée (45-60°C) de diminution de la digestibilité des protéines et une perte importante en provitamine A.

L'effet de température est en outre d'autant plus sensible que la température externe sera plus élevée.

I.1.3.2) Facteurs internes :

* l'eau :

Les fourrages très riches en eau présentent des désavantages et conduisent à un ensilage de mauvaise valeur nutritive, vu la faible quantité de matière sèche qu'ils contiennent, ce qui favorise en outre le développement des clostridies.

En effet, ces microorganismes sont très sensibles à une teneur élevée en matière sèche et de plus, le pH critique qui inhibe leur développement varie directement avec le taux d'humidité du fourrage (Mc DONALD 1981).

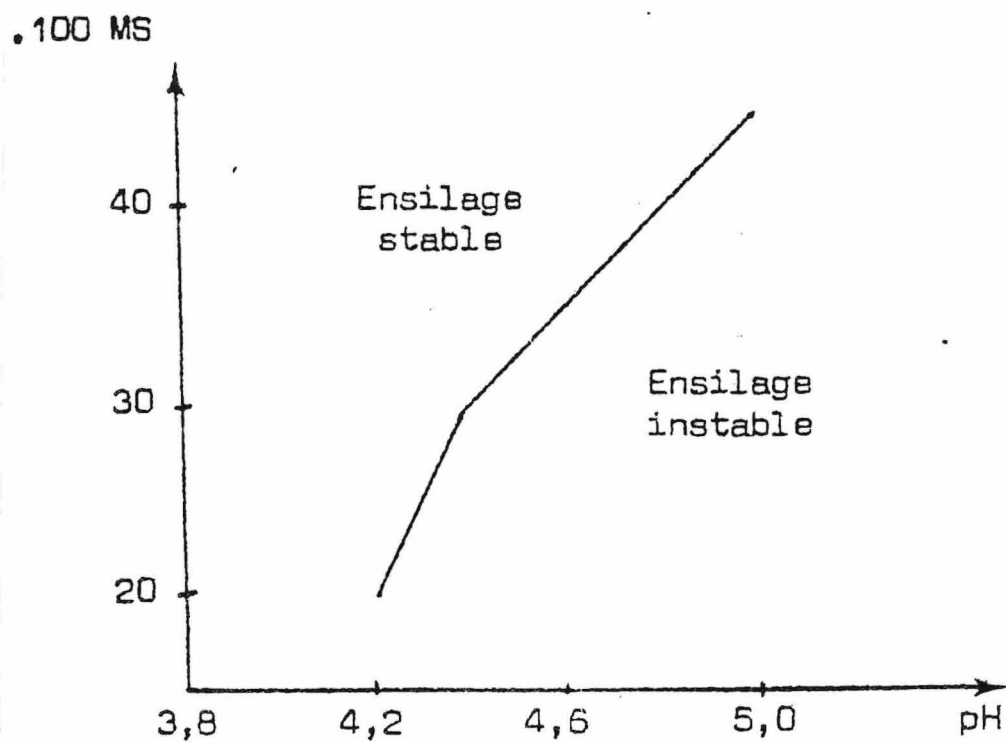
Sur un plan plus pratique, les ensilages de fourrages riches en eau produisent des effluents qui non seulement sont difficiles à éliminer mais entraînent avec eux des composés de haute valeur nutritive.

Enfin, ces types d'ensilages sont difficilement manipulables et transportables (Mc DONALD 1981). Le préfanage, quand il peut être réalisé permet d'y remédier.

* Teneur en MS :

Le pH critique qui bloque le développement des clostridies est d'autant plus élevé que la teneur en matière sèche l'est aussi. Donc

Graphique 2 : INFLUENCE DE LA TENEUR EN M.S. SUR LE pH INHIBANT
LA CROISSANCE DES BACTERIES BUTYRIQUES
(WIERINGA, 1969)



toute élévation de cette teneur en matière sèche freine plus le développement des bactéries butyriques que lactiques surtout qu'elle a également pour conséquence d'augmenter la pression osmotique du milieu or les bactéries butyriques y sont plus sensibles que les bactéries lactiques (MICHALET - DOREAU 1977) (fig. 2 ci-contre).

* Teneur en glucides solubles :

Leur teneur et leur disponibilité favorise la croissance bactérienne, en particulier celle des bactéries lactiques. Cette teneur est très variable selon l'espèce, le stade physiologique et les conditions de la récolte. Les fourrages tropicaux ont classiquement 3 à 6 % de la MS en glucides solubles (F. GEOFFROY 1980). Ces glucides donnent naissance au cours des fermentations à l'acide lactique, aux acides gras volatils et aux alcools. Leur concentration est le facteur limitant de l'abaissement du pH puisqu'étant le facteur limitant de la croissance des bactéries homofermentaires. Selon DEMARQUILLY (1973) pour avoir une bonne acidification, il faut 10 à 12 % de la MS en glucides.

* Pouvoir tampon :

Il est significatif de la résistance de la plante à l'acidification. Celle-ci est d'autant plus rapide que le pouvoir tampon sera faible et la quantité de glucides nécessaires à la stabilisation du fourrage en sera d'autant abaissée.

Ce pouvoir tampon dépend de la teneur en matières azotées, en acides organiques et en minéraux. Il n'a pas été souvent mesuré et intervient sur l'intensité des fermentations par accroissement au cours de la conservation. Il peut atteindre 2 à 4 fois celui de la plante à la mise en silo (PLAYE, GREENHILL et BOUSSET in CELANIE, 1982).

I.1.4) Phase post-fermentaire : ouverture du silo

Lors de l'ouverture du silo, l'ensilage entre en contact avec l'oxygène et les réactions générales se résument comme suit (CELANIE, 1982) :

a) un développement des moisissures :

sucres + $O_2 \rightarrow CO_2 + H_2O + \text{chaleur} + \text{acides organiques organique}$

b) un développement des levures :

sucres $\rightarrow 2 \text{ éthanol} + CO_2$.

acide lactique + $O_2 \rightarrow \text{acide acétique} + CO_2 + H_2O$.

La détérioration aérobie est indésirable car associée à une perte en éléments de haute valeur nutritive. La meilleure prévention contre cette dégradation post-fermentaire est de s'assurer que l'animal consomme le fourrage le jour même du désilage.

I.2) APPRECIATION DE LA QUALITE DE LA CONSERVATION DU FOURRAGE:

Les caractéristiques fermentaires des ensilages (pH, pourcentage d'azote dégradé en ammoniac, teneur en acides organiques et en alcools) rendent compte des modifications chimiques subies par le fourrage au cours du processus de conservation. Un ensilage stable se caractérise par une teneur en acide acétique souvent relativement faible (inférieure ou au plus égal à 20-25g/kg de M.S) ; une ammoniogenèse réduite ($N-NH_3$ d'environ 5 % de l'azote total et N soluble inférieur ou égal à 50 % de l'azote total) ; peu ou pas d'acide butyrique et un pH relativement bas (≤ 4).

L'analyse fermentaire a pour objectifs principaux :

- d'abord connaître la qualité de conservation et, en particulier savoir si les techniques mises en oeuvre pour conserver le fourrage ont été suffisantes pour permettre une acidification de la masse sans évolution ultérieure.

- Juger la valeur azotée du fourrage, son ingestibilité et savoir s'il peut être distribué aux animaux.

- connaître la proportion d' $N-NH_3$ dans N total.

En effet, lorsque les bactéries butyriques se développent, cette proportion augmente et constitue un très bon indice pour juger de la qualité de conservation de l'ensilage. D'après DEMARQUILLY et DULPHY (1979) dans un ensilage sans acide butyrique la proportion d' $\text{N-NH}_3/\text{N}$ total est inférieure à 5-7 %.

A partir de ces critères biochimiques a été mis au point un barème d'appréciation de la qualité des ensilages en 5 classes lesquelles sont délimitées selon les teneurs en acides gras volatils et en N-NH_3 % N du total de l'ensilage.

Dans ce barème, on n'utilise pas la teneur en acide lactique. Cette teneur donne une indication intéressante sur l'orientation des fermentations au cours de l'ensilage mais ne permet pas d'apprécier la qualité de conservation de l'ensilage.

1.3) LES PERTES A L'ENSILAGE :

Elles sont de trois types :

- 1) gaz
- 2) jus
- 3) inconsommable

Les pertes de matière sèche en cours de conservation varient, selon B. MICHALET - DOREAU (1977) de 15 à 30 % en fonction de la teneur en matière sèche initiale du fourrage.

Les pertes en inconsommable et en jus peuvent être mesurées directement en pesant ces différentes fractions mais la mesure des gaz est difficilement réalisable.

* les pertes par les gaz :

Les gaz émis sont principalement le CO_2 , le NH_3 et leurs pertes peuvent être appréciées à partir des réactions biochimiques qui ont lieu au cours de la respiration, de la fermentation, et de la phase post-

fermentaire.

Selon B. MICHALET - DOREAU (1977) c'est au cours du premier mois de la conservation que la perte par dégagement gazeux est la plus forte. Elle est d'autant plus élevée que le silo n'est pas étanche car la partie de l'ensilage en contact avec l'air extérieur se dégradera continuellement. MAC DONALD (1973 in CELANIE 1982) estime qu'au cours de la phase respiratoire, les pertes de gaz exprimées en matière sèche sont de 0,27 % de la matière sèche ensilée.

Au cours de la fermentation anaérobie, elles seraient de l'ordre de 5 %.

Après l'ouverture du silo, à la reprise des fermentations elles se situeraient entre 2 et 3 %.

La dégradation est alors due aux moisissures mais surtout aux levures ; elle est particulièrement importante dans les ensilages peu fermentés ayant conservé une teneur élevée en sucres. (B. MICHALET -DOREAU 1977).

D'une manière générale, les pertes totales en gaz peuvent varier entre 5 et 10 % de la matière sèche ensilée et se mesurent en soustrayant des pertes totales, les pertes sous forme de jus ou d'inconsommable.

* les pertes de parties inconsommables :

Elles sont extrêmement variables, de 0 à 20 % et sont liées à la présence d'oxygène dans le silo (B. MICHALET - DOREAU, 1977). Elles dépendent donc essentiellement du type de silo employé, de l'importance du tassement, de la qualité du film plastique et de la façon dont il est posé...

* les pertes de jus :

Elles ont lieu, elles aussi principalement, en début de conservation (DULPHY in B. MICHALET - DOREAU, 1977).

Les jus contiennent beaucoup de minéraux, de glucides solubles, de l'azote et des acides issus des fermentations et en moyenne, 75 % des pertes sous forme de jus ont lieu au cours des trois premières semaines après la mise en silo. Puis, par effet de tassement, pratiquement plus rien ne s'écoule. Mc DONALD (1981) estime que les pertes en matière sèche dans des effluents d'ensilage de mauvaise herbe et de trèfle varient entre 0 et 14 % avec une valeur moyenne de 5,3 %. Ces pertes de jus dépendent principalement de la teneur en matière sèche du fourrage vert, mais elles varient aussi en fonction du type de silo utilisé.

I.4) TECHNIQUES D'AMELIORATION DE LA QUALITE DE LA CONSERVATION : UTILISATION DES CONSERVATEURS :

Bien souvent la fermentation lactique naturelle dans le silo n'est pas suffisante pour réussir un ensilage, surtout si les fourrages sont riches en eau et pauvres en glucides solubles (cas de la majorité des fourrages tropicaux). Il faut alors recourir au préfanage et (ou) employer un conservateur.

I.4.1) Emploi d'adjuvants :

Le principal objectif visé dans l'emploi d'additifs à l'ensilage est d'assurer la prédominance de la flore lactique lors de la fermentation, laquelle conditionne une bonne conservation à l'ensilage. Mais avant qu'un adjuvant ne soit accepté en vue d'un emploi commercial, il doit être prouvé qu'il n'est pas toxique pour les animaux et qu'en particulier il ne doit pas avoir d'effets défavorables sur la fermentation du rumen.

De plus, les recommandations sur l'utilisation d'un additif d'ensilage doivent être basées non seulement sur les résultats des recherches scientifiques mais aussi sur les critères économiques (Mc DONALD, 1981).

D'une manière générale, les conservateurs pour ensilage sont classés en trois catégories suivant leur mode d'action, mais certains produits peuvent combiner plusieurs de ces actions :

* les conservateurs acides :

Ils bloquent les fermentations en abaissant le pH et ont aussi pour but d'arrêter l'hydrolyse des sucres et des protéines. Le plus utilisé de nos jours est l'acide formique/formol. Il a des effets bénéfiques sur la qualité de conservation des ensilages et par là, sur leur ingestibilité et les performances des animaux recevant ces ensilages. Ce sont les conservateurs de loin, les plus utilisés actuellement.

* les stimulants de la fermentation lactique :

Ce sont des produits riches en sucres fermentescibles comme les mélasses (50 % glucides solubles), le lactosérum, les céréales (enrichies en amylase) les drèches de brasserie (existence de glucides) qui sont mélangés au fourrage à la mise en silo et servent alors de substrat à la fermentation lactique. L'acide lactique en quoi ils sont transformés abaisse suffisamment le pH pour empêcher les fermentations nuisibles comme les fermentations butyriques et putrides.

Actuellement, une attention particulière est portée à l'inoculation par des bactéries lactiques homofermentaires (CELANIE, 1982). Cette technique permet de limiter les quantités d'alcool et d'acide acétique produites, d'acidifier rapidement et intensivement le milieu et de limiter de façon importante la protéolyse.

* les bactériostatiques :

Ce sont des produits qui ont pour but d'améliorer la qualité de conservation en réduisant ou en empêchant les fermentations nuisibles autrement qu'en abaissant le pH. Des bactériostatiques ont été utilisés pour inhiber plus particulièrement l'activité indésirable des clostridium. Ce sont par exemple le chlorure de sodium, le gaz sulfureux, le métabi-sulfite de soude.

I.4.2) Le préfanage :

Il a pour effet de concentrer les constituants solubles et de

provoquer ainsi une augmentation de la pression osmotique. Or, les bactéries butyriques sont très sensibles aux variations de pression osmotique.

Ainsi lorsque la teneur en matière sèche augmente, la quantité d'acide lactique nécessaire pour inhiber la fermentation butyrique diminue et l'ensilage peut être stable pour des pH supérieurs à 4. Selon DEMARQUILLY (1973), le préfanage est vraiment efficace que s'il amène le fourrage à 30-35 % de matière sèche, ce qui n'est pas toujours possible. Cette teneur en MS est nécessaire pour que les bactéries butyriques ne se développent pas ou peu.

1.5) LES ENSILAGES TROPICAUX :

La dynamique des ensilages tropicaux n'est pas encore pleinement élucidée. Les fourrages tropicaux présentent en effet des caractéristiques biologiques assez différentes de celles des fourrages tempérés.

Ainsi leur teneur en glucides solubles sont généralement faibles (3 à 9 % de la MS contre 16 à 30 % de la MS pour les fourrages tempérés).

Les teneurs en cellulose et hémicellulose sont élevées (28-40 %) tandis que les teneurs en matières azotées ne dépassent guère 12 % de matière sèche. Ce fourrage présente donc des caractéristiques particulières et sa valeur alimentaire décroît assez rapidement avec l'âge (CELANIE, 1982).

Au niveau des ensilages de tels fourrages, certains auteurs pensent que leur stabilisation serait due principalement à une production importante d'acide acétique et non d'acide lactique comme en zone tempérée (CATCHPOOLE (1968) et AGUILERA (1975) in CELANIE 1982).

Selon MILLER (1968) (in CELANIE 1982) la déficience en glucides solubles, un pouvoir tampon élevé et la structure ligneuse des fourrages tropicaux entraînant un retard dans la libération du contenu cellulaire, établiraient des conditions défavorables à la fermentation lactique. Dans ces conditions les clostridies prolifèrent, d'où une production importante d'acide butyrique et une dégradation des protéines, ce qui semble être une caractéristique des ensilages tropicaux.

D'ailleurs, une étude récente réalisée sur de tels ensilages a montré que la teneur en acide lactique évolue avec la durée de conservation et passe par un maximum 60 jours après la réalisation de l'ensilage puis décroît. Parallèlement, le taux d'acide butyrique augmente ce qui laisse supposer que la phase lactique serait suivie d'une phase butyrique entraînant la dégradation d'acide lactique (ARCHIMEDE, 1984).

ARCHIMEDE démontre également que quel que soit le fourrage et le traitement appliqué, l'acide acétique est l'acide gras volatil présent aux taux les plus élevés. Cette augmentation régulière de la teneur en acide acétique évolue avec la durée de conservation. Cette constatation rejoint l'idée de CATCHPOOLE et de AGUILERA énoncée précédemment.

Une étude des conservateurs d'ensilage en milieu tropical, réalisée par ARCHIMEDE révèle que le classement par ordre décroissant d'efficacité des produits étudiés s'établit comme suit :

- mélasse
- ensipron (acide formique/formol)
- AIV (7 volumes de HCl + 1 volume de H_2SO_4)
- proteinor (ferments lactiques)

CELANIE (1982) travaillant sur sorgho et Pangola ensilés sans conservateur observe une similitude du processus de conservation par la voie lactique en milieu tropical par rapport au milieu tempéré. Ses travaux mettent l'accent sur l'importance du facteur température ambiante chaude sur l'accélération des phénomènes d'où une disponibilité immédiate en glucides solubles primordiale.

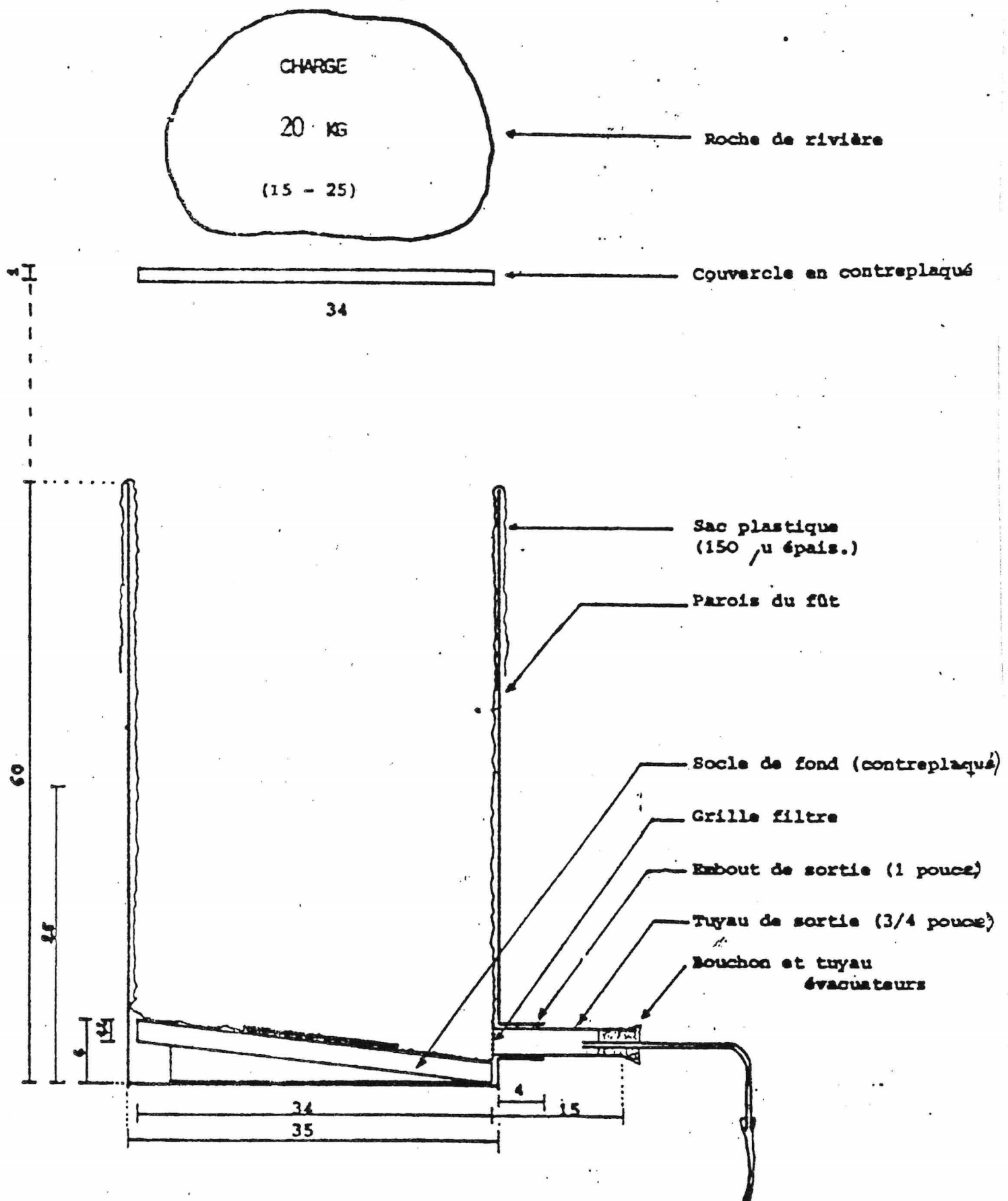
L'existence à $pH < 4$ de bactéries encore actives et détériorant le fourrage est un facteur important à prendre en compte dans le problème de stabilisation des fourrages tropicaux, ainsi l'étude présente a pour objectif principal de confirmer leur présence et d'évaluer leur activité à de tels pH.

ETUDE EXPERIMENTALE

COMPOSITION CHIMIQUE DES FEUILLES, STIPES ET PLANTE ENTIERE
 "RECONSTITUEE" DU BANANIER VARIETE "FIGUE POMME"

ORGANES COMPOSES	FEUILLES	STIPES	PLANTE ENTIERE
MS (% du produit frais)	20	9,6	11,5
Glucides solubles (g/l de jus d'écoulement)	-	21	16
MO (% de MS)	91	90,5	90,6
MAT (% de MS)	9,15	3	4,6

FIG. : SCHEMA DU MINI. SILO UTILISÉ.



II) ETUDE EXPERIMENTALE :

II.1. - PLAN EXPERIMENTAL

II.1.1) Le matériel végétal

L'ensilage réalisé a pour objectif de valoriser les déchets de banane. Nous avons donc travaillé sur des feuilles et des stipes de bananier ainsi que sur la plante entière reconstituée selon les proportions de feuilles et stipes d'un plant. Il s'agit d'organes, récoltés après coupe d'un régime sur la variété dénommée localement "Figue Pomme". Leur composition chimique se retrouve dans le tableau ci-contre.

D'une manière générale, quel que soit la variété, le bananier se caractérise par une faible teneur en MS (12 à 15% du poids frais pour la plante entière d'après F. GEOFFROY, 1980). Cependant, la matière sèche varie d'un organe à l'autre ; en effet, celle des stipes, généralement gorgés d'eau, est très faible et s'évalue à 7,6% tandis que celle des feuilles avoisine les 20%.

Les relevés bibliographiques effectués sur la variété "Poyo" par F. GEOFFROY et collaborateurs (1980) révèlent des teneurs en matières minérales des feuilles et stipes d'environ 11% de la MS en moyenne, en MAT de 8 à 12% de la MS en ce qui concerne les feuilles et de 1,5 à 3,5% pour les stipes. Selon ces mêmes auteurs une fraction importante des matières azotées totales (20 à 30%) du stipe est sous forme d'azote soluble, cependant elle est beaucoup plus faible dans les feuilles (9% de l'azote total).

II.1.2) Le matériel technique

* Les silos : Fûts en tôle d'une capacité de 60 litres munis à la base d'un dispositif de drainage pour récupérer le jus d'écoulement (cf. schéma ci-contre).

SCHEMA EXPERIMENTAL

(1)

JOURS TRAITEMENTS	J + 2	J + 4	J + 8
SANS CONSERVATEUR	+	+	+
ENSIPRON (3,5‰)	+	+	+
MELASSE (25‰)	+	+	+

* Le hachage

Fourrage finement hâché à l'aide d'un hache paille à couteaux .

* La confection

Chaque silo est doublé d'un sachet plastique (type "sac poubelle") et rempli avec 30 kg de fourrage en ce qui concerne les stipes et la plante entière et avec 20 kg de fourrage pour les feuilles. Le fourrage finement hâché est introduit dans le silo et tassé aux pieds au fur et à mesure du remplissage.

Le sac est ensuite fermé hermétiquement et ficelé. Une charge d'environ 20 kg est appliquée sur chaque silo à la fermeture afin d'assurer un bon tassement. Sur la goulotte d'évacuation du jus d'écoulement située à la base du silo est fixé un sac plastique d'une contenance de 2 à 3 litres.

II.1.3) Les traitements

Deux types d'expériences ont été réalisées :

- * Expérience 1 : Cinétique d'évolution des caractéristiques fermentaires au cours de l'ensilage .
 - Matériel végétal : plante entière de bananier
 - Additif :
 - . Ensipron (conservateur acide à base d'acide formique (630 g/l) et d'aldéhyde formique (110 g/l utilisé au taux de 3,5%)
 - . Mélasse de canne à sucre au taux de 25%
 - . Absence de conservateur
 - Durée de l'expérience : une semaine
 - Désilages effectués à J+ 2, J+4 et J+8
 - Schéma expérimental (ci-contre)

- * Expérience 2 : Etude de différents ensilages à durée de conservation variable .

SCHEMA EXPERIMENTAL

(2)

FOURRAGES TRAITEMENTS	FEUILLES		STIPES		PLANTE ENTIERE	
	30 J	60 J	30 J	60 J	30 J	60 J
SANS CONSERVATEUR	++	++	++	++	++	++
ENSIPRON (3,5‰)	++	++	++	++	++	++

++ Une répétition de chaque traitement

- Matériel végétal : feuilles, stipes, plante entière de bananier
- Additif : sans conservateur (sur tous les traitements), ensipron 3,5‰ (sur tous les traitements), mélasse 25‰ (sur 120 j. uniquement)
- Désilages effectués à 30 et 60 jours
- Schéma expérimental 2 (ci-contre)

II.1.4) Les mesures

Deux aspects sont à envisager en ce qui concerne les mesures effectuées :

II.1.4.1) Aspects "conservation"

- Teneurs en matière sèche réalisées sur le produit frais et sur le produit conservé (MS non corrigée pour les pertes en composés volatils)
- Récolte du jus de pression d'un échantillon représentatif du fourrage ensilé pour analyses des caractéristiques fermentaires (pH, NH_3 , AGV, alcools, acide lactique) ou autres (azote soluble).
- Récupération du jus d'écoulement pour suivre l'évolution de sa teneur en glucides solubles.
- Bilan de conservation : évaluation des pertes par mesures du poids des fourrages ensilés et désilés.
- Prélèvement des produits frais et conservés pour mesure de la matière azotée totale
- Mesure des cendres et MAT sur produit sec et broyé
- Pesée du jus d'écoulement pour évaluation des pertes

La plupart de ces mesures se font au désilage.

II.1.4.2) Aspect "microbiologique"

- Cinétique d'activité bactérienne globale
- Test d'activité en fonction du pH

II.2.) METHODES ANALYTIQUES (annexe **V**)

II.2.1) Analyse chimique

* le pH

Il est mesuré, sur le jus obtenu par pression de l'échantillon frais désilé, à l'aide d'une électrode combinée.

* La Matière Sèche

Elle est déterminée après passage à l'étuve ventilée, à 80°C pendant 48 h, de 500 g d'échantillon frais. Elle s'exprime en pour 100 du poids frais.

* La matière organique

C'est la différence entre la matière sèche et les cendres obtenues après passage au four à 550°C pendant 6 heures d'environ 2 g d'échantillon sec broyé. Elle s'exprime en pour 100 de la matière sèche.

* Les Matières Azotées : MAT et N soluble.

Elles sont minéralisées par la méthode classique de KJELDHAL (1883) et dosées au technicon par colorimétrie avec le phénate alcalin à partir d'échantillons d'ensilage frais ou décongelés pour les matières azotées totales et à partir du jus de pression de ces échantillons pour l'azote soluble.

* Les glucides solubles

L'acide sulfurique concentré transforme à chaud, les glucides. Dans des conditions déterminées, les hexoses et leurs homologues supérieurs (cellodextrines) produisent des dérivés donnant une coloration verte avec l'anthrone. Cette coloration présente un maximum d'absorption à 625 nm et suit la loi de Beer-Lambert pour des concentrations comprises entre 30 et 120 μ g.



* Acide lactique

Il s'agit du dosage colorimétrique de BARKER (1957). L'acide lactique est dosé sur du jus de pression déféqué. Sa dégradation par l'acide sulfurique concentré, à chaud donne un acétaldéhyde qui, en présence de para-hydroxydiphényl donne une coloration violette dont la densité optique est mesurée à 560 nm. Les résultats sont exprimés en g/kg de MS.

* Acides Gras Volatils

Ils sont dosés sur le jus de pression filtré par chromatographie en phase gazeuse selon la méthode de OTTENSTEIN and BARTLEY (1971).

L'appareillage se compose de :

- D'un chromatographe GIRDEL 3000 équipé d'un détecteur à ionisation de flamme
- D'une colonne en verre Pyrex de 1,50 m de longueur et de diamètre intérieur de 4 mm. Le support de la phase stationnaire est le CHOMOSORB 60-80 mesh imprégné de SUPELCO SP 1200 10% + 1% de $H_3 PO_4$.

Les conditions d'utilisation de cet appareil sont les suivantes :

- Gaz vecteur : N_2 , débit 40 ml/min
- Hydrogène (détecteur) : H_2 , débit 40 ml/min
- Air (détecteur) : débit 400 ml/min
- Température : four 125°C ; détecteur 165°C ; Injecteur 150°C
- Volume injecté : 0,2 μ l

L'étalon interne est constitué d'une solution à 1 p.100 (P/V) de 2 éthyl-butérique. On en met 0,1 ml additionné à lcc d'échantillon.

Les résultats exprimés en g/kg de MS sont calculés automatiquement par un intégrateur calculeur ICAP 10.

* Azote ammoniacal

Il est dosé par la méthode de CONWAY (1950-57). L'ammoniac contenu dans le jus de pression sous forme de sulfate d'ammonium (le conservateur utilisé étant H_2SO_4) est déplacé par une solution de carbonate de potassium. Il est alors piégé dans de l'acide borique sous forme de sel que l'on dose par l'acide chlorhydrique (N/50). Les résultats sont exprimés en p.100 de l'azote total.

II.2.2) Analyse microbiologique

Elle vise à atteindre deux objectifs principaux :

- Mise en évidence à pH acide (2,5 ; 3 et 3,5) de la présence de germes encore actifs au sein de l'ensilage.

- Estimation de l'activité bactérienne globale de l'ensilage par le suivi de la cinétique d'évolution des produits de la fermentation.

Ces deux expériences menées en parallèle, reflètent la dynamique microbienne des fourrages tropicaux.

II.2.2.1) Expérience 1 : détection de germes anaérobies à pH acide (< 4)

Au désilage 25 g d'un échantillon représentatif du fourrage frais ou conservé de chaque organe sont prélevés de manière aseptique dans la masse puis sont mis à macérer dans un flacon contenant 250 cc de milieu nutritif de BRYANT et BURNEY (modifié par BERGERE), milieu adapté à l'isolement des clostridies butyriques. (cf. Annexe I).

C'est ce que nous désignerons par la suite sous le terme d'inoculum.

La flacon est alors placé dans une jarre de manière à créer une atmosphère anaérobie puis mis à incuber pendant 48 h à l'étuve à 37°C.

A chaque organe du bananier (feuille, stipe, plante entière) correspond trois erlens contenant chacun 100 cc du milieu de BRYANT et BURNEY à pH 2,5 ; 3 et 3,5 (ajustés à l'aide de H_2SO_4 concentré) et chaque erlen est ensemencé stérilement avec 2,5 cc de l'inoculum correspondant à l'organe considéré.

Placé dans la jarre, ils sont ensuite mis à incuber pendant 48 heures à l'étuve à 37°C.

Au bout des 48h, on procède à la lecture de ces erlens, qui se traduit par l'existence éventuelle d'un trouble bactérien ; et à une observation microscopique qui renseignera déjà sur la morphologie des germes ayant poussé à ces pH.

Ce trouble bactérien est alors prélevé et inoculé dans un milieu pour anaérobies (The Procaryotes vol.II - 1981 ; STARR-STOLP-TRUPER-BALOWS) enrichi en lactate et appauvri en hydrates de carbone (glucose), recréant ainsi artificiellement les conditions de l'ensilage. La modification du milieu consiste donc à ne mettre que 2 g de glucose au lieu de 15 g normalement et rajouter 15 g de lactate de sodium.(cf. Annexe II).

270 cc de ce milieu sont ensemencés par 30 cc de la solution bactérienne et l'on suit au cours du temps la production de NH_3 , acide lactique, AGV, ainsi que le pH. Une aliquote de cette suspension bactérienne est en parallèle prélevée en vue de réaliser un isolement de ces germes, à partir d'une gamme de dilution* s'étalant de 10^{-1} à 10^{-6} , suivi d'un début d'identification au moyen de galeries Api pour anaérobies (annexe IV).

II.2.2.2.) Expérience 2 : estimation de l'activité bactérienne globale du fourrage conservé.

Cette expérience, moins spécifique que la précédente, prend en compte la population microbienne du fourrage ensilé dans son ensemble.

30 cc de jus de pression de chacun des fourrages désilés sont mis en suspension dans 270 cc du milieu pour anaérobie cité précédemment.

* Annexe III pour composition du diluant

Cette suspension est alors placée à l'étuve à 37°C en anaérobie et toutes les trois heures, un prélèvement ponctuel de chaque solution est effectué et voué au dosage de NH_3 , d'AGV et d'acide lactique. Un suivi temporel du pH est également réalisé.

Selon les composés produits en majorité, on se fera une idée de la flore dominante au sein de l'ensilage et de sa dynamique.

RESULTATS

III) RESULTATS :

III.1. - ETUDE DE LA PLANTE ENTIERE ENSILEE DURANT UNE SEMAINE

III.1.1) Composition chimique du matériel utilisé

* La Matière Sèche

Les teneurs en MS du fourrage à l'ensilage sont de 12, 11,4 et 13,4% respectivement pour les traitements sans conservateur, avec ensipron et avec mélasse. Quel que soit le traitement, cette Matière Sèche augmente durant les deux premiers jours de conservation puis se stabilise. Cependant, une diminution de la teneur en MS est constatée pour la plante sans conservateur au quatrième jour de conservation (tableau 1). D'autres fourrages tropicaux (Sorgho, Pangola, Canne à sucre) ont des teneurs en MS, respectives de 16%, 16,5% et 32%.

* Les glucides solubles

Après une semaine de conservation, les glucides solubles de la plante ont quasiment disparu. Cette disparition est plus intense pour la plante mélassée que pour les deux autres traitements.

Avec l'ensipron, la diminution de la teneur en glucides solubles est brutale au cours des deux premiers jours de conservation et n'évolue plus à partir du quatrième jour (figure 1).

Les teneurs varient globalement de 30% de la MS à 1% de la MS. Les relevés bibliographiques notent des teneurs en glucides solubles de 30% pour la canne à sucre et 2% de la MS pour le Sorgho (CELANIE, 1982) ; 0,56%, 3,64% et 0,56% pour le stylosanthès, les feuilles d'ananas et le likoni A15 (ARCHIMEDE, 1984).

Dans le cas présent, la diminution de concentration est de 97% pour la plante mélassée contre 82% pour celle traitée à l'ensipron et 92,5% pour la plante ensilée seule (tableau 2).

* La Matière Organique

Le contenu en MO de la plante entière est assez élevé et ne varie pas de façon significative durant cette semaine de conservation (tableau 3).

Quel que soit le traitement, il n'y a pas d'évolution de la teneur en cendres tout au long du processus d'ensilage. ARCHIMEDE a relevé pour stylosanthès, feuilles d'ananas et likoni A15 des teneurs respectives en MO de 91,35% ; 92,11% et 90,68% de la MS. CELANIE (1982) lui, travaillant sur sorgho, pangola et canne à sucre trouve des teneurs respectives de 93,13% ; 90,25% et 97% de la MS.

* MAT et N soluble

Les teneurs en MAT ont tendance à diminuer jusqu'au 4ème jour de conservation. A J+8, elles remontent pour la plante entière sans conservateur et avec mélasse tandis qu'elles se stabilisent avec l'ensipron (tableau 4).

F. GEOFFROY (1980) a relevé une teneur en MAT de 11,4% de la MS pour les feuilles et de 3,5% de la MS pour les stipes de la variété "Poyo". Celles de la canne à sucre, du Pangola et du Sorgho s'évaluent respectivement à 2,5%, 12% et 11% de la MS. Avec la variété "Figue Pomme", nous avons observé une teneur moyenne de 4,3% pour l'organe plante entière (tableau 4). C'est donc un fourrage pauvre en MAT. D'ailleurs, l'azote soluble n'a été retrouvé qu'à l'état de traces.

III.1.2) Bilan de conservation

III.1.2.1) Les pertes en Matière Sèche

Les pertes sous la forme de jus et de gaz sont plus élevées pour le traitement à la mélasse ; l'ensipron conduisant aux pertes les plus faibles (figure 2). Après une semaine de conservation, elles varient entre 0,58 et 12% de la masse initiale ensilée suivant le traitement appliqué. Elles sont croissantes et tendent à se stabiliser dans le temps (tableau 5).

III.1.2.2) Les caractéristiques fermentaires

* Le pH

Le pH diminue brutalement dès le premier jour d'ensilage, puis a tendance à se stabiliser pour tous les traitements (figure 3).

Il varie de 6,15 à 3,7 lorsque la plante est ensilée seule ou avec de la mélasse (tableau 6). Traité à l'ensipron, le pH de départ est plus bas (pH = 5) et diminue pour atteindre la valeur de 3,8 au bout de 8 jours. Des pH du même ordre de grandeur sont enregistrés par ARCHIMEDE (1984) et CELANIE (1982) pour d'autres fourrages tropicaux.

* L'ammoniac

Jusqu'au 4ème jour d'ensilage, on constate une diminution de la teneur en NH_3 , qui se stabilise par la suite avec les traitements à l'ensipron.

En revanche, la teneur en NH_3 de la plante ensilée avec mélasse augmente à partir du quatrième jour de conservation (figure 4). Les teneurs en NH_3 sont plus élevées pour la plante mélassée que pour la plante ensilée seule. C'est avec le traitement à l'ensipron que l'on enregistre les valeurs les plus faibles (tableau 7). Ensilée seule, la plante entière produit de l'ammoniac jusqu'à J+4, dont la teneur diminue légèrement par la suite.

* L'acide lactique

Les teneurs en acide lactique augmentent régulièrement au cours du temps quel que soit le traitement appliqué (figure 5). Les courbes obtenues révèlent l'existence d'une intense fermentation lactique dans les premiers jours suivant la mise en silo.

En moyenne, les teneurs en acide lactique varient de 0 à 70 g/kg de matière sèche en une semaine. Elles sont plus faibles voire nulles avec le traitement acide et plus élevées avec le traitement à la mélasse la différence étant de 67 g/kg de MS au 8è jour de conservation (tableau 8).

CELANIE (1982) trouve à ce même jour de conservation des concentrations de 50 à 70 g/kg de MS pour le Pangola ; la production d'acide lactique reste faible pour la canne à sucre (valeur maximale de 48 g /kg de MS atteinte au 21^è jour d'ensilage) tandis que pour le sorgho la production de lactate est très importante (70 à 130 g/kg de MS au 3^{ème} jour de conservation).

* Les AGV

D'une manière générale, quel que soit le traitement appliqué, les valeurs obtenues sont faibles et l'on constate une production croissante d'AGV dans le temps (0,75 à 13,76 g/kg de MS suivant le traitement) (tableau 9). Il est de même pour d'autres fourrages tropicaux comme pangola et sorgho (valeur maximale de 20 g/kg de MS ; CELANIE, 1982).

Avec le traitement à l'ensipron, la quantité d'AGV présents tend à se stabiliser dès le quatrième jour. Les teneurs sont plus élevées pour la plante traitée à la mélasse et moindres pour le traitement à l'acide. (figure 6).

L'augmentation des AGV est due essentiellement à l'aide acétique dont la teneur varie de 0,47 à 11,63 g/kg de MS.

L'acide butyrique n'a été présent qu'à l'état de trace.

III.2. - ETUDE DES FOURRAGES DESILES A 30 ET 60 J

III.2.1) Composition chimique du matériel utilisé

* MS

Les teneurs en MS des feuilles, stipes et de la plante entière du bananier à la mise en silo sont respectivement de 20;9 et 11% (tableaux 10 et 11). Ces valeurs ne sont pas différentes de celles relevées dans la bibliographie pour la variété "poyo" (F. GEOFFROY, 1980).

Cependant en moyenne, la MS est plus faible à l'ensilage 60j qu'à 30 j parce que les différents silos n'ont pas été réalisés le même jour.

Au désilage, la MS des stipes et de la plante entière a augmenté de 1 à 2 points tandis que celle des feuilles n'a pas varié sauf pour les feuilles traitées à l'ensipron et désilées à 60 j.

* Les glucides solubles

D'une façon générale, la vitesse de disparition des glucides est plus grande pour le fourrage plante entière ~~ensilée~~ sans conservateur ^{par rapport aux stipes} quel que soit la durée de conservation (respectivement 95% de disparition en 3 jours contre 95% de disparition en une semaine).

Avec le conservateur ensipron, pour 30 j de conservation la disparition est de 40% pour la plante entière et de 24% pour les stipes (figure 8).

A 60 j, le même phénomène se reproduit mais en général les vitesses de disparition sont plus élevées. En effet, sur 4 jours de conservation d'une part, tous les glucides ont pratiquement disparu pour les fourrages ensilés seuls et d'autre part, leur hydrolyse s'est arrêtée avec l'ensipron dès J+1 de conservation d'où un effet plus marqué de ce produit (figure 9).

* MO

Les teneurs en MO des feuilles, stipes et plante entière sont en moyenne respectivement de 90,92 et 91% (tableau 12). Celles de la variété "poyo" s'évaluent à 84,2% pour les stipes et 89,3% pour les feuilles (F. GEOFFROY, 1980). Ce sont donc des fourrages riches en MO.

* MAT et N soluble

D'une teneur moyenne de 10% de la MS pour les feuilles et 3% de la MS pour les stipes (tableau 13) ^{(21,4% de la MS pour les feuilles et 3,5% pour les stipes de "Poyo" selon F. GEOFFROY (1980))}, nous observons une diminution de MAT avec la durée de conservation. Cette perte de MAT est peu visible dans le cas présent. Généralement, les teneurs en MAT sont plus élevées pour le conservateur ensipron que pour le traitement sans conservateur.

L'azote soluble n'a été enregistré qu'à l'état de traces.

III.2.2) Bilan de conservation

III.2.2.1) Les pertes en matière sèche

A l'exception des feuilles sans conservateur, le pourcentage des pertes de MS augmente avec la durée de conservation (tableau 15) ou il se stabilise dans le cas de la plante entière sans conservateur. Il est difficile d'interpréter le résultat obtenu pour les feuilles qui serait plus liée à une erreur de manipulation. En moyenne, ces pertes sont plus élevées pour la plante entière et les stipes que pour les feuilles (15% de pertes de MS pour plante entière et stipes contre 6% ^{de} pertes en MS pour les feuilles). Elles varient autour de 11% à 30 j et 19% à 60 j. Il n'y a pas d'effet de l'ensipron sur le bilan de conservation.

III.2.2.2) Les caractéristiques fermentaires

* Le pH

Le pH diminue avec la durée de conservation et passe en moyenne de 4,5 à 3,6. Les pH les plus faibles sont obtenus avec la plante

entière (tableau 16) et les stipes. Avec l'ensipron, les pH obtenus sont plus élevés pour les feuilles, plus faibles ^{pour le stipe, et du même ordre de grandeur} pour la plante entière par rapport au fourrage ensilé sans conservateur.

* L'acide lactique

La teneur augmente sensiblement avec la durée de conservation. Cette augmentation est particulièrement importante avec les stipes.

L'amplitude de la variation est faible (feuilles, plante entière) ou nulle (stipe) lorsque le conservateur ensipron est ajouté à l'ensilage (tableau 17).

* Le NH_3

Nous observons un % de teneur en NH_3 par rapport à l'azote total croissant avec la durée de conservation. Ce phénomène est très accentué pour les feuilles et stipes sans conservateur (respectivement 278% et 406% d'augmentation).

Avec l'ensipron, les teneurs sont moindres et augmentent très peu sauf dans le cas des feuilles pour lesquelles le taux d'augmentation est de 188% (tableau 18).

* Les AGV

Les teneurs en AGV diminuent avec la durée de conservation à l'exception des stipes et des feuilles conservées à l'ensipron. L'évolution anormale constatée pour ces 2 organes est certainement due à une erreur de manipulation ou d'échantillonnage.

Les valeurs obtenues sont plus élevées pour la plante entière que pour les stipes et les feuilles (tableau 19 et 20). L'ensipron à la dose utilisée n'a pas eu d'effet sur la production d'AGV.

III.3 - ASPECTS MICROBIOLOGIQUES

Il est à noter qu'en ce qui concerne les expériences bactériologiques les valeurs relevées sont des valeurs relatives exprimées par rapport au temps T0 du prélèvement.

III.3.1) Estimation de l'activité bactérienne globale des fourrages traités en l'ensipron et désilés à 30 et 60 jours

Seule la cinétique des caractéristiques fermentaires a été suivie dans le temps.

* Le pH

Au temps 0, le pH est en moyenne de 5,8 pour les fourrages conservés pendant 30 jours et de 6 pour une durée d'ensilage de 60 jours. Ces valeurs s'expliquent par le fait que l'inoculum qui était à un pH voisin de 4 a été introduit dans un milieu de culture à pH 7.

Quel que soit l'organe étudié, l'acidification est rapide^{et} à partir de 20 heures d'incubation, elle s'arrête (figures 10 et 14). Le processus est le même pour les fourrages désilés à 30 jours que pour ceux désilés à 60 jours. Le pH remonte légèrement puis se stabilise à environ 4 et 3,6 respectivement pour une durée de conservation de 30 et 60 j.

* l'ammoniac

Les valeurs enregistrées dans le milieu de culture sont en moyenne de 0,055 g/l et de 0,08 g/l respectivement pour les fourrages conservés à 30 j et 60 j. La production augmente dans le temps de 64% et de 25% pour des durées de 30 ou 60 jours d'ensilage, pendant 23 heures d'incubation. Puis elle diminue et réaugmente légèrement quel que soit le fourrage considéré. D'une manière générale, nous notons que les valeurs obtenues sont tout de même élevées pour des fourrages qui sont traités à l'ensipron (figures 11 et 15).

* L'acide lactique

La teneur en acide lactique augmente de façon très sensible pendant 23 h d'incubation pour l'inoculum provenant des feuilles conservées pendant un mois, pour l'inoculum des stipes et ^{celui} de la plante entière à la même durée de conservation d'ensilage.

Concernant le désilage à 60 j, nous relevons des taux d'augmentation de la production de lactate significativement plus élevé dans l'inoculum des feuilles que dans celui des stipes et de la plante entière à 35 h d'incubation. Puis, les teneurs diminuent progressivement. Les quantités d'acide lactique sont plus élevées après 30 jours de conservation, qu'après 60 jours et la plante entière en contient plus que les feuilles ou les stipes (figures 12 et 16).

* Les AGV

Leur pourcentage d'augmentation s'évalue, à 30 jours de conservation et 23 h d'incubation, à 1,65% pour les feuilles, 41% pour les stipes et 16% pour la plante entière.

A 16 h d'incubation pour le désilage 60 jours, les taux d'augmentation enregistrés sont de 30,9% pour les feuilles 487% pour les stipes et 135% pour la plante entière. Puis les teneurs diminuent légèrement au bout de 30j d'ensilage, dans le cas de la plante entière tandis qu'elles se stabilisent pour les feuilles.

Pour les stipes, l'augmentation des quantités d'AGV dans le milieu est constante (figure 13).

Pour le désilage réalisé après 60 jours, la production d'AGV se stabilise au bout de 16 h d'incubation. La variation de la teneur en AGV est dûe principalement à la teneur en acide acétique. (figure 17).

D'une façon générale, la concentration en AGV est plus faible dans les jus d'ensilages ouverts après 60 jours que dans ceux ouverts après 30 jours.

III.3.2. Test d'activité de germes anaérobies à pH < 4 sur fourrage plante entière traité à l'ensipron et désilé à 60 j de conservation :

* Le pH

La valeur élevée de pH obtenue au temps 0 est due au mélange d'un inoculum à pH très acide et d'un milieu de culture à pH 7. Cette "remontée" du pH est d'autant plus faible que l'inoculum est à un pH bas. Ainsi les inoculum à pH 3,5 - 3 et 2,5 introduits dans le milieu de culture pour anaérobies s'appelleront respectivement milieux A - B et C.

Le pH diminue faiblement mais de façon régulière quelque soit le milieu considéré jusqu'à 48 h d'incubation, puis se stabilise entre 48 et 51 h où il atteint la valeur de 4,9 - 4,9 et 4,7 respectivement pour les milieux A, B et C.

Au bout de 54 h d'incubation, le pH remonte faiblement pour atteindre la valeur de 6,7 à 72 h (figure 18).

La baisse de pH jusqu'à 48 h est plus marquée pour l'inoculum A que pour les deux autres (B et C) ; 0,34 point contre 0,09 et 0,28 respectivement.

* Le NH₃ :

Quelque soit le milieu, sa teneur en NH₃ augmente jusqu'au temps 51 h ; diminue à 54 h puis s'élève brusquement jusqu'au temps 72 h (figure 19). Les teneurs en NH₃ sont plus élevées pour le milieu A.

* L'acide lactique :

Le milieu de culture enrichi en source de lactate en amène 11 g/l au départ.

Les données de la figure 20 représentent l'acide lactique restant dans le milieu.

Il y a d'abord consommation de lactate au temps T₀ (4,765 g/l pour le milieu C ; 5,2 g/l pour le milieu B et 5,8 g/l pour le milieu A) puis augmentation jusqu'au temps 48 h de l'acide lactique dans les milieux B et C et jusqu'à 51 h dans le milieu A.

La concentration diminue par la suite dans tous les milieux jusqu'à 72 h.

Que ce soit au niveau de la production ou de la consommation de lactate, les germes du milieu A sont les plus actifs.

* Les AGV :

La concentration en AGV suit la même évolution que les autres caractéristiques fermentaires.

Elle augmente jusqu'à 48 h puis semble se stabiliser (milieu C) ou chuter (milieux A et B) entre 48h et 54 h pour croître fortement jusqu'à 72 h dans tous les milieux. L'intensité des fermentations étant plus forte pour le milieu A (figure 21).

DISCUSSION

IV) DISCUSSION

IV.1. - ETUDE DE LA PLANTE ENTIERE ENSILEE DURANT UNE SEMAINE

IV.1.1) Composition chimique du matériel utilisé

* La Matière Sèche

Au cours de la première semaine de conservation, la Matière Sèche augmente puis se stabilise. Cette augmentation est vraisemblablement à mettre en liaison avec les pertes sous forme de jus, importantes dès les premiers jours, qui diminuent puis s'arrêtent par la suite.

Cette concentration passive de la Matière Sèche est bien illustrée avec les traitements mélasse et ensipron.

La diminution de MS enregistrée avec le fourrage sans conservateur le 4ème jour s'explique plus difficilement. Il est possible qu'il s'agisse là d'un effet de l'échantillonnage vu la faible différence (1 point) de MS obtenue.

* Les glucides solubles

La disparition rapide et intense des glucides rend compte d'une forte activité microbiologique et enzymatique au sein des différents ensilages. Elle est particulièrement prononcée pour le fourrage mélassé ce qui indiquerait une stimulation de la fermentation avec ce conservateur.

La teneur initiale en glucides solubles du fourrage mélassé est double de celle du témoin (30% de la MS contre 15% de la MS pour le témoin) et nous ne retrouvons au bout d'une semaine que 1% de la MS au sein de ces deux ensilages soit une dégradation quasi-totale de 97% et 93% respectivement.

Avec l'ensipron, la fermentation est moindre et l'on peut affirmer qu'à partir du 4ème jour, il y a ^{un faible} blocage par ce conservateur de toute activité microbienne puisque la teneur en glucides solubles d'environ 3,5% de la MS demeure constante.

Nous constatons cependant que l'action de l'ensipron n'a pas été immédiate puisque nous observons une disparition d'environ 82% des glucides solubles de départ. Il faut toutefois souligner qu'une part non négligeable de ces glucides doit se retrouver dans les jus d'écoulement qui sont plus importants avec la mélasse et l'ensipron. Le phénomène de respiration est également très important puisqu'il aboutit à une consommation de glucides accompagnée d'une élévation de température.

CELANIE (1982) a étudié l'effet de la température sur le processus de la disparition des glucides. Il est d'autant plus intense que la température est élevée.

Il ne reste pas moins vrai que l'on se trouve en milieu tropical et ^{que} toutes les conditions nécessaires à une prolifération bactérienne sont réunies (température élevée, humidité...) pour expliquer la rapidité et l'intensité de l'activité microbiologique décelée (CELANIE, 1982). Cette rapidité d'hydrolyse des glucides solubles est d'ailleurs le reflet d'une phase respiratoire extrêmement brève ~~sous~~ de telles conditions de température.

* Matière Organique

Elle évolue peu avec la durée de conservation et ne semble pas liée à une activité microbiologique. Sa teneur n'est donc pas un critère de la qualité de conservation des fourrages.

* MAT et N soluble

Les pertes en MAT au cours des deux premiers jours de conservation sont de 4 ; 4,9 et 6,4 g/kg de MS respectivement pour les traitements sans conservateur, avec ensipron et avec mélasse.

Il s'agit de pertes essentiellement sous forme de NH_3 et d'azote soluble.

Au 4ème jour de conservation, les pertes sont de 9,2 ; 1,1 et 13 g de MAT/kg de MS respectivement pour la plante sans conservateur,

avec ensipron et mélasse. Elles augmentent donc avec la durée de conservation pour la plante ensilée seule et la plante mélassée tandis qu'avec l'ensipron, elles diminuent.

A J+8, nous observons une disparition de 2,5 ; 1,2 et 10,1 g de MAT/kg de MS pour l'organe sans conservateur, avec ensipron et avec mélasse. A cette date, les pertes diminuent fortement pour les ensilages sans conservateur et avec mélasse tandis qu'elles se stabilisent pour l'ensipron.

Les pertes en MAT ont donc une évolution parallèle à celle des MS, avec un maximum à J+4 suivie d'une décroissance. Elles sont également plus fortes avec la mélasse (car elle apporte de la MAT) et plus faibles avec l'ensipron. Il s'agit surtout de pertes sous forme d'N soluble évacué avec les jus d'écoulement et une mesure de ce facteur sur ces jus aurait permis de mieux les apprécier. En effet, le jus de pression recueilli au désilage contient de l'ammoniac mais peu d'N soluble. ^{Ce dernier existe} à l'état de traces tandis que le pourcentage de NH_3 ne cesse de croître avec la durée de conservation. L'ensipron en provoquant un tannage des protéines bloque la production de NH_3 d'où les faibles % enregistrés.

IV.I.2) Bilan de conservation

IV.I.2.1) Les pertes en Matière Sèche

Elles augmentent au cours du temps en passant par un maximum à J+4 (~~les valeurs relevées étant annulées~~) puis diminuent ultérieurement.

Entre J_0 et J+2, il s'agit essentiellement de pertes sous forme de jus puisque parallèlement on observe une augmentation de la teneur en MS qui correspond en fait à une concentration passive dans un moindre volume.

A partir de J+2, la teneur en MS se stabilise pour tous les traitements et les pertes relevées plus faibles sont surtout dûes au phénomène de respiration du végétal, les pertes de jus diminuant peu à peu jusqu'à arrêt total.

Elles sont plus fortes avec le conservateur mélasse du fait de l'apport de sucres qui stimule le phénomène de respiration et l'apport de liquide qui favorise l'écoulement de jus.

Avec l'ensipron, les pertes sont faibles du fait du blocage de l'activité microbienne.

IV.I.2.2) Caractéristiques fermentaires

* Le pH

L'acidification décelée confirme une certaine activité microbologique due notamment aux bactéries lactiques puisque dès le deuxième jour de conservation on enregistre des teneurs de 20 g de lactate/kg de MS. Cette activité microbienne serait moins intense dans le fourrage traité à l'ensipron et la "retombée" du pH observé à partir de J+2 serait due au phénomène passif de forte perte en jus entre J0 et J+2 ; lequel se ralentit par la suite d'où un effet de "concentration apparente" en acides.

* L'ammoniac

Il faut indiquer que la production de NH_3 est faible, ce qui s'expliquerait par le blocage de l'activité microbienne avec l'ensipron.

L'existence d'une flore protéolytique à ce stade de la conservation est illustrée par une tendance à l'augmentation de la teneur en NH_3 à J+4 pour le conservateur mélasse et par une augmentation régulière dans le temps pour le fourrage ensilé seul. La diminution de teneur observée à J+8 pour celui-ci serait à mettre en liaison avec une baisse d'activité microbienne ou alors a un échantillonnage ^{mal} réalisé sur ce silo.

* L'acide lactique

On assiste au cours de cette semaine de conservation à une prédominance de la fermentation lactique. Avec l'ensipron, l'activité microbienne est bloquée et la production d'acide lactique est nulle ou évolue très faiblement.

Le fourrage sans conservateur, subit une fermentation lactique importante, cependant, celle-ci est davantage stimulée par l'addition de

mélasse. La flore lactique est dominante et la production de lactate ne cesse de croître dans le temps (augmentation de 250% pour la mélasse et de 175% pour la plante sans conservateur).

* Les AGV totaux

La phase de production d'AGV est suivie d'une stabilisation. Elle est simultanée à l'acidification observée durant les premiers jours de l'ensilage.

Les teneurs en AGV sont plus importantes pour le fourrage mélassé puisque c'est lui qui offre à la flore correspondante le maximum de substrats acides disponibles.

La plante entière ensilée seule a un taux d'AGV intermédiaire entre celui des fourrages traités à l'ensipron et celui des fourrages mélassés car elle renferme des teneurs en acide lactique également intermédiaires. A J+8, son taux d'AGV diminue et l'on retrouve un phénomène évolutif identique à celui rencontré pour l'amoniac. De ce fait, les causes de cette décroissance de la teneur en AGV à ce jour de conservation sont probablement les mêmes.

L'activité acétique observée est sous-jacente à l'activité lactique qui ^{est} prédominante. En effet, l'acide acétique est l'AGV majoritaire de ces fourrages.

IV.2. - ETUDE DES FOURRAGES DESILES A 30 ET 60 J

IV.2.1) Composition chimique du matériel utilisé

* MS

Hormis le cas des feuilles et de la plante entière, les quantités de MS diminuent, de façon générale, au cours du temps de conservation. Cette disparition de la MS peut être due à un entraînement par le jus ou à une perte par le phénomène respiratoire. Ces pertes sont minimales pour les feuilles ensilées seules tandis que l'augmentation des quantités de MS de la plante entière sans conservateur n'est qu'apparente et correspond à une concentration passive découlant d'une forte évacuation de jus.

L'effet de l'ensipron est nul et n'intervient pas sur le bilan des pertes.

* Les glucides solubles

L'intensité de la cinétique de disparition des glucides solubles pour les fourrages ensilés seuls traduit une forte activité bactérienne. En une semaine, tous les glucides ont disparu. L'hydrolyse des sucres paraît plus importante et plus rapide chez la plante entière par rapport aux stipes. Cela est certainement dû au fait que la plante entière est légèrement plus riche en sucre que les stipes. Avec l'ensipron, l'activité microbienne est moindre du fait d'une légère inhibition des bactéries dès la mise en silo d'où une hydrolyse partielle des glucides.

Une légère hausse des teneurs est observée^{à 60j} il est probable qu'une hydrolyse des glucides membranaires et de réserve (amidon) ait lieu ou alors qu'il s'agisse d'un effet de concentration du fait d'une quantité constante de glucides dans un moindre volume.

* MAT et N soluble

L'évolution des MAT se traduit par une diminution au cours de l'ensilage. Elle est particulièrement forte pour les feuilles et ces MAT perdues se retrouvent essentiellement sous forme de NH_3 et de N soluble

On comprend ainsi que le pourcentage de production de NH_3/N total est plus élevé pour cet organe. L'azote soluble ayant été en majorité évacué avec les jus d'écoulement, il n'en reste pratiquement plus au désilage. Pour le traitement sans conservateur les pertes en MAT sont généralement plus fortes que pour le traitement à l'ensipron. Cela s'explique par l'effet de tanages des protéines induit par ce conservateur et qui de ce fait bloque la protéolyse de ces composés. Les faibles pertes relevées pour les stipes et la plante entière par rapport aux feuilles révèlent déjà la mise en place d'une activité protéolytique plus intense chez ces dernières ; du fait de leur richesse en MAT.

IV.2.2) Bilan de conservation

IV.2.2.1) Les pertes en Matière Sèche

Les quantités de MS perdues (11% à 30 j contre 19% à 60 j) ^{aug.} ~~mentent~~ au cours de l'ensilage d'une part, à cause d'un entraînement avec les jus évacués et d'autre part à cause du phénomène de respiration. En effet, selon B. MICHALET-DOREAU (1977), les pertes de parties inconsommables sont liées à la présence d'oxygène dans le silo, il faut donc que celui-ci soit tassé au maximum pour les limiter. Ces pertes sont plus élevées pour la plante entière et les stipes qui sont des organes rejetant énormément de jus, contrairement aux feuilles. Cela explique que l'on retrouve au désilage 60 j des quantités de MS moindres pour ces organes par rapport aux feuilles (tableau 11).

En principe, l'ensipron provoque de très faibles pertes de MS au cours de l'ensilage, or cela n'a pas été constaté dans l'étude présente. Ce conservateur a donc certainement été appliqué à trop faible dose.

IV.2.2.2) Les caractéristiques fermentaires

* Le pH

L'acidification observée au cours de l'ensilage est manifeste d'une activité microbiologique. Les sucres disparaissent au profit d'acides qui se forment.

Avec l'ensipron, l'activité bactérienne est légèrement inhibée à la mise en silo ce qui se traduit par une acidification très moindre du fourrage. Cette action de l'ensipron se fait mieux sentir au niveau des stipes où le pH est plus bas et constant avec la durée de conservation qu'au niveau de deux autres organes.

Pour le fourrage feuilles, la dose de 3,5% est vraiment insuffisante puisque le pH à 30j est encore élevé et l'acidification au cours de l'ensilage se fait bien.

* L'acide lactique et les AGV et le NH_3

La production de lactate croissante dans le temps prouve qu'a lieu une fermentation lactique. Elle est prédominante au sein des fourrages ensilés pendant 30j. Avec l'ensipron, les niveaux de production sont moindres mais les taux sont très élevés d'où une instabilisation du fourrage à la dose utilisée.

A 30 j de conservation, la production de lactate est forte, il en est de même pour celle des AGV notamment les acides acétique et butyrique. Au cours des premiers jours de l'ensilage, il y a développement des bactéries acétiques coliformes aérobies facultatives, en même temps que se met en place la flore lactique. D'après GOUET (1979) in CELANIE, (1982), la flore acétique disparaît au bout de 3 j de conservation tandis que les lactobacillus se développent en même temps et se maintiennent. La flore clostridiale elle, apparaît à partir de 30 jours de conservation théoriquement.

Ainsi au cours de cette première phase d'ensilage, les sucres sont transformés rapidement en acides surtout par les bactéries acétiques mais aussi en alcool, acide lactique et CO_2 et au fur et à mesure que la conservation se prolonge, le lactate devient prédominant. Ce phénomène est particulièrement bien mis en évidence pour les fourrages traités à l'ensipron et pour les stipes et la plante entière conservés seuls.

Simultanément à cette phase d'acidification, il y a eu au cours de l'ensilage un début de production de NH_3 par les bactéries acétiques qui s'attaquent aussi aux acides aminés. Expérimentalement, le taux moyen

de production de NH_3 se chiffre à 0,66% NH_3/N total pour les fourrages conservés seuls et à 0,35% NH_3/N total pour les fourrages traités à l'ensipron. Une flore clostridiale sous-jacente à la flore lactique s'est développée vu les teneurs en acide butyrique obtenues. A 60 j de conservation, la fermentation lactique prédomine tandis que démarre une fermentation acétique. Simultanément, la flore clostridiale continue à se développer. La production de lactate est supérieure à 100% et d'après ARCHIMEDE (1984) à 60 j, on observe un pic de lactate puis la production décroît avec la durée de conservation. Les ensilages de 120 j le confirmeront. Le lactate est ^{donc} produit en quantité importante tandis que les taux d'AGV diminuent en général sauf pour les feuilles et stipes conservés avec ensipron où les fermentations acétique et butyrique semblent avoir déjà démarré au détriment du lactate produit à moins qu'il ne s'agisse d'une erreur de manipulation ou d'échantillonnage. La diminution des teneurs en AGV en même temps qu'une augmentation des teneurs en lactate prouve la dominance de la flore lactique par rapport aux autres flores sous-jacentes.

Durant cette période de conservation, nous notons des taux croissants de NH_3/N total. Les teneurs en NH_3 sont stables pour les stipes traités à l'ensipron et la plante entière sans conservateur alors que pour les autres fourrages elles augmentent surtout pour ceux qui sont ensilés seuls. Ce NH_3 est le témoin d'une fermentation protéolytique découlant certainement des activités acétiques et butyriques sous-jacentes de l'activité lactique.

Ainsi ont été mis en évidence les principales étapes de l'ensilage au cours des deux premiers mois de conservation. A la phase respiratoire fait donc suite une phase d'acidification rapide de l'ensilage où se mettent en place une fermentation acétique suivie d'une fermentation lactique. Puis au bout des deux mois de conservation commencent à redémarrer les fermentations acétiques et butyriques. Celles-ci seront nettement mieux décelées aux ensilages de 120 j.

Cependant, toute cette étude a mis en évidence la faible voire l'absence de stabilisation par l'ensipron à la dose de 3,5‰. Elle a donc montré que cette dose est nettement insuffisante pour les ensilages de cette variété de banane. Il va donc falloir y remédier.

IV.3. - ASPECTS MICROBIOLOGIQUES

IV.3.1) Estimation de l'activité bactérienne globale des fourrages traités à l'ensipron et désilés à 30 et 60 j

* Le pH

Malgré le conservateur acide, nous observons une activité microbienne et l'acidification est maximale à 20 h d'incubation. Il semble donc que la dose d'ensipron utilisée n'ait pas été suffisante à acidifier suffisamment le milieu pour le stabiliser.

L'arrêt d'acidification observé à 20 h semble provenir d'un changement de dominance de la flore microbienne, celle qui intervient en second lieu utilisant probablement les acides produits durant la première phase, ce qui expliquerait la remontée du pH. On notera en effet qu'à la diminution de la teneur en acide lactique correspond une augmentation des AGV et en particulier de l'acide acétique.

Quelle que soit la durée de conservation, les bactéries n'acidifient pas le fourrage en deçà de 3,5. Il est assez surprenant de constater une activité microbienne aussi intense à ces niveaux de pH.

* L'ammoniac

Les teneurs élevées de 0,05 à 0,13 g/l confirme l'insuffisance de la dose d'ensipron utilisée. En effet, ce produit inhibe la dégradation des protéines, or dans le cas présent, l'activité protéolytique semble importante.

Il y a donc au sein de l'ensilage une succession de dominance de flore bactérienne.

En effet, pour l'ensilage ouvert au bout de 60 jours, l'activité de la flore protéolytique semble plus importante (d'après les teneurs élevées obtenues) que celle des fourrages désilés à 30 j. Ceci tendrait à prouver

qu'au cours du temps, il y a prédominance de cette flore protéolytique au détriment de la flore lactique.

* L'acide lactique

Pour une même quantité de sucres au départ, il y a plus de lactate produit à 30 jours de conservation qu'à 60 jours (figures 12 et 16).

Le facteur essentiel qui se dégage est la prédominance de la flore lactique jusqu'à 30 jours de conservation. En effet, les teneurs en lactate sont plus élevées à 30 jours qu'à 60 jours et l'intensité de la fermentation l'est également.

A 35 heures d'incubation, simultanément à la remontée du pH il y a disparition de l'acide lactique. C'est alors la flore consommant ce produit qui prend le dessus.

* Les AGV

Les valeurs obtenues en moyenne pour les AGV sont relativement faibles. Elles varient 0,6 à 2,6 g/l dans le milieu de culture. Les concentrations obtenues avec le jus de 30 jours sont en moyenne plus élevées que celles obtenues avec le jus de 60 jours (figures 13 et 17). Elles sont la manifestation d'une activité microbienne produisant de l'acide acétique qui prend place et se développe en parallèle à l'activité lactique.

Cet ensemble de résultats confirme des données précédemment obtenues indiquant que dans nos conditions expérimentales (température ambiante de 23°C) il s'établit d'abord une fermentation lactique qui est suivie d'une fermentation acétique. Il a été bien mis en évidence par ailleurs (Mc DONALD, 1966) qu'aux températures élevées (> 30°C) avec des fourrages de faibles teneurs en MS (> 20%), la fermentation clostridiale prédominait.

Il est vraisemblable que c'est ce type de fermentation qui s'établit et prend le dessus dans la seconde phase du processus ce qui explique à la fois la diminution de l'acide lactique, l'augmentation de l'ammoniac, celle des AGV et la remontée du pH. Ce phénomène est particu-

lièrement marqué chez les stipes et la plante entière ; d'ailleurs moins riche en MS que les feuilles ce qui expliquerait la facilité d'installation de la fermentation clostridiale.

Le second aspect important de ces données est la mise en évidence d'une activité microbienne efficace en milieu acide à pH compris entre 3 et 4. Ceci pose d'une façon claire le problème de l'identification des souches bactériennes qui fonctionnent à ces pH et celui des conditions de milieu qui le permettent.

IV.3.2) Tests d'activité de germes anaérobies à pH < 4 sur fourrage plante entière traitée à l'ensipron et désilé à 60 j

Cet ensemble de résultats tend à prouver, d'une part que l'ensilage n'est pas stabilisé à pH < 4 et d'autre part qu'il renferme à 60 j d'ensilage des germes anaérobies capables de fonctionner dans des milieux acides. Une flore complexe reste active et les dominances évoluent en fonction du temps. Quarante huit heures et soixante douze heures notamment, apparaissent comme des étapes critiques de changement de dominance de la flore.

La consommation initiale de lactate est le fait des bactéries acétiques intervenant en premier lieu dans le processus d'ensilage. Elles consomment le lactate présent dans le milieu et le transforment en acide acétique surtout alcool, acide lactique et CO_2 . Les teneurs en acide acétique correspondantes sont d'ailleurs élevées jusqu'à 48 h, il semble qu'il y ait persistance d'une flore acétique qui produit à de faibles niveaux du lactate. L'augmentation des AGV et du NH_3 à 72 h illustre bien ce phénomène. En effet, après la phase lactique, la flore acétique et butyrique continue à consommer le lactate produit de 48 h à 54 h tandis que les autres paramètres fermentaires (pH, AGV et NH_3) restent constants ; puis à partir de 54 h, elle devient active et produit en quantité croissante de l'acide acétique butyrique et du NH_3 . Les pics de AGV et NH_3 obtenus à 72 h en même temps qu'une hausse du pH et une très faible teneur en lactate dans le milieu confirme excellemment la présence d'une flore clostridiale. Cependant, l'acide butyrique n'est présent en quantité significative que dans les milieux A et B, les moins acides. Une intensité quasiment nulle de l'activité microbienne n'est notée que pour le milieu C à pH 2,5 au départ.

Cette expérience met en évidence après 60 j de conservation l'existence d'une activité microbienne à pH inférieur à 4 dont la nature reste à identifier. C'est ce que nous avons tenté de faire par observation microscopique des différents inoculum étudiés. Il est à noter tout d'abord qu'après inoculation dans des milieux à pH 2,5 - 3 et 3,5 , du jus de pression recueilli au désilage 60 j sur la plante entière et passage à l'étuve pendant 48 h, le trouble bactérien obtenu a été très intense pour l'inoculum à pH 3,5 puis pour l'inoculum à pH 3 et enfin à pH 2,5 il n'était ^{que} très léger.

L'observation microscopique révèle dans tous les cas, la présence de batonnets isolés ou en chainettes, à spore terminale et gram +. Les bâtonnets sont plus nombreux dans l'inoculum A. Ces critères bien qu'insuffisants correspondent au genre Clostridium. Nous avons effectué une identification plus poussée par galerie Api pour anaérobie. Les profils obtenus (annexe IV) sont très ressemblants et voisins de celui de Clostridium butyrium. Cette bactérie est probablement présente au sein du fourrage désilé à 60 j.

CONCLUSION

CONCLUSION

L'idée essentielle qui ressort de cette étude est la mise en évidence à $\text{pH} < 4$ de germes encore actifs au sein des différents fourrages étudiés ce qui confirme qu'en milieu tropical, contrairement à ce qui se passe en milieu tempéré les fourrages ne sont pas stabilisés à $\text{pH} 4$.

Une identification plus précise de cette microflore serait nécessaire pour pouvoir comprendre réellement ce qui se passe à ces pH afin de pouvoir mettre en place un processus d'inhibition voir de destruction de ces germes.

A noter, qu'outre le genre *Clostridium* détecté existent d'autres bactéries qu'il faudrait déterminer par une étude poussée.

L'autre fait qui se dégage est la confirmation d'une fermentation lactique durant les 30 premiers jours d'ensilage suivi d'une prédominance de fermentation acétique entre 30 et 60 j de conservation. Les dosages biochimiques effectués aussi bien que les résultats microbiologiques le montrent très bien. De nombreuses recherches sont donc encore à faire sur les fourrages tropicaux notamment dans le domaine microbiologique, qui du fait de sa complexité est malheureusement souvent négligé.

Enfin, nous mettons en évidence que la dose d'ensipron utilisée de 3,5% n'est pas suffisante à la stabilisation du milieu que constitue l'ensilage des feuilles, stipes ou plante entière de banane variété "figue pomme". Celle-ci semble bénéficier d'un pouvoir tampon particulièrement élevé pour pouvoir résister à une telle acidité.

De plus, selon CELANIE (1982), ce pouvoir tampon intervient sur l'intensité des fermentations par accroissement au cours de la conservation. Ceci explique donc que le fourrage est de moins en moins stabilisé dans le temps surtout si la dose d'ensipron de départ est faible et qu'alors les fermentations deviennent de plus en plus importantes.

Il aurait fallu mesurer ce facteur en début et en fin d'ensilage. Sa connaissance aurait permis d'opter d'emblée pour une dose suffisante d'ensipron à appliquer au fourrage afin d'aboutir à sa stabilisation.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES -

ARCHIMEDE H., 1984 - Rapport de stage I.N.R.A.-C.R.A.A.G.

BENATA M., 1976. - Influence de l'addition d'acide formique associé ou non à du formol, sur la qualité de conservation, la digestibilité, la valeur nutritive des ensilages d'herbes, le bilan azoté et les caractéristiques fermentaires du jus de rumen. Rapport de la 3ème année, INA Paris-Grignon, Août, 1976.

CELANIE E., 1982. - Etude de l'évolution microbiologique et des caractéristiques fermentaires des ensilages de canne à sucre, de sorgho et de Pangola en climat tropical humide. Thèse de docteur de 3ème cycle ; Université Pierre et Marie Curie (Paris VI) ; Janvier 1982.

DEMARQUILLY C., 1973. - L'ensilage d'herbe - Nouvelles techniques de conservation. Utilisation par les animaux, Mars 1973.

DEMARQUILLY C., DULPHY J.P., 1979. - Problèmes particuliers aux ensilages. Journée du Grenier de Theix, 1979.

DEVUYST A., VERVACK W et ARNOULD A., 1968. - Etude du mode d'action des conservants pour ensilage.

DUMAS R., 1962. - Le bananier dans l'alimentation du bétail. Bulletin de Madagascar, 1962, n° 194 (623-632).

GEOFFROY F et SAMINADIN G., - Conservation des sous-produits de traitements de l'ananas sous forme d'ensilage.

GEOFFROY F., - Valeur alimentaire et utilisation de la banane par les ruminants en milieu tropical. Thèse de docteur-Ingénieur ; INSA Lyon et Université Claude Bernard, Lyon I, Octobre 1980.

GEOFFROY F., FABERT V., CALIF E., SAMINADIN G., VARO H., 1978. - Intérêt des feuilles et stipes de bananier comme ressource fourragère.

I. Disponibilité et valeur alimentaire. Nouv. Agron. Antilles-Guyane, 4, (1), 1-9.

INTEAZ A., FAIRBAIRN R., BAKER E Bruce, GARCIA G., 1983. - The effects of ammonia on the fermentation of chopped sugar cane. Animal feed science and technology, 9 (1983), 291-299.

MICHALET-DOREAU B., 1977. - L'ensilage : principe, utilisation et réalisation pratique, Février 1977. Laboratoire des aliments, INRA de Theix, 63122 BEAUMONT.

XANDE A., 1978. - L'ensilage d'herbe, une tendance de conservation de l'herbe permettant de pallier au déficit alimentaire des ruminants durant la période de Carême.

I. Aspects théoriques et pratiques des fourrages tropicaux. Nouvelles agronomiques des Antilles et de la Guyane, 1978, 4-2, 63-80.

ANNEXES

- ANNEXE I -

MILIEU DE BRYANT ET BURNEY

(modifié par BERGERE) pour l'isolement de Clostridium butyriques. Pour
1 litre de milieu;

* Peptone de caseine	15 g
* Extrait de levure	5 g
* Extrait de viande	10 g
* Acétate de sodium	5 g
* L Cystéine chlorhydrate	0,5 g
* Lactate de sodium	5 g
* Eau distillée	1000 ml

pH final $6 \pm 0,1$. Le milieu est autoclavé pendant 20 minutes à 121°C.

- ANNEXE II -

MILIEU POUR ANAEROBIES

(The Procaryotes vol. II, 1981)

Pour 1 litre de milieu :

* 1 M phosphate de potassium	(pH 7,5)	30 ml
* 1 M Mg SO ₄	1 ml	
* Solution M	0,5 ml	
* 0,2 M Fe SO ₄ dans 0,1 M H ₂ SO ₄	0,2 ml	
* Trypticase	10 g	
* Extrait de levure	6 g	
* Thioglycolate de sodium	0,5 g	
* Source d'énergie (glucose)	15 g	
* Eau distillée		

pH final 7 à 7,2. Le milieu est autoclavé pendant 20 minutes à 121°C.

La solution M contient :

Mn Cl ₂	10 mM
Ca Cl ₂	30 mM
Co Cl ₂	5 mM
Na ₂ Mo O ₄	5 mM

- ANNEXE III -

COMPOSITION DU DILUANT

(pour préparation de la gamme de dilution)

Pour 1 litre de milieu

Solution minérale I	7,5%
Solution minérale II	7,5%
Solution résazurine	0,1%

compléter au volume désiré moins 7% avec H₂O distillée
passer à l'autoclave à 120°C pendant 20 minutes

Après stérilisation ajouter :

- Solution de cystéine - HCl	2%
- Solution de bicarbonate de Na	5%

Solution minérale I

K ₂ H PO ₄	0,6%
----------------------------------	------

Solution minérale II

K H ₂ PO ₄	0,6%
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,2%
NaCl	1,2%
Mg SO ₄	0,12%
CaCl ₂	0,12%



2030

API 20 A

SYSTÈME D'IDENTIFICATION
DES BACTÉRIES ANAÉROBIES

Notice Technique
Version C

Le système **API 20 A** permet de rechercher rapidement et facilement vingt et un caractères pour l'identification biochimique des bactéries anaérobies. D'autres caractères tels que croissance en gélose profonde, aspect des colonies, morphologie cellulaire, coloration de gram, étude des métabolites par chromatographie en phase gazeuse... sont à rechercher et à intégrer dans la méthodologie utilisée pour pouvoir réaliser une identification complète.

Des recherches complémentaires avec **API ZYM** (API # 2520) ou **API 50 CH** (API # 5030) peuvent parfaire la connaissance des germes identifiés.

PRINCIPE

Le système **API 20 A** se compose de 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. La suspension bactérienne répartie dans les tubes dissout les substrats.

Les métabolites produits sont mis en évidence par différents indicateurs de pH ou par addition de réactifs après 24 ou 48 heures d'incubation à 35-37° C.

- Le coffret **API 20 A** permet de faire 25 tests. Il se compose de :
 - 25 galeries **API 20 A**
 - 25 boîtes d'incubation
 - 25 ampoules de **API 20 A medium**
 - 25 fiches de résultats **API 20 A**
 - 1 notice technique

- Pour utiliser **API 20 A**, il faut disposer de :
 - jarre anaérobie ou chambre anérobie
 - anse ou écouvillons stériles (API # 7061)
 - huile de paraffine (API # 7010)
 - boîte de Petri plastique (9 cm de diamètre)

- réactif **EHR** (API # 7052)
- réactif **BCP** (API # 7051)
- réactif **XYL** (API # 7053)
- eau oxygénée sol. à 3 %
- portoir pour ampoules (API # 7020)
- pipettes stériles (API # 7030) ou
- **PSI** pipettes (API # 7025)
- lampe UV (365 nm)
- Catalogue Analytique **API 20 A** (API # 2039)

Plus le matériel de laboratoire :

- étuve, réfrigérateur, bec Bunsen, crayon marqueur

CONSERVATION

Galeries et **API 20 A medium** se conservent à 2-8° C. La date limite d'utilisation est imprimée sur l'emballage.

COMPOSITION DES MILIEUX ET RÉACTIFS

• **API 20 A medium** livré avec le coffret **API 20 A**

Tryptone	5,0 g
Extrait de levure	5,0 g
Chlorure de sodium	2,5 g
L-tryptophane	0,2 g
L-cystine	0,4 g
Hémine	0,01 g
Vitamine K ₃	0,01 g
Sulfite de sodium	0,10 g
Eau distillée qsp	1 000 ml
pH 7,0-7,2	

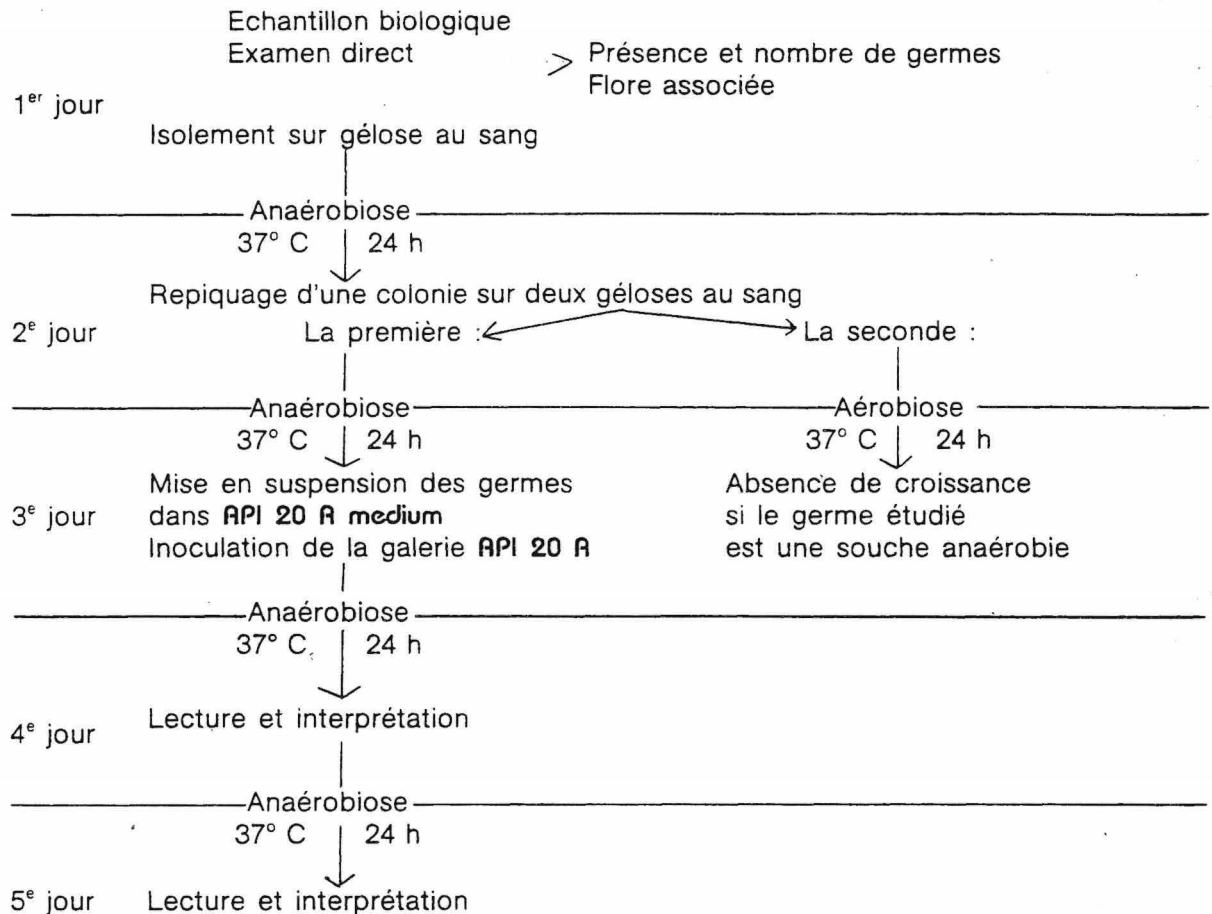
• Réactifs :

EHR : p-diméthylaminobenzaldéhyde	8,75 g
Ethanol	825 ml
HCl 37 %	175 ml

BCP : solution aqueuse à 0,02 %

XYL : xylène

MÉTHODOLOGIE RECOMMANDÉE



MODE OPÉRATOIRE

1. Préparation de l'inoculum :

- Ouvrir l'ampoule de **API 20 A medium**.
- A l'aide d'un écouvillon stérile prélever toutes les colonies obtenues sur gélose au sang en anaérobiose. Bien vérifier la pureté de la souche.
- Tenir l'ampoule verticalement et émulsifier les germes en frottant l'**écouvillon** par rotations contre la paroi de l'ampoule tout en restant dans le milieu de suspension. L'opacité finale doit être supérieure ou égale à celle du **tube 3 de l'échelle de McFarland**.

NOTE : Pour maintenir une certaine anaérobiose, il convient de ne pas remuer trop fortement le milieu d'inoculation car autrement, un certain volume d'air pourrait s'y dissoudre.

2. Préparation de la galerie

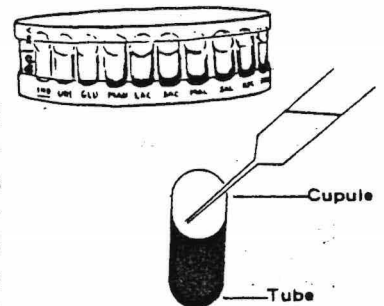
L'utilisation de la galerie dépend de la méthode choisie pour créer l'anaérobiose :

- Incubation en chambre anaérobie ou en sachet individuel.
 - Sortir une galerie **API 20 A** de son emballage et la mettre dans une boîte individuelle d'incubation préalablement humidifiée avec 5 ml d'eau environ.
 - Noter les références de l'examen sur la languette latérale de la boîte.

- A l'aide d'une pipette, inoculer la galerie avec **API 20 A medium** ensemençé, en évitant la formation de bulles (cf schéma) et en inclinant légèrement la galerie.
- pour le test **GEL**, remplir tube et cupule
- pour le test **IND**, remplir seulement le tube avec le **API 20 A medium** et remplir la cupule avec de l'**huile de paraffine**, pour éviter l'évaporation de l'indole formé.
- Refermer la boîte d'incubation et la placer à 35-37° C

- Incubation en jarre anaérobie ronde

- Sortir une galerie **API 20 A** de son emballage et la rouler dans une boîte de Petri vide ; solidariser fond et couvercle avec du ruban adhésif, d'une part entre les deux extrémités de la galerie, d'autre part en son milieu, entre **ARA** et **GEL**
- Noter la référence de l'examen sur la boîte de Petri
- A l'aide d'une pipette, inoculer la galerie avec **API 20 A medium** ensemençé, en évitant la formation de bulles (cf schéma), en ne remplissant que les tubes.
- Placer dans la jarre et incuber à 35-37° C.



- Incubation sous huile de paraffine
 - Sortir une galerie **API 20 A** de son emballage et la mettre dans une boîte individuelle d'incubation préalablement humidifiée avec 5 ml d'eau environ.
 - Noter la référence de l'examen sur la languette latérale.
 - A l'aide d'une **pipette** stérile, inoculer la galerie avec **API 20 A medium** ensemencé, en évitant la formation de bulles (cf schéma) et en inclinant légèrement la galerie.
 - Remplir seulement les tubes avec **API 20 A medium**.
 - Remplir toutes les cupules avec l'**huile de paraffine**.
 - Refermer la boîte et incubé à 35-37° C.
- Le surplus de **API 20 A medium** peut servir :
 - A vérifier la pureté et la viabilité de la souche, en inoculant une gélose profonde ou un jeu de deux boîtes de Pétri, incubées l'une en aérobie, l'autre en anaérobiose.
 - A rechercher des tests complémentaires :
 - inoculer un bouillon glucosé pour une chromatographie en phase gazeuse des acides gras produits.
 - ajouter à l'ampoule 1 ou 2 gouttes de KNO_3 (6 mg/ ml) pour étudier la réduction des nitrates, révéler la réaction avec les réactifs **NIT 1** et **NIT 2** (API # 7044 et 7045) après 24 heures d'incubation

3. Lecture des galeries

Beaucoup de bactéries anaérobies donnent en 24 heures une réponse claire facile à interpréter, mais certaines souches ont une croissance lente et ne sont identifiables qu'après 48 heures d'incubation.

Après 24 heures d'incubation, observer les réactions ne nécessitant pas l'addition de réactifs.

- Si les réactions ont donné une réponse satisfaisante, ajouter les réactifs, lire les résultats conformément au **Tableau de Lecture**, remplir la **fiche de résultats** et faire l'identification définitive du germe en cause.
- Autrement, réincuber la galerie et faire l'identification seulement après 48 h d'incubation.

4. Interprétation

- A l'aide du **Tableau d'identification**, comparer le profil biochimique obtenu avec les profils moyens des taxons de la base de données. Pour faciliter cette comparaison, on peut faire glisser la **fiche de résultats** sur le **Tableau**, les dimensions étant identiques.

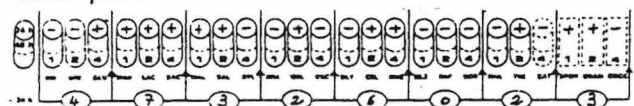
- Le codage du profil biochimique en **PROFIL NUMERIQUE** (cf infra) permet d'utiliser deux autres moyens d'identification :

- Le **Catalogue Analytique** qui comprend près de 2 100 profils et indique pour chacun d'entre eux des informations complémentaires.
- Le **Service Aide au Diagnostic** qui permet d'obtenir informations et conseils sur les profils non trouvés dans le catalogue.

Codage des profils

- La **feuille de résultats** reproduit le dessin de la galerie **API 20 A** avec ses 20 tests, plus la réaction de la catalase et 3 tests de morphologie : SPOR pour spore (+,-), GRAM (+,-) et COCC pour coccus (+,-). Ces tests sont répartis en groupes de 3 et un nombre (1, 2 ou 4) est affecté à chaque test.
- En additionnant, dans chaque groupe, les nombres qui correspondent aux réactions POSITIVES, on obtient 8 chiffres qui forment le **profil numérique**.

Exemple :



4 732 602-3 *Clostridium septicum*

5. Elimination du matériel utilisé

Après utilisation, ampoules, boîtes, pipettes et galeries doivent être décontaminées par immersion dans de l'eau de Javel, autoclavage ou incinération.

Contrôle de qualité

Les milieux, galeries et réactifs font l'objet de contrôles systématiques de qualité aux différentes étapes de leur fabrication. Un contrôle bactériologique est de plus réalisable au laboratoire avec les trois souches suivantes :

1. *Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC 8492
2. *Clostridium perfringens* ATCC 13124
3. *Clostridium tertium* ATCC 19405

	IND	URE	GLU	MAN	LAC	SAC	MAL	SAL	XYL	ARA	GEL	ESC	GLY	CEL	MNE	MLZ	RAF	SOR	RHA	TRE	CAT
1	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	V	+	+	+	-	+	+	+
2	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-
3	-	-	+	+	+	+	+	+	V	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-

RÉFÉRENCES

DOWELL V.R., HAWINS T.M.
Laboratory methods in anaerobic bacteriology.
(1974) CDC Lab. Manual. Center for Disease Control, Atlanta Ga.
Dew Publication N° CDC 74-8272.

DRUGEON H., BILLAUDEL S., COURTIEU A.L.
Utilisation d'une microgalerie pour l'identification des bactéries anaérobies.
(1977) Ann. Biol. Clin. 35, 409-414.

ISSERS L., HARALAMBIE E.
Experiences with the API 20 A System in routine species identification of anaerobes.
(1977) Zbl. Bakt. Hyg. I Abt. A. 238, 394-408.

GROSCHER D.
Erfahrungen mit der Freretschen Anaerobenkammer im klinischen Laboratorium.
(1974) Zbl. Bakt. Hyg. I Abt. A. 238, 51-55.

GUILLERMET F.N., NARDON P., DUMONT J., DESBRESLES A.M.B.
Biochimie des bactéries anaérobies.
(1976) Rev. Inst. Pasteur. Lyon, 9, 4, 275-289.

HOLDEMAN, KILLIAN V., MOORE W.E.C.
Anaerobe laboratory manual.
(1973) Virginia Polytechnic Institute and State Laboratory.
2nd edition, Blacksburg, Va.

MOORE H.B., SUTTER V.L., FINEGOLD S.M.
Comparison of three procedures for biochemical testing of anaerobic bacteria.
(1975) J. Clin. Microbiol. 1, 1, 15-24.

NORD C.E., DAHLBACK A., WADSTROM T.
Evaluation of a test kit for identification of anaerobic bacteria.
(1973) Med. Microbiol. Immunol. 161, 239-242.

SEDALLIAN A., GUILLERMET F.N.
Glucides et Bactéroides groupe fragilis : Intérêts d'une microméthode.
(1976) Rev. Inst. Pasteur Lyon. 9, 4, 263-274.

SIROT J., CHRISTOL D., GUTMAN G., CLUZEL R., CLUZEL R., CHANAL M., DUVAL J., DURIEUX R., SOUSSY C.J., FLEURETTE J., ROS A., FLANDROIS J.P., BRUN Y.
Fréquence d'isolement des bactéries anaérobies en milieu hospitalier.
(1976) Med. Malad. Infect. 6, 2, 58-65.

STARR S.E., THOMPSON F.L.S., DOWELL V.R., BALLOWS A.
Micromethod system for identification of anaerobic bacteria.
(1973) Appl. Microbiol. 25, 5, 713-717.

SUTTER V.L., ATTEBERG H.R., ROSENBLATT J.E., BUCKNELL K.S., FINEGOLD S.M.
Anaerobic Bacteriology Manual.
(1972) Wadsworth Hosp. Center, Veterans Admin., Los Angeles.

TABLEAU DE LECTURE

TESTS	SUBSTRATS	REACTIONS/ENZYMES	RESULTATS	
			NEGATIF	POSITIF
IND	Tryptophane	Formation d'indole	1 gtte XYL - mélanger + 1 gtte d' EHR / 5 mn Jaune	Rouge
URE	Urée	Uréase	Jaune-orangé	Rouge
GLU MAN LAC SAC MAL SAL XYL ARA	Glucose Mannitol Lactose Saccharose Maltose Salicine Xylose Arabinose	Acidification Acidification Acidification Acidification Acidification Acidification Acidification Acidification	BCP (1) Pourpre Jaune vert-jaune	
GEL	Gélatine	Hydrolyse (protéase)	Pas de diffusion du pigment (2)	Diffusion du pigment noir (2)
ESC	Esculine Citrate de Fer	Hydrolyse (β glucosidase)	Jaune (3) Fluorescence	Brun-noir (3) Non-fluorescence
GLY CEL MNE MLZ RAF SOR RHA TRE	Glycérol Cellobiose Mannose Mélézitose Raffinose Sorbitol Rhamnose Tréhalose	Acidification Acidification Acidification Acidification Acidification Acidification Acidification Acidification	BCP (1) Pourpre Jaune - Vert-jaune	
CAT		Catalase	Après 30 mn à l'air libre 2 gttes H ₂ O ₂ dans 1 tube positif Absence de bulles Présence de bulles	
SPOR		Spores	Absence	Présence
GRAM		Coloration de gram	Rose	Violet
COCC		Morphologie	Bacille	Coque

(1) Le **BCP** peut être décoloré par réduction. Révéler alors la réaction d'acidification à l'aide d'une goutte de réactif **BCP** (API # 7051)

(2) En incubation en jarre ronde, le pigment diffuse seulement dans la partie inférieure du tube.

(3) La coloration brun-noir se développe parfois seulement à l'air libre : en tenir compte pour la lecture.

La coloration noire peut être due à la formation de FeS à partir des protéines du milieu et du citrate de fer. Une production faible est limitée à la partie inférieure du tube ; une production importante oblige à recourir à la lecture en lumière U.V.



ESC +
H₂S -



ESC -/+
H₂S -/+



ESC -
H₂S +

TABLEAU DE POURCENTAGES (% des réactions positives après 24-48 h à 35-37 °C)

Uapi 20 A

	IND	URE	GLU	MAN	LAC	SAC	MAL	SAL	XYL	ARA	GEL	ESC	CXY	CEL	MNE	MUF	FAR	SPB	HFA	TRE	POL	Other	Total
Bacteroides asaccharolyticus	82	0	0	0	0	0	0	0	0	0	24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0
Bacteroides bivius	0	0	99	0	99	0	99	0	0	0	75	0	92	0	99	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteroides capillosus	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	25	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteroides corrodens	0	99	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteroides disiens	0	0	99	0	0	0	97	0	0	0	76	0	0	0	76	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteroides distasonis 1	0	0	99	0	99	99	95	95	80	6	1	40	40	60	95	60	99	1	95	95	99	0	0
Bacteroides distasonis 2	0	0	99	0	99	70	60	6	99	70	1	60	1	9	99	5	99	1	85	29	3	0	0
Bacteroides eggerthii	99	0	99	0	99	0	99	0	93	99	0	80	0	80	99	0	0	0	99	0	86	0	0
Bacteroides fragilis	0	0	99	0	99	99	99	0	99	0	1	99	1	30	99	0	99	0	1	0	99	0	0
Bacteroides intermedius	33	0	99	0	0	33	99	0	0	0	80	1	6	1	83	0	33	0	0	0	0	0	0
Bacteroides melaninogenicus	0	0	99	0	99	99	99	0	0	0	40	0	28	10	99	0	99	0	0	0	0	0	0
Bacteroides oralis	0	0	99	0	82	88	99	64	11	0	22	71	7	78	99	0	82	0	44	6	0	0	0
Bacteroides ovalis	96	0	99	10	99	98	99	88	99	97	40	91	0	99	99	40	99	4	95	91	66	0	0
Bacteroides ruminicola brevis	0	0	99	0	99	99	99	86	99	99	21	57	0	83	99	6	99	7	76	0	0	0	0
Bacteroides rumin. ruminicola	0	0	88	66	77	77	77	88	77	77	0	66	11	77	55	0	88	66	11	0	0	0	0
Bacteroides thetaiotaomicron	98	0	97	0	98	98	94	22	96	99	5	88	0	68	99	26	99	0	93	93	65	0	0
Bacteroides uniformis	97	0	99	0	98	99	92	92	99	92	4	99	0	99	99	1	96	0	58	1	8	0	0
Bacteroides vulgatus	0	0	99	0	99	96	99	0	96	93	11	29	0	5	99	0	96	0	82	4	3	0	0
Fusobacterium mortiferum	0	0	99	0	0	70	11	66	7	0	7	0	41	25	66	0	66	0	0	23	5	0	0
Fusobacterium necrophorum	99	0	12	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fusobacterium nucleatum	97	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fusobacterium varium	73	0	77	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	72	0	0	0	0	0	0	0	0
Veillonella parvula	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	25	0	0
Peptococcus asaccharolyticus	99	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	15	0	100
Peptococcus saccharolyticus	0	66	99	0	16	0	0	0	0	0	16	99	0	99	0	0	0	0	16	90	0	100	100
Peptococcus spp	0	9	0	0	0	0	0	0	0	15	1	0	0	0	3	0	0	0	0	0	48	0	100
Peptostreptococcus spp	1	1	14	0	0	0	3	1	0	0	9	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	100
Streptococcus intermedius	0	0	99	20	99	99	99	95	0	0	40	0	90	99	6	26	0	0	99	0	0	100	100
Streptococcus spp	0	0	99	18	27	99	99	36	0	0	3	0	8	99	1	1	0	9	90	0	0	100	100
Propionibacterium acnes	90	0	99	36	0	0	0	0	0	0	74	0	99	0	99	0	18	0	0	95	0	100	0
Propionibacterium granulosum	0	0	99	43	0	93	31	0	0	0	3	0	99	0	99	12	56	0	3	75	90	0	100
Bifidobacterium adolescentis 1	0	0	99	90	99	99	99	99	99	99	20	80	0	99	90	60	99	6	0	80	0	0	100
Bifidobacterium adolescentis 2	0	0	99	1	99	99	99	33	-73	73	1	1	0	33	83	50	83	16	0	1	0	0	100
Lactobacillus acidophilus	0	0	99	5	82	99	94	99	0	0	7	30	16	99	99	0	16	11	7	77	0	0	100
Lactobacillus catenaeforme	0	0	99	0	60	99	90	99	0	0	0	0	10	98	99	0	0	0	0	0	0	0	100
Lactobacillus fermentum	0	0	99	0	62	87	75	0	37	50	0	0	12	0	25	0	62	0	0	0	0	0	100
Lactobacillus jensenii	0	0	99	0	0	90	95	95	1	0	0	50	0	95	99	25	0	0	0	75	0	0	100
Lactobacillus minutus	0	0	95	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	100
Eubacterium lentum	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	60	0	100
Eubacterium limosum	0	0	99	72	0	0	0	0	1	1	6	10	12	0	3	0	0	0	0	0	1	0	100
Actinomyces israelii	0	0	99	85	80	98	99	92	84	45	0	28	13	85	71	13	79	28	7	79	1	0	100
Actinomyces meyeri	0	0	93	0	80	93	53	0	66	20	0	0	73	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100
Actinomyces naeslundii	0	5	99	66	74	99	94	78	0	0	16	12	47	57	88	5	92	15	0	66	25	0	100
Actinomyces odontolyticus	0	0	99	0	24	99	99	86	33	0	24	0	77	0	9	0	3	0	66	0	10	0	100
Actinomyces viscosus	0	0	99	0	64	99	99	21	0	0	14	0	62	21	86	0	94	0	0	7	76	0	100
Clostridium barati	0	0	99	8	75	99	83	99	0	0	0	75	54	99	99	0	0	8	8	8	0	99	100
Clostridium bifermentans	99	1	92	0	0	0	64	10	0	0	90	5	3	0	35	0	0	4	0	0	0	99	100
Clostridium botulinum gr. I	0	0	72	0	0	7	81	0	0	0	99	0	1	0	7	1	0	23	0	61	0	99	100
Clostridium botulinum gr. II	0	0	99	0	0	99	99	0	0	0	99	0	33	0	99	33	0	99	0	65	0	95	100
Clostridium cadaveris	99	0	89	0	0	7	5	0	0	0	92	0	0	0	40	0	0	1	0	5	0	99	100
Clostridium clostridioforme	0	0	88	0	77	99	99	88	91	94	5	77	0	77	99	82	94	1	88	88	33	66	50
Clostridium difficile	0	0	99	83	0	0	0	22	5	0	44	26	0	5	66	83	0	5	0	5	0	99	100
Clostridium glycolicum	0	0	99	0	0	0	52	0	95	0	0	0	71	0	0	0	0	95	0	0	0	99	100
Clostridium innocuum	0	0	99	99	0	42	0	99	5	15	1	21	0	99	99	4	0	0	0	26	0	99	100
Clostridium paraputrificum	0	0	99	0	99	92	99	99	0	0	0	99	0	99	99	0	7	7	0	21	0	99	100
Clostridium perfringens	0	0	99	0	88	91	99	1	0	0	99	1	79	4	99	0	16	16	0	75	0	84	100
Clostridium ramosum	0	0	99	78	99	99	99	99	0	0	0	27	0	99	99	0	75	0	57	94	0	92	50
Clostridium septicum	0	0	99	0	99	0	94	94	0	0	99	10	0	76	99	0	0	0	0	84	0	99	100
Clostridium sordellii	99	99	95	0	0	0	90	0	0	0	99	0	0	0	4	0	0	4	0	0	0	99	100
Clostridium sporogenes	0	0	99	0	0	0	84	0	0	0	99	58	0	0	0	0	0	0	58	0	0	99	100
Clostridium tertium	0	0	99	99	99	99	99	99	58	0	0	17	0	99	99	64	0	0	88	0	0	99	100
Clostridium beijeri / butyricum	5	0	99	20	94	99	99	99	97	82	29	75	75	99	99	5	95	15	5	88	0	99	100
Clostridium spp	5	5	0	1	0	0	0	0	0	0	94	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	99	100

Légende : 0-19 % de résultats positifs

20-79 % de résultats positifs

☐ 80-100 % de resultats positifs

Uapi 20 A

Identification :

api 20 A

Identification :

Annexe IV.

Profils Api obtenus pour différentes souches
isolées à partir des milieux A, B et C.

24 h
48 h

IND URE GLU MAN LAC SAC MAL SAL XYL ARA GEL ESC GLY CEL MNE MLZ RAF SOR RHA TRE CAT SPOR GRAM COCC

24 h

48 h

- spores : forme / shape

- taille des cellules / cell size

- mobilité / motility

- pigmentation

- hémolyse / haemolysis

- ...

Uapi 20 A

REF. : Patient :
Date : Origine/Source :
Dr. : Service/Dept :

Identification :

24 h

48 h

IND URE GLU MAN LAC SAC MAL SAL XYL ARA GEL ESC GLY CEL MNE MLZ RAF SOR RHA TRE CAT SPOR GRAM COCC

24 h

48 h

- spores : forme / shape

- taille des cellules / cell size

- mobilité / motility

- pigmentation

- hémolyse / haemolysis

0001 20 A

api 20 A

REF. : Patient :
Date : Origine/Source :
Dr. : Service/Dept :

Identification :

- ANNEXE V -

METHODES ANALYTIQUES

SUCRES TOTAUX (Solubles)

1. - EXTRACTION

- 0.200 g fourrage + 100 ml eau permutée
- agitation 1 heure
- filtration

2. - DOSAGE

Réactif

- 1 g anthrone
- 760 ml H_2SO_4 concentré
- 330 ml H_2O permutée

lire à 620 mn

Came 20 échantillons/heures

- bain marie 95° C
- Anti retour
- bobine (réfrigérant)

- | | | |
|---------------|--------|------------------|
| - air | —————→ | bleu |
| - échantillon | —————→ | orange |
| - réactif | —————→ | 2 verts acidflex |
| - repompage | —————→ | violet acidflex |

avant le passage du réactif, faire circuler durant 5 mn la solution suivante :

- 760 ml H_2SO_4 concentré
- 330 ml H_2O

ceci évite la précipitation de l'anthrone

DOSAGE AZOTE KJHELDHAL

Méthode chaîne d'analyse

1. PREPARATION DES ECHANTILLONS

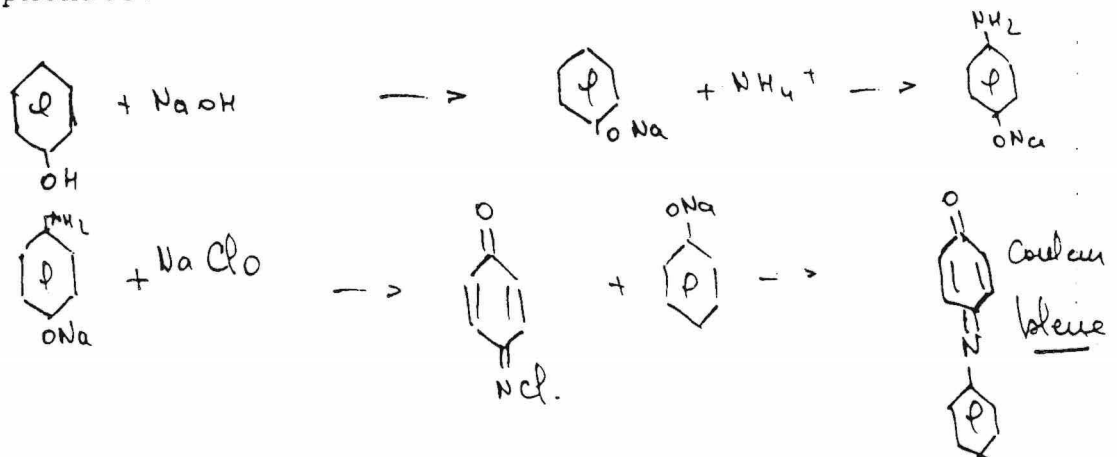
La prise d'échantillon, après avoir été pipetée ou pesée exactement est transvasée dans un matras ou tube à minéralisation. On ajoute une ou deux pastilles catalyseur et une quantité d'acide sulfurique pur, en fonction de la quantité à minéraliser et de la dilution finale. Après refroidissement, on dilue à volume connu.

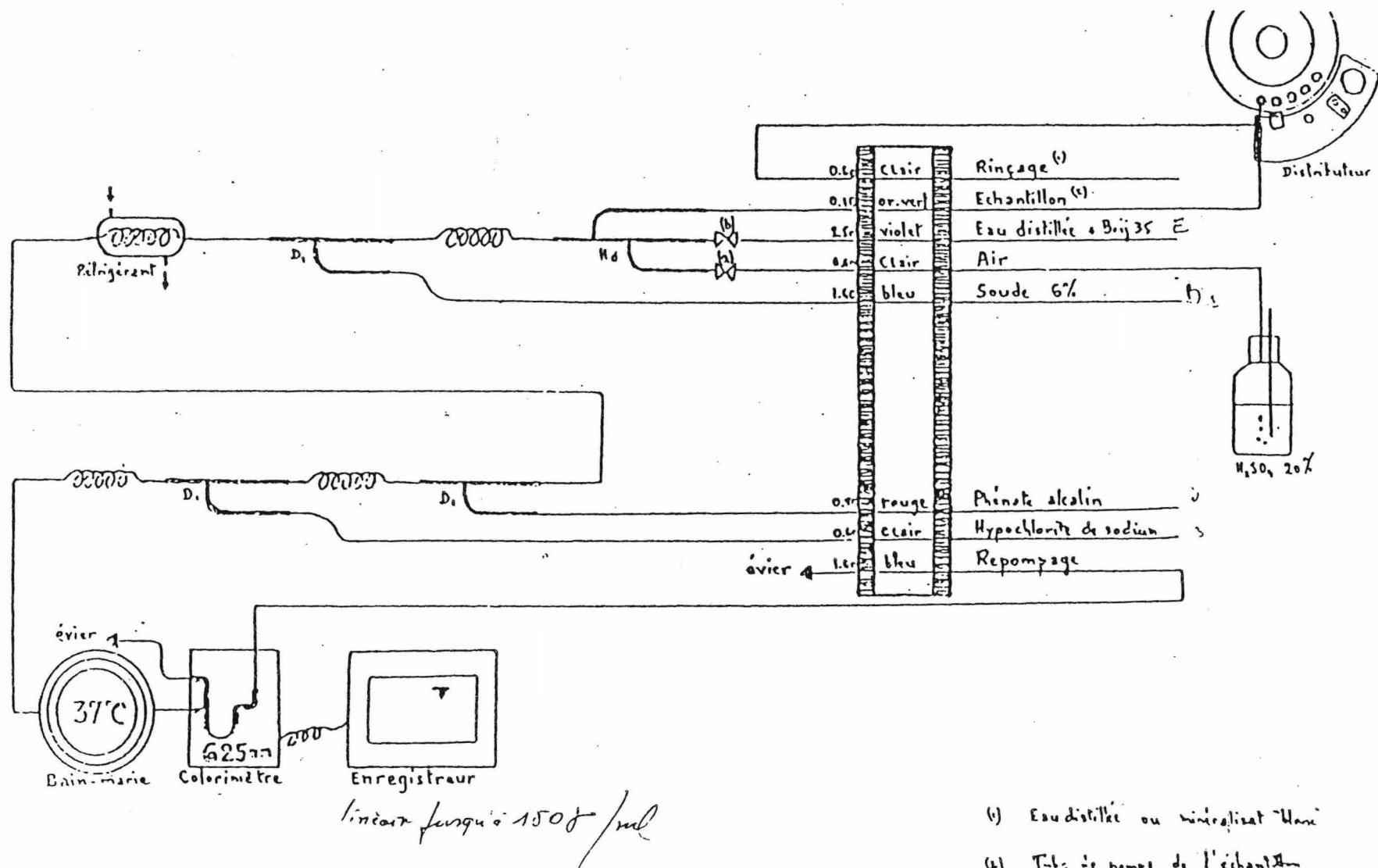
Les solutions ayant environ 5 % d' H_2SO_4 sont stables plusieurs semaines (faire attention à l'évaporation).

2. PRINCIPE DE LA METHODE

Réaction

Les substances organiques sont minéralisées (hydrolyse₂-acide). Leur azote est fixé sous forme de sulfate d'ammonium $(\text{NH})_2 \text{SO}_4$. L'ion ammonium se fixe en para sur une molécule de phenate alcalin, la réaction étant catalysée par l'hypochlorite. Il se forme ensuite une coloration bleue, par condensation d'une molécule P-aminée et d'une molécule de phénate.





Dispositifs anticorrosion

(2) 15.4 or. noir

(3) 15.2 or. vert

(1) Eau distillée ou minéralisée "Hane"

(4) Tubs de pompe de l'échantillon

or. bleu

or. vert

or. jaune

} selon la concentration

Dosage Azote Ammoniacale

Méthode CONWAY 1950-57

Principe

Absorption par diffusion gazeuse de la substance volatile venant de l'enceinte extérieure.

Produits utilisés

- K_2CO_3 50% (Produit 250g + 250ml poudre + eau) 50%
- H_3BO_3 1%
 - 10g H_3BO_3 dans 1 fiole de 1 litre
 - 200 ml Alcool à 95°
 - 700 ml eau distillée
 - 10 ml indicateur { V.B. 0,033g% ds Alcool à 95%
 - R. H. 0,066g%

Compléter à 1000 ml

- HCl $\frac{N}{50}$ 0,833 ml / 500 ml
- oxalate d'ammonium 200 g/ml $(NH_4)_2C_2O_4 \cdot H_2O$
 doit 507,6 mg / 500 ml
 + 5,0 ml H_2SO_4 RP

Dosage

- 1 - dans enceinte centrale cellule $\Rightarrow$ 2 ml H_3BO_3 1%
- 3 - dans enceinte extérieure " $\Rightarrow$ 1 ml Solution à gliser provenant extraction ensilage (après macération 50g ensilage dans 500cc H_2O pdt 3 H00)
- incliner la cellule
- 2 - introduire dans enceinte extérieure en glissant

horizontalement le couvercle pour faire apparaître une petite ouverture

(1 ml K_2CO_3 saturé) remettre rapidement le couvercle en place

- mélanger dans l'enceinte extérieure en tournant 10 à 20 fois pendant 3000.

- Titrer le contenu de la chambre intérieure par HCl $N/50$ ou $N/70$

virage du vert $\rightarrow$ rouge pâle persistant.

Calculs

- 1 ml HCl $N/50$

$\rightarrow 280 \text{ } \gamma \text{ d'N}$

- $N/70$

$\rightarrow 200 \text{ } \gamma \text{ d'N}$

Correction pour le blanc

Dans les gm eds, en remplaçant le jus d'écailage (l'extrait d'écailage) par 1 ml d'eau distillée. Résultat de ce dosage (ml HCl) à décaler de celui correspondant à la prise d'écailage.

Témoin avec 1 ml d'oxalate 200 γ /ml.

DOSAGE COLORIMETRIQUE de L'ACIDE LACTIQUE

BARKER

Methods in Enzymology 1957

PRINCIPE

La dégradation de l'acide lactique par l'acide sulfurique concentré, à chaud donne un acétaldéhyde qui, en présence de para-hydroxydiphényl³ donne une coloration violette.

MATÉRIEL ET REACTIFS

- Spectrophotomètre
- acide trichloracétique
- $SO_4 Cu$, $5 H_2O$
- H_2SO_4 R.P.
- para hydroxydiphényl³
- Lithium caustique.

	dosage	pipette
2 g/ml	→ 25 cm ³	5 cm ³
4 g/ml	→ 25 cm ³	10 cm ³
6 g/ml	→ 50 cm ³	→ 30 cm ³
8 g/ml	→ 50 cm ³	→ 40 cm ³
10 g/ml	→ 100 cm ³	1 cm ³
		solution 10 g/ml

PRÉPARATION DES REACTIFS

- solution T.C.A. / Acide trichloracétique 5%
 $SO_4 Cu$ $5 H_2O$ 2%
- $SO_4 Cu$, $5 H_2O$ 16%
- H_2SO_4 1% $\frac{1}{4}$
- Lactate de Lithium

50g d'acide lactique + 50cc d'eau
Neutraliser par LiOH au fixateur de rouge de
phénol. Ajouter 4 vol d'éthanol caustique, filtrer

Rincer le précipité avec du P. éthanol 95°
Sécher ³ ₂ vide. Pour recristalliser, dissoudre dans
un minimum d'eau. Ajouter de P. à P. cool. Sécher
Le Pactate de Lithium est anhydre et non hygroscopique

- Solution ita Pou acide lactique 30 mcg (préparé
avant l'emploi à partir d'une solution à 1000 μ /ml
ou mcg/ml

- Acide Lactique 1000 μ /ml
106,6 mg de lactate de Lithium
20 ml H_2SO_4 N
 H_2O q. s. p. 100 ml

Cette solution se conserve indéfiniment au froid.
celle de 30 μ /ml se conservant que 9/9 jours

- Solution Parahydroxydiphényl

Dissoudre à saturation ^{3 spatules} dans le P. le solide
NaOH 1,5 N (37°). Filtrer sur verre. Laisser une nuit
à +4°C pour cristalliser. Filtrer. Reprendre par
un volume de NaOH 1,5 N
saturation à froid.
(Se conserve en flacon brun.)

MODE OPÉRATOIRE

- Filtrer le fus d'extrémité
à 2 ml de ce fus ajouter 18 ml de TCA 50%
agiter et filtrer sur filtres plissés après avoir
ajouté environ 2 g de chaux en poudre.

dilution
au
1/10

- Autres dilutions possible - sur le Li.Plat T.C.R.
 au $\frac{1}{20}$ = 2 ml³ de Li.Plat + 2 ml³ H₂SO₄ 1%
 au $\frac{1}{50}$ = 2 ml³ " + 8 ml³ "
 au $\frac{1}{100}$ = 1 ml³ " + 9 ml³ "
 au $\frac{1}{200}$ = 1 ml³ " + 19 ml³ "

- A partir de P_{ure} ou P_{au} de ces dilutions
 - prélever 1 ml³ (en double)

ajouter / 1 goutte de SO₄ Cu 16%
 6 ml³ d'H₂SO₄ R.P.

agiter et porter 5 mn au bain marie bouillant
 puis laisser refroidir à 20°C

jaune et Blanc (en double)

Blanc : 1 ml³ H₂O + 6 ml³ H₂SO₄ (R.P.)

jaune : 1 goutte SO₄ Cu + 6 ml³ H₂SO₄ R.P. + 1 ml³ So²⁺ Etalon
 puis au bain marie bouillant 5 mn.

- COLORATION

Après refroidissement à 20°C

ajouter : 3 gtes de solution de peroxyde d'hydrogène diluée -

agiter et laisser 30 mn au bain marie à 30°-37°

ajouter à nouveau une gte de p. Hydroxydiphényl
 et laisser développer encore 30 mn. au bain marie à 30°C.

S'il y a une précipité le dissoudre en plaçant
 le tube 30 secondes de l'eau bouillante et
 refroidir dans un courant d'eau.

Mesurer la densité optique à 560-70 mμ.

Dosage des acides gras volatils et des alcools dans les ensilages par chromatographie en phase gazeuse

J.P. JOUANY

Laboratoire de la Digestion des Ruminants

Pour déterminer les caractéristiques fermentaires des ensilages en liaison avec leur qualité de conservation, il est nécessaire de connaître leur composition et leur teneur en acides gras volatils et en alcools. Nous présentons ici le protocole de la méthode mise au point au CRZV qui est déjà utilisée dans un certain nombre de laboratoires d'analyses. Le détail de la mise au point de la méthode est en cours de publication.

pendant une nuit. Le jus est extrait directement par pressage de l'échantillon d'ensilage. Lorsque cette technique n'est pas applicable, on obtient un extrait aqueux après macération de l'échantillon en présence d'eau. Dans ce cas les résultats sont moins précis car les produits à doser sont fortement dilués. Pour cette raison, les jus doivent être extraits le plus souvent possible par pressage.

I. Obtention des échantillons de jus d'ensilage

Méthode préconisée par l'INRA (laboratoire des Aliments du C.R.Z.V. et laboratoire d'Analyses Végétales de Bordeaux-Pont-de-la-Maye)

I. 1 - Prélèvement d'un échantillon moyen d'ensilage

Le prélèvement d'ensilage doit être fait obligatoirement sur un front de coupe rafraîchi, en une dizaine d'endroits afin d'être le plus représentatif du silo (il est toutefois conseillé de ne pas prélever à la périphérie du tas). Entre 1 et 5 kg d'ensilage ainsi prélevés sont ensuite fortement compactés dans un sac étanche de manière à chasser le maximum d'air, avant d'être hermétiquement clos. Il est alors rapidement congelé si l'analyse n'est pas immédiatement effectuée. Placé en boîte isotherme, et si possible en présence de carboglace (1), l'échantillon peut être expédié par la poste pour analyse, à condition que le temps de transport n'excède pas 48 heures.

I. 2 - Extraction du jus d'ensilage

La décongélation de l'échantillon d'ensilage s'effectue sans ouvrir le sac, à température ambiante (entre 15 et 20°C)

(1) CARBOXYQUE FRANÇAISE, 91, rue du Faubourg St Honoré - 75008 Paris

I.2.1. Le pressage

On extrait le jus à l'aide d'un petit presseur, type presseur à vin ou à fruits. On presse 3 à 4 kg d'ensilage afin d'obtenir un échantillon moyen de jus bien représentatif. Une quantité minimale de 500 g doit être traitée. Il faut s'assurer que la pression appliquée est modérée et éviter tout surpressage. Entre deux extractions de jus d'ensilage provenant d'échantillons différents, quelques précautions doivent être prises : bien brosser le presseur afin qu'il ne reste pas de particules ; ne pas récupérer la première partie du jus d'écoulement, afin que celui-ci serve à rincer l'appareil et à éviter toute contamination avec l'échantillon précédent.

I.2.2. La macération

Certains ensilages ne peuvent pas être pressés (cas des ensilages de maïs dont la teneur en matière sèche, > 35 p.100, est trop élevée ou cas des ensilages de pulpes surpressées de betteraves). Ces ensilages doivent alors être mis à macérer : on pèse environ exactement 200 g d'ensilage dans un bûcher de 1 litre dans lequel on ajoute un volume d'eau connu, correspondant approximativement au volume représenté par l'échantillon d'ensilage. On agite de façon à mélanger intimement la phase solide à la phase liquide ; le contact est maintenu pendant une nuit à + 4°C. Les mélanges provenant d'ensilage de maïs sont ensuite filtrés alors que les ensilages de pulpes de betteraves sont pressés dans de la gaze.

I. 3 - Préparation des échantillons avant l'analyse chromatographique

Les jus obtenus par pressage ou par macération sont

immédiatement stabilisés par une solution aqueuse contenant le mélange H_3PO_4^* ortho (5 p.100 v/v) et Hg Cl_2^* (1 p.100 P/V) dite "conservateur", à raison de 10 ml de jus et 1 ml de conservateur. Ils doivent être ensuite analysés extemporanément ou congelés et conservés à -15°C . Au moment de l'analyse, les échantillons frais ou décongelés sont centrifugés à environ 2000 g pendant 5 minutes à $+4^\circ\text{C}$.

II. Analyse chromatographique

II. 1 - Matériel

Il est nécessaire d'utiliser un chromatographe en phase gazeuse muni d'un détecteur à ionisation de flamme. Le chromatogramme est inscrit sur un enregistreur dont la sensibilité est de 1 mv en pleine échelle. Afin d'obtenir des résultats précis il est recommandé de mesurer la surface des pics à l'aide d'un intégrateur électronique. Dans le cas où l'on souhaiterait automatiser l'ensemble de la chaîne analytique (cf. 2-6), nous pouvons utiliser un injecteur automatique, à condition de pouvoir protéger les échantillons stockés sur la couronne distribuée contre la perte de substances volatiles.

II. 2 - Colonne

La colonne, en verre, a une longueur de 1,50 m et un diamètre intérieur de 2,17 mm. La tête de colonne, à l'intérieur de laquelle les liquides à analyser sont injectés, est amovible. Un rodage sphérique 13/5 (Sovirel) maintenu en place par une pince à vis modèle "ROTULEX" (Sovirel), permet d'éviter les fuites de gaz au niveau de la jonction (fig. 1). Ainsi la tête de colonne sera changée toutes les 50 injections ce qui permet d'éliminer les dépôts non volatils contenus dans les échantillons et éviter les phénomènes importants d'adsorption à ce niveau.

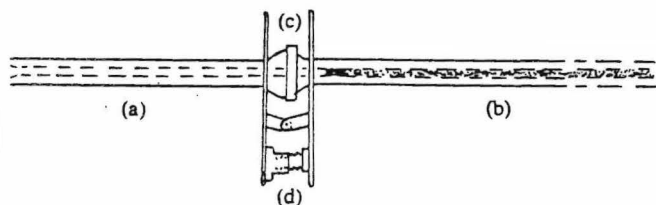


FIG. 1 : partie amovible de la colonne chromatographique
a) tête de colonne vide à changer toutes les 50 injections.
b) colonne chromatographique garnie
c) rodage sphérique
d) pince à vis

Le garnissage de la colonne est constitué de chromosorb V-AW-60-80 mesh, imprégné de 10 p.100 (P-P) de SP 1200 Supelco (2) et de 1 p.100 (P/P) de H_3PO_4^* ortho. Les cotons

de verre placés aux extrémités de la colonne sont traités par H_3PO_4^* dispersé dans de l'acétone* (1 p.100 V/V). Les colonnes sont conditionnées à 160°C pendant une nuit sous un flux d'azote de 30 ml/mn. Ces colonnes placées dans les conditions définies ci-après doivent posséder environ 3000 plateaux théoriques pour le pic d'acide butyrique.

II. 3 - Analyse des acides gras volatils (AGV)

II.3.1. Conditions opératoires

débit des gaz : N_2 (gaz vecteur) : 30 ml par mn
 H_2 (détecteur) : 40 ml par mn
air (détecteur) : 400 ml par mn

température : four : 125°C
détecteur : 155°C
injecteur : 165°C

volume injecté : 0,5 μl .

II.3.2. Préparation de l'échantillon à injecter.

A 1 ml de l'échantillon contenant le conservateur (cf. 2.1.3) on ajoute 0,1 ml d'étalon interne constitué d'une solution à 1 p.100 (P/V) d'acide 4-méthyl valérique** ultrasonnée sans élévation de température à 20 kcycles sec pendant 5 minutes. Le tout est soigneusement mélangé et injecté directement dans la partie amovible de la tête de colonne.

II.3.3. Durée de l'analyse

Environ 8 minutes (fig. 2).

II. 4 - Analyse des alcools

II.4.1. Conditions opératoires.

Température du four = 80°C . Les autres conditions sont identiques à celles décrites pour l'analyse des AGV.

II.4.2. Préparation de l'échantillon et injection.

1 ml de l'échantillon contenant le conservateur est mélangé à 0,1 ml d'étalon interne constitué d'une solution à 2 p.100 (V/V) d'isobutanol*. L'ensemble est agité et injecté à raison de 0,5 μl dans la tête de colonne amovible.

II.4.3. Durée de l'analyse

Elle dépend de la présence d'AGV et d'acide lactique dans les échantillons. Lorsqu'il y a des quantités non négligeables d'acide butyrique et surtout d'acide lactique, le temps d'analyse peut aller jusqu'à 15 mn. Dans ce cas il est recommandé d'effectuer une chromatographie d'alcools entre deux pics de composés non alcooliques de l'injection précédente ce qui permet alors de réaliser deux analyses dans le même temps. La durée minimale d'une analyse d'alcools est de deux minutes dans le cas où il n'y a pas d'autres AGV que l'acide acétique (fig. 3).

* qualité "pour analyse"

2) PACKARD 4. 10, rue Grosse Pierre 94533 Rungis (France)

** qualité pour "chromatographie"

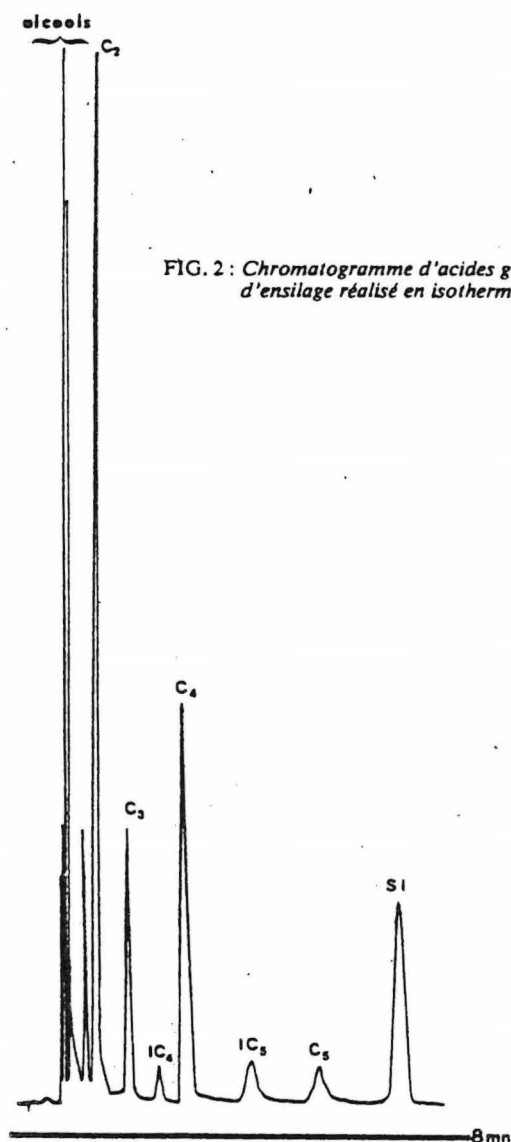


FIG. 2 : Chromatogramme d'acides gras volatils d'ensilage réalisé en isotherme à 125°C.

II. 5 - Calculs

L'analyse quantitative des AGV et des alcools est effectuée par la méthode du standard interne.

II.5.1. Détermination des facteurs de réponse.

L'analyse des solutions étalons A ou B effectuées dans les conditions définies par les paragraphes 2-3 et 2-4 permet de calculer les facteurs de réponse de chaque composé selon la formule suivante :

$$K_a = \frac{s_a}{s} \times \frac{1}{c_a}$$

K_a = facteur de réponse du composé "a".

s_a = surface du pic correspondant au composé "a".

s = surface du pic correspondant à l'étalon interne.

c_a = concentration du composé "a" dans la solution étalon

II.5.2. Calcul des concentrations d'AGV et d'alcools dans les échantillons à analyser

Après avoir injecté les échantillons à analyser, on calcule la concentration de chaque composé dans le jus d'ensilage à partir du chromatogramme correspondant selon la formule :

$$C_a = \frac{S_a}{S} \times \frac{1}{K_a}$$

avec C_a = concentration du composé "a" dans le jus d'ensilage

S_a = surface du pic correspondant au composé "a" lors de l'injection du jus d'ensilage.

S : surface du pic correspondant à l'étalon interne lors de l'injection du jus d'ensilage.

K_a : facteur de réponse du composé "a".

Composition de la solution étalon A

acide acétique (C_2)	6,00 g
propionique (C_3)	1,00 g
isobutyrique (IC_4)	0,125 g
butyrique (C_4)	1,75 g
isovalérianique (IC_5)	0,25 g
valérianique (C_5)	0,25 g

et de la solution B

méthanol (Me)	0,25 g
éthanol (Et)	1,00 g
propanol (pr)	1,00 g
butanol (bu)	0,25 g

Recommandation : Pour éviter les pertes de substances volatiles, il est recommandé de peser rapidement, puis de verser l'alcool considéré dans la fiole jaugée en rinçant avec de l'eau distillée froide (+ 4°C).

Compléter chacune de ces solutions à 1 litre avec de l'eau distillée ; y ajouter ensuite 100 ml de conservateur (H_3PO_4 ortho 5 % V/V + $HgCl_2$ 1 % P/V)

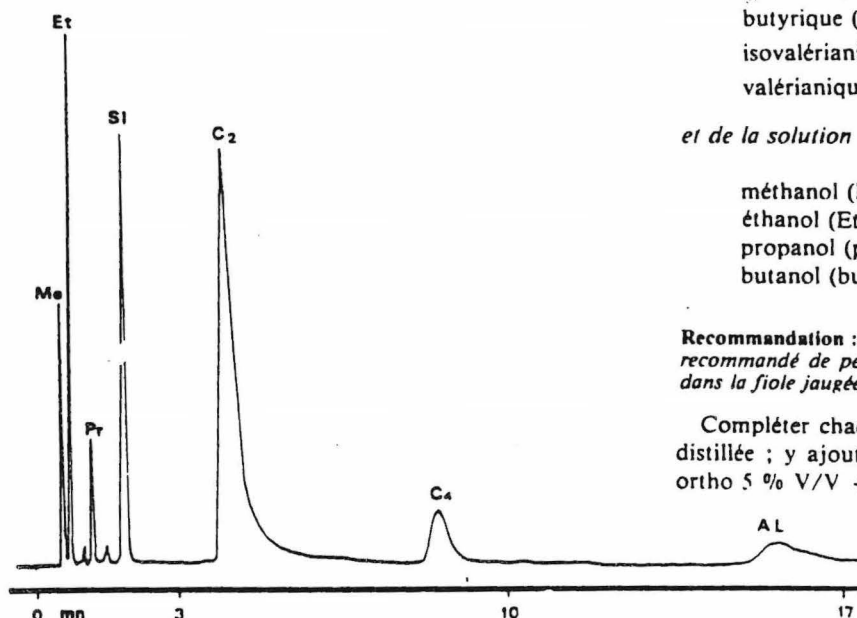


FIG. 3 : Chromatogramme d'alcool d'ensilage en présence d'acides (C_2) butyrique (C_4) et laurique (AL)

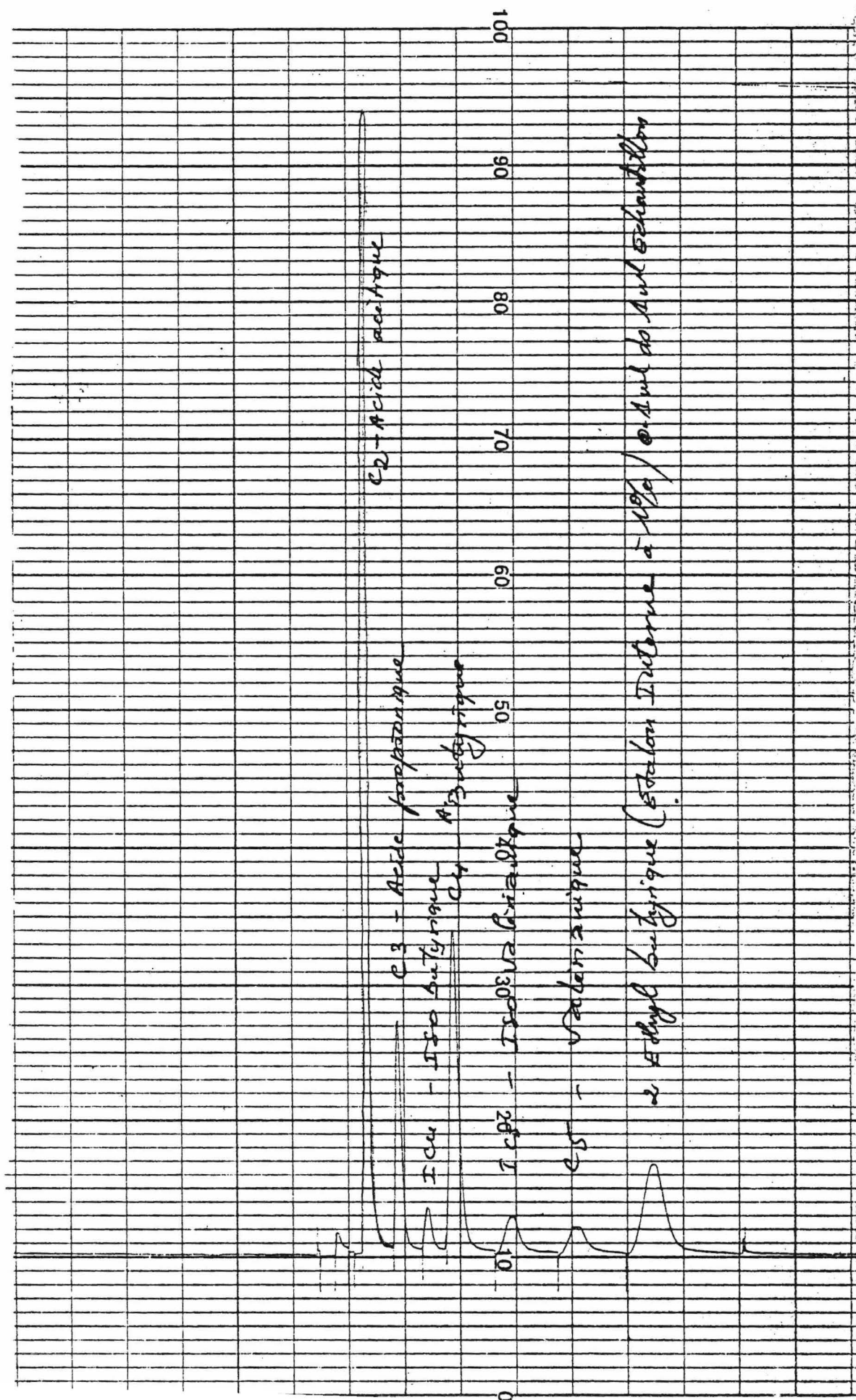
II. 6 - Automatisation de la chaîne d'analyse

L'association d'un injecteur automatique au chromatographe permet de réaliser une chaîne analytique automatique autonome puisque nous n'utilisons pas la programmation de température.

La mise en route de l'injecteur commande l'enregistreur et

l'intégrateur calculeur ; ce dernier identifie l'échantillon en cours d'analyse par son temps de rétention. Le volume injecté, la séquence et la durée de chaque analyse sont programmables. Lorsque l'analyse de l'ensemble des échantillons déposés sur la couronne de l'injecteur (35 échantillons) est terminée, une commande extérieure préalablement programmée, arrête le déroulement du papier de l'enregistreur. Ce système ainsi conçu peut fonctionner en continu jour et nuit et permet d'analyser, en moyenne, 55 échantillons par 24 heures.

Chromatogramme des AGV.



FIGURES

Figure 1 : Vitesse de disparition des glucides solubles de la plante ensilée pendant une semaine.

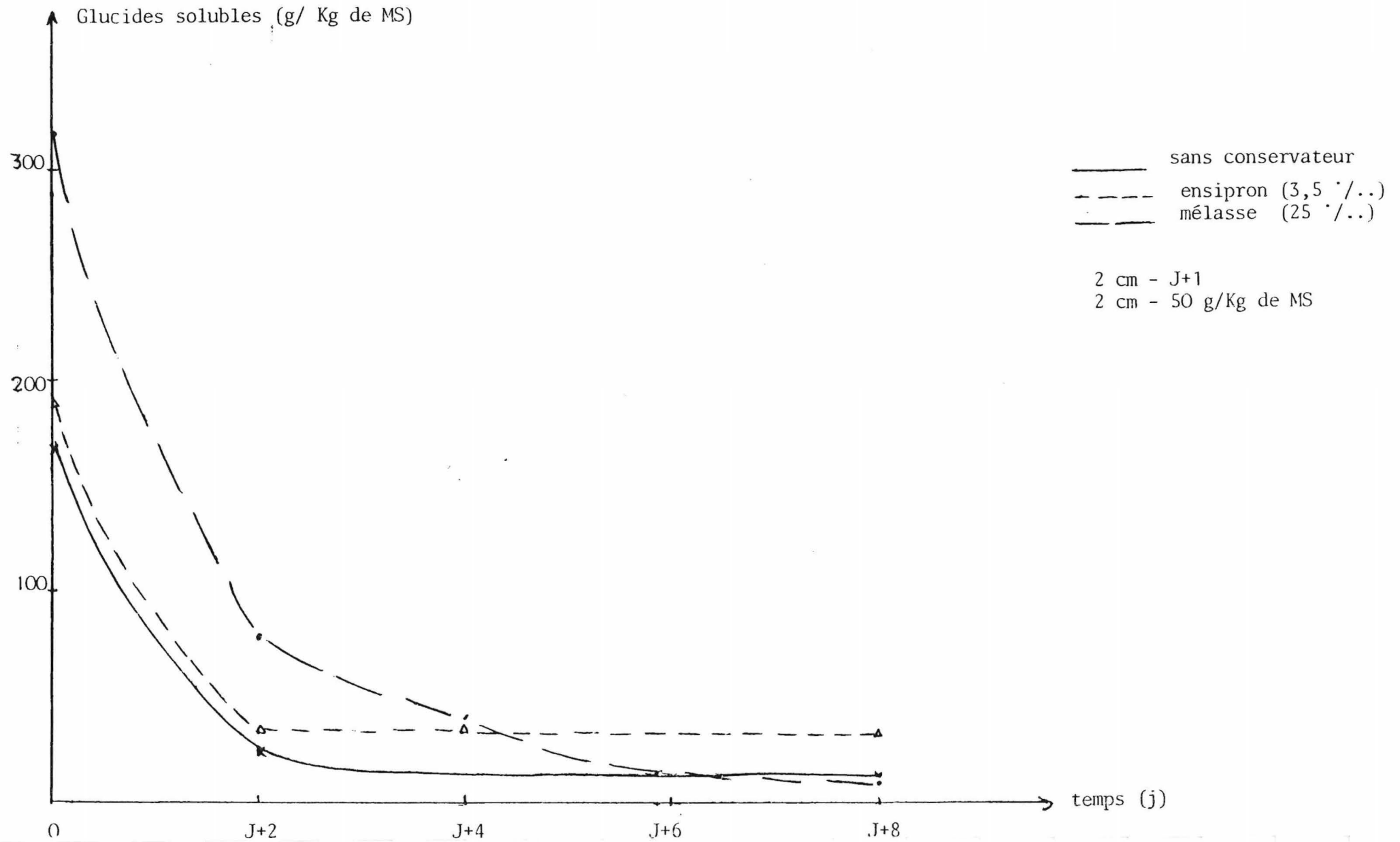


Figure 2 : Perte de matière sèche pour la plante entière ensilée
pendant une semaine.

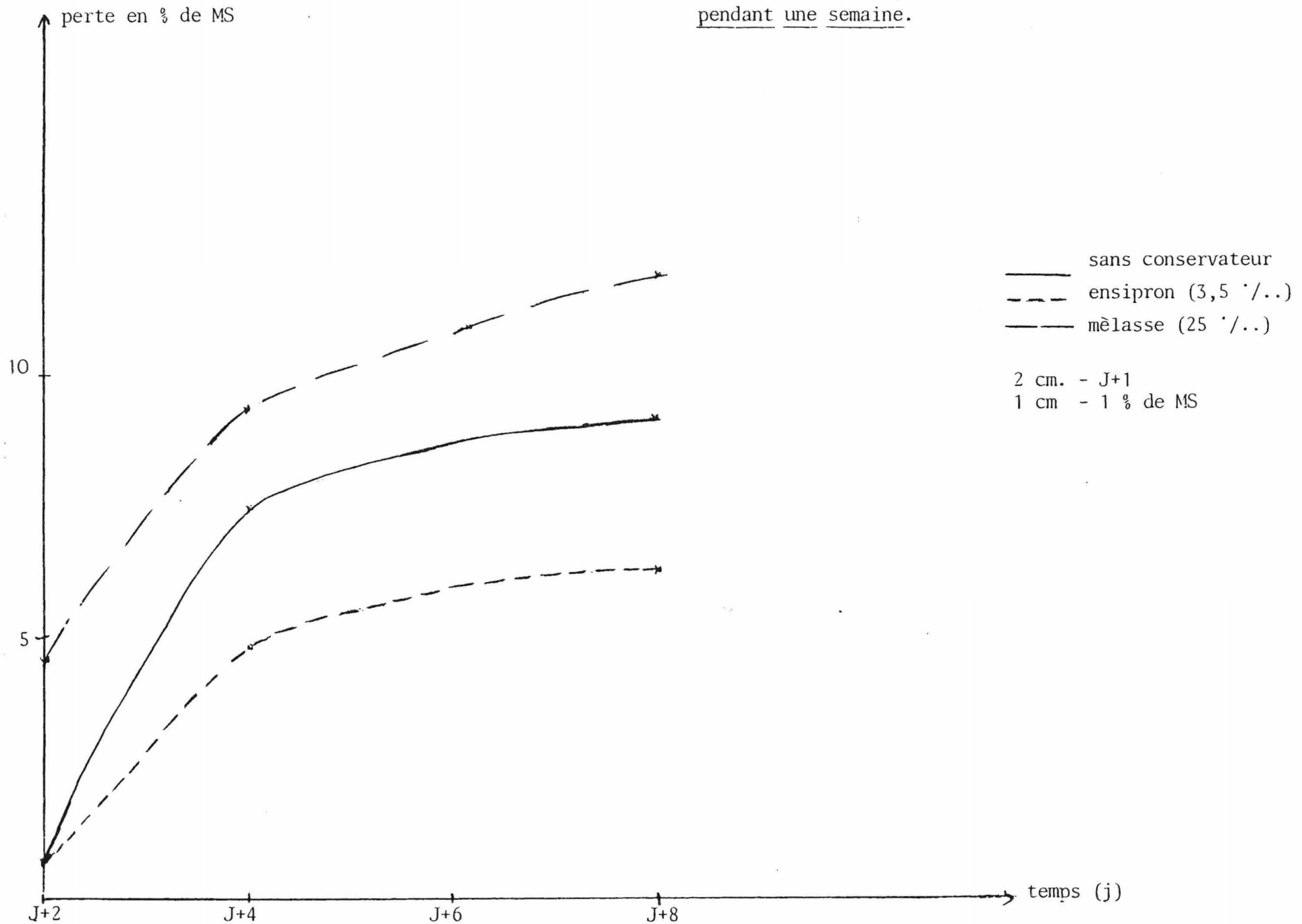


Figure 3 : Vitesse d'acidification de la plante entière ensilée pendant une semaine.

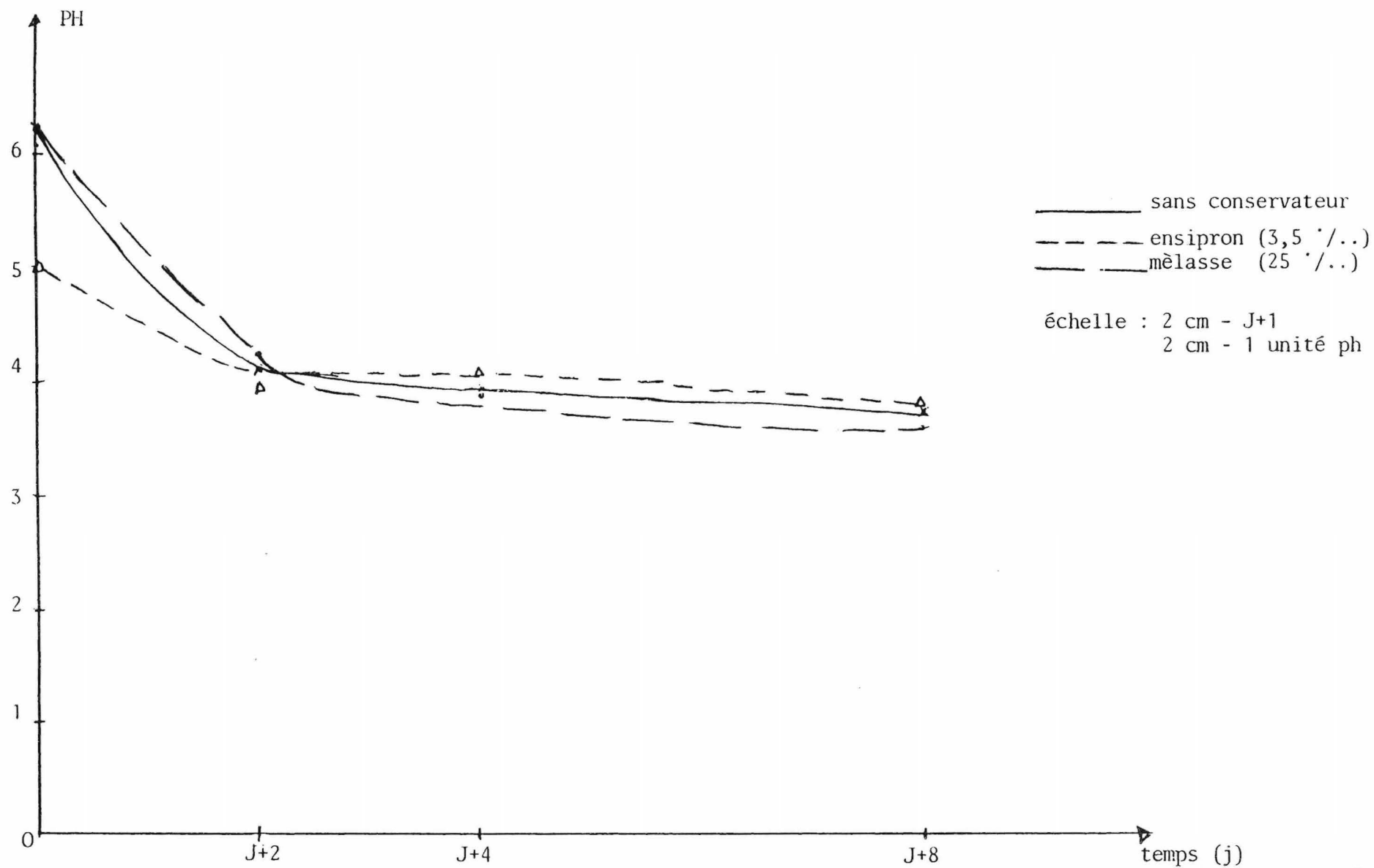


Figure 4 : Vitesse de production de l'ammoniac chez la plante
entière ensilée pendant une semaine.

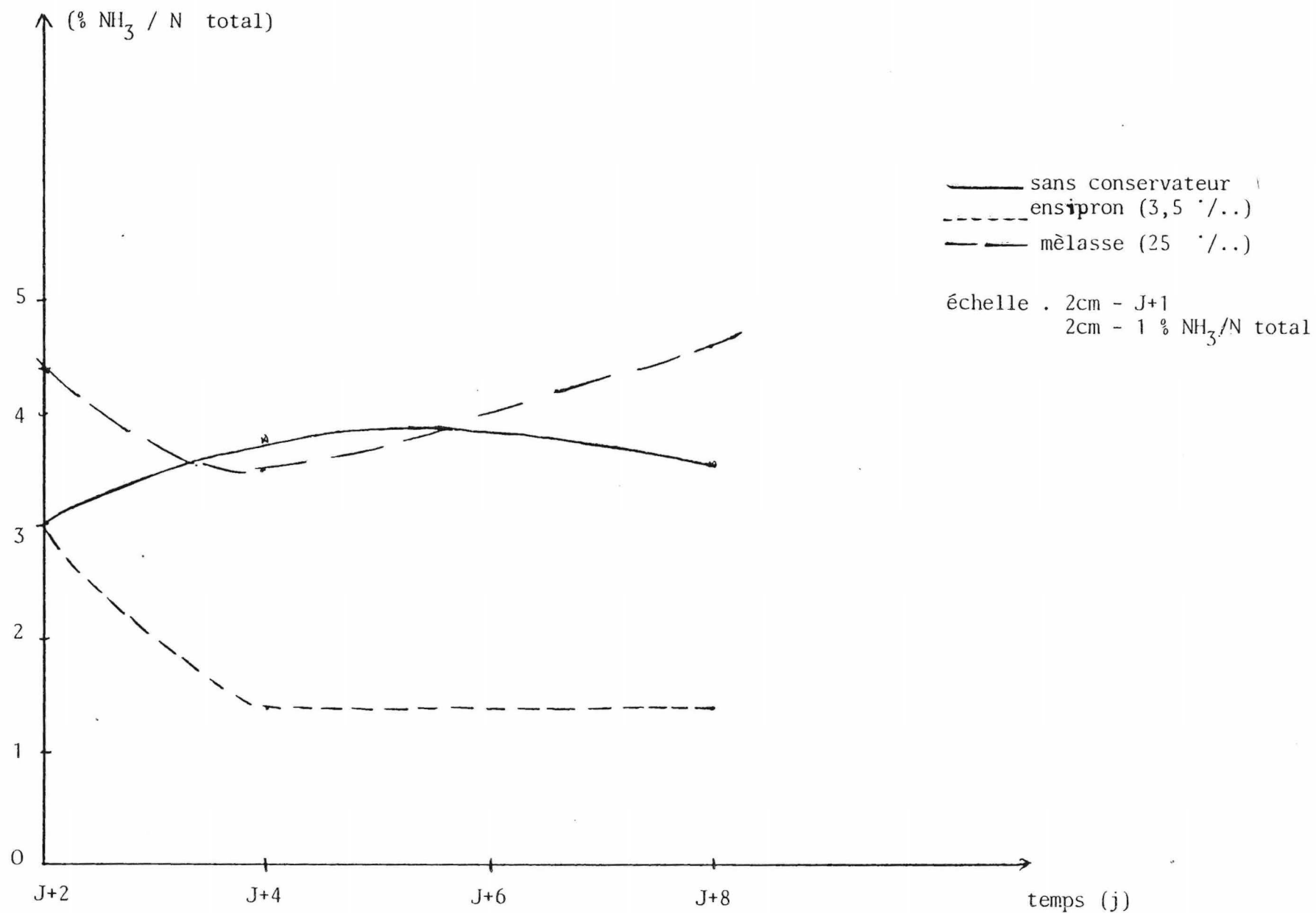


Figure 5 : Vitesse de production d'acide lactique chez la plante
entière ensilée pendant une semaine.

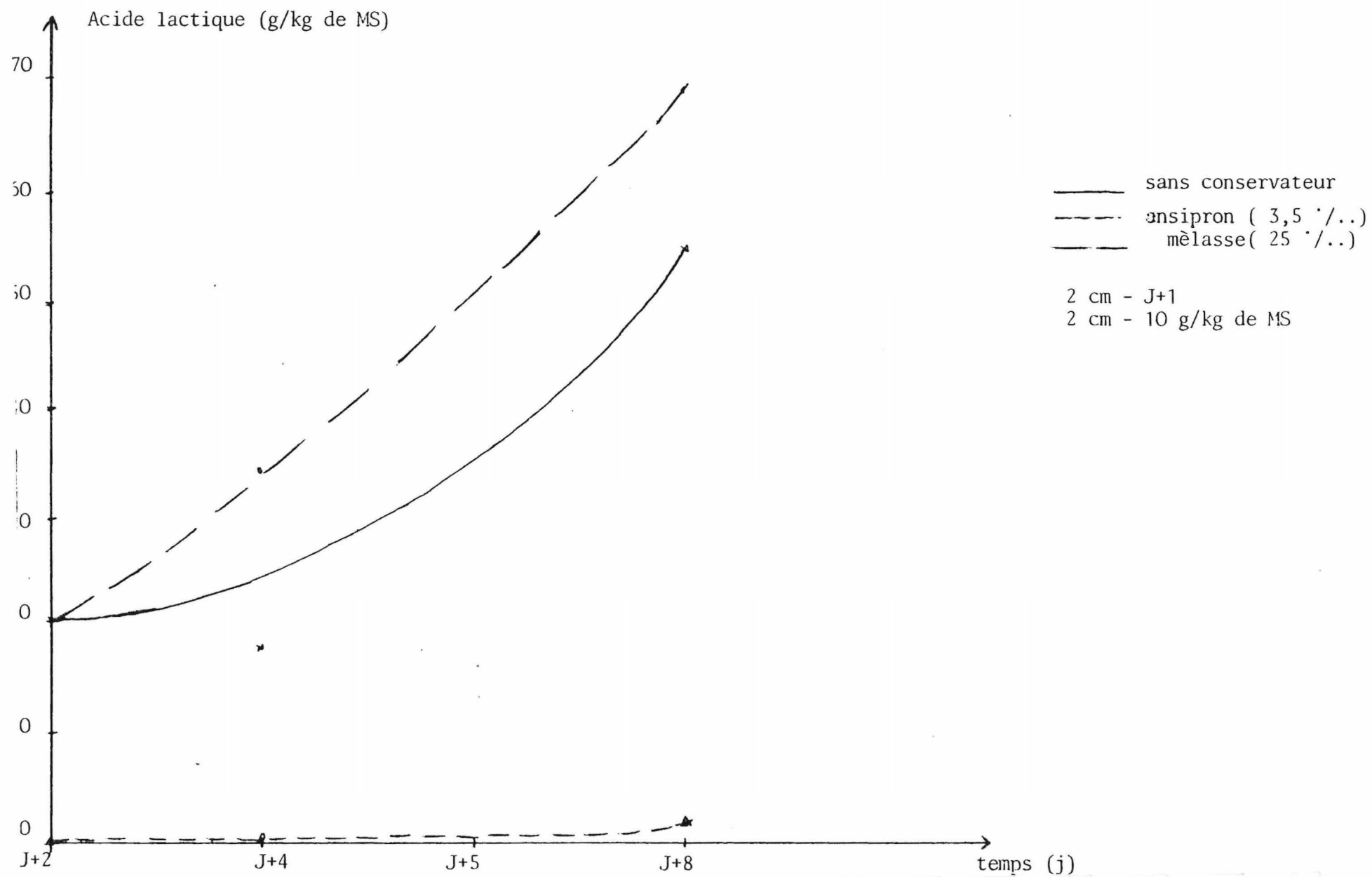


Figure 6 : Vitesse de production des acides gras volatils totaux chez la plante ensilée pendant une semaine

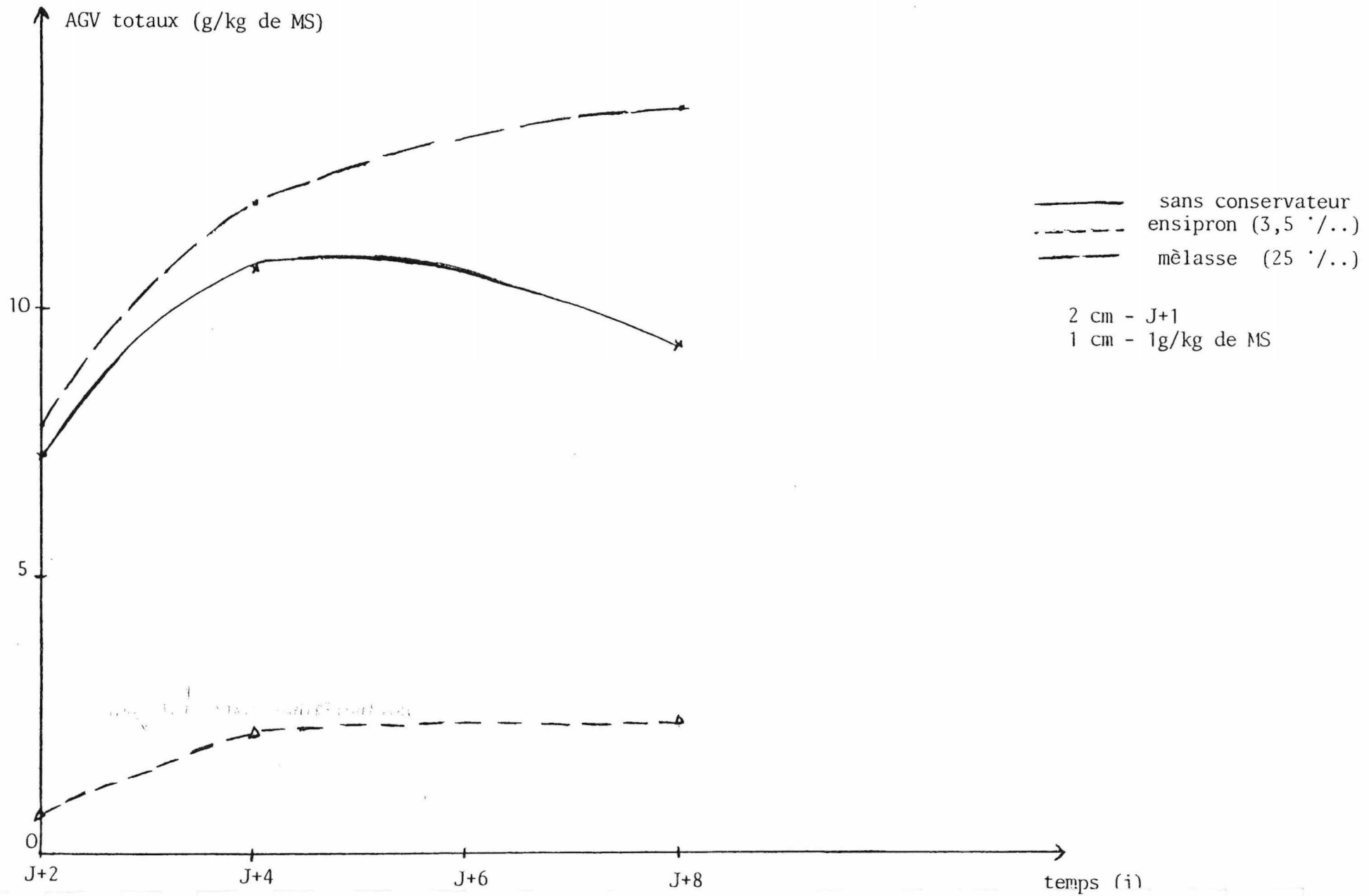


Figure 7 : Vitesse de production de l'acide acétique chez la plante ensilée pendant une semaine.

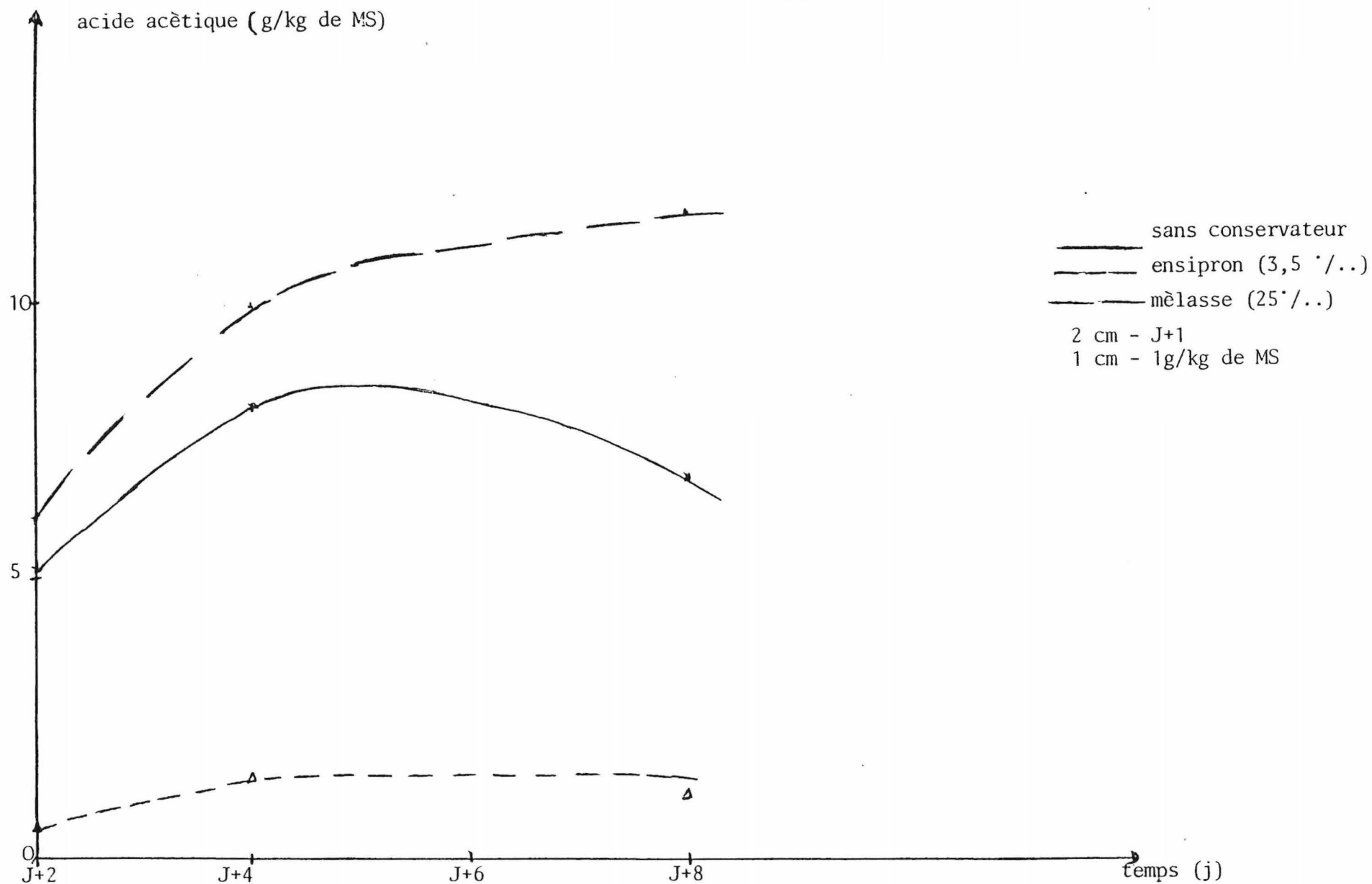


Figure 8 : Cinétique de disparition des glucides solubles de la plante ensilée pendant 30 j

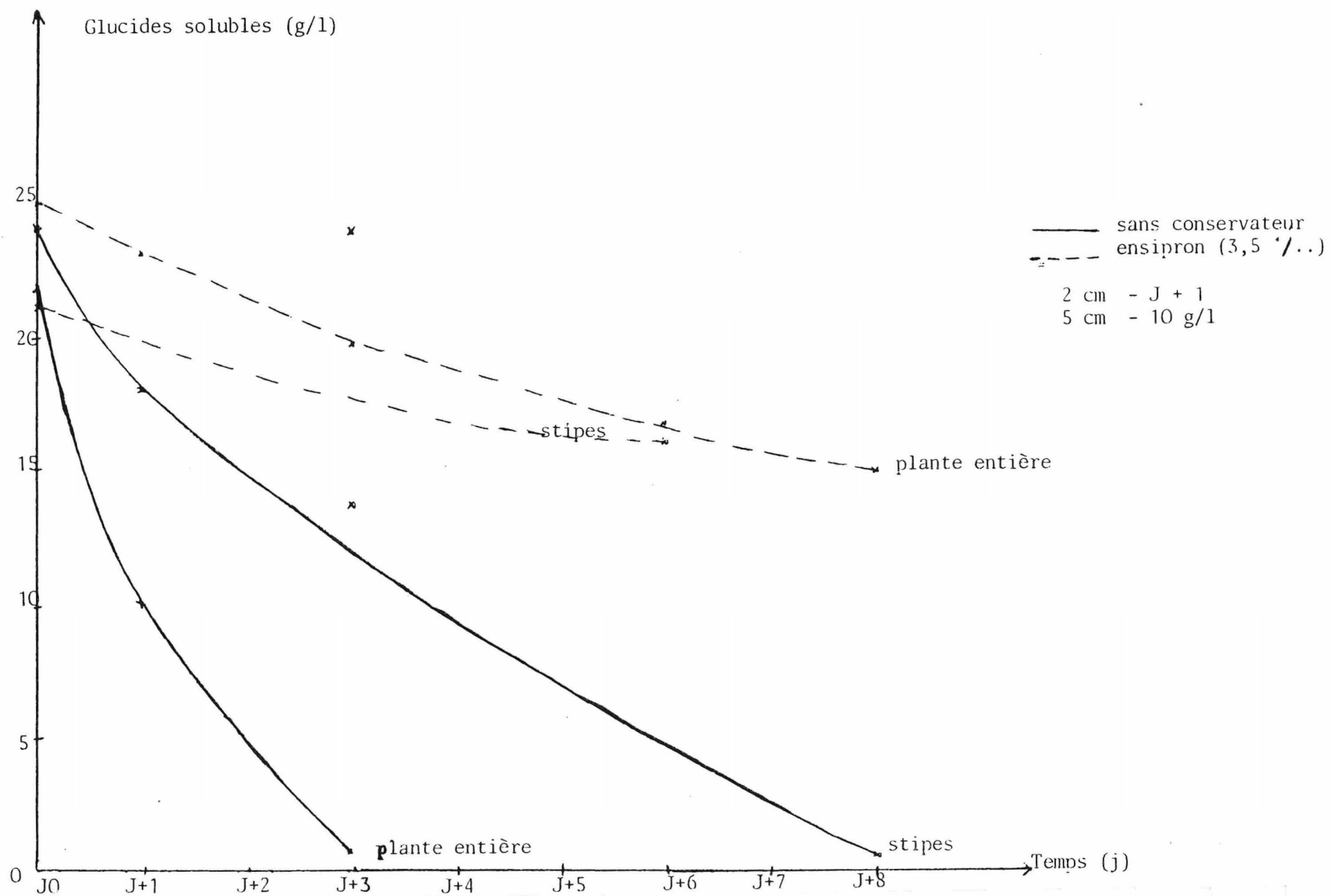


Figure 9 : Cinétique de disparition des glucides solubles de la plante ensilée pendant 60 j

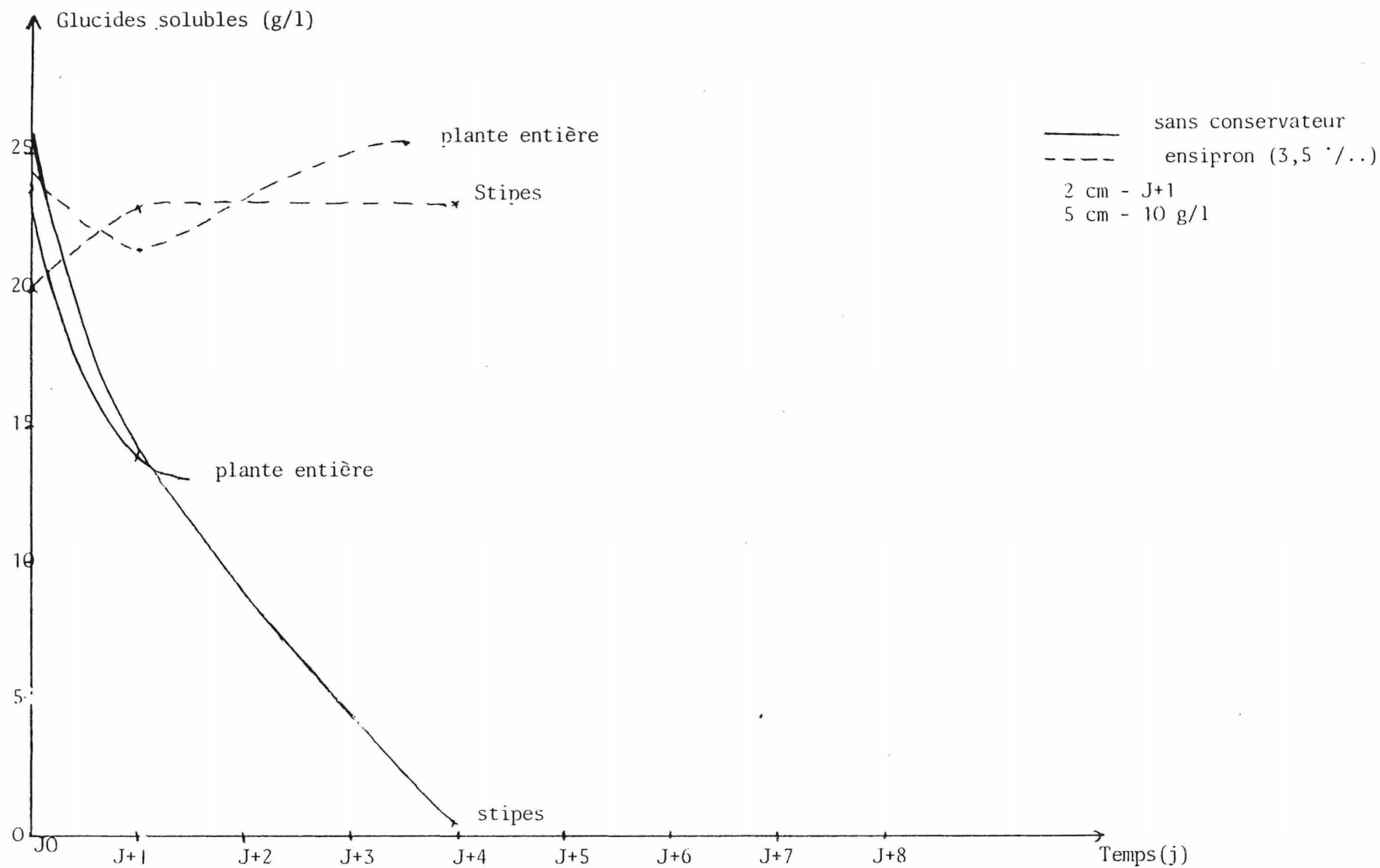


Figure 10 : Cinétique de l'activité bactérienne des fourrages traités à l'ensipron et désilés à 30 jours

Mesure du pH

— feuilles
--- stipes
— plante entière

échelle : 4 cm - 10 h
2 cm - 1 unité de pH

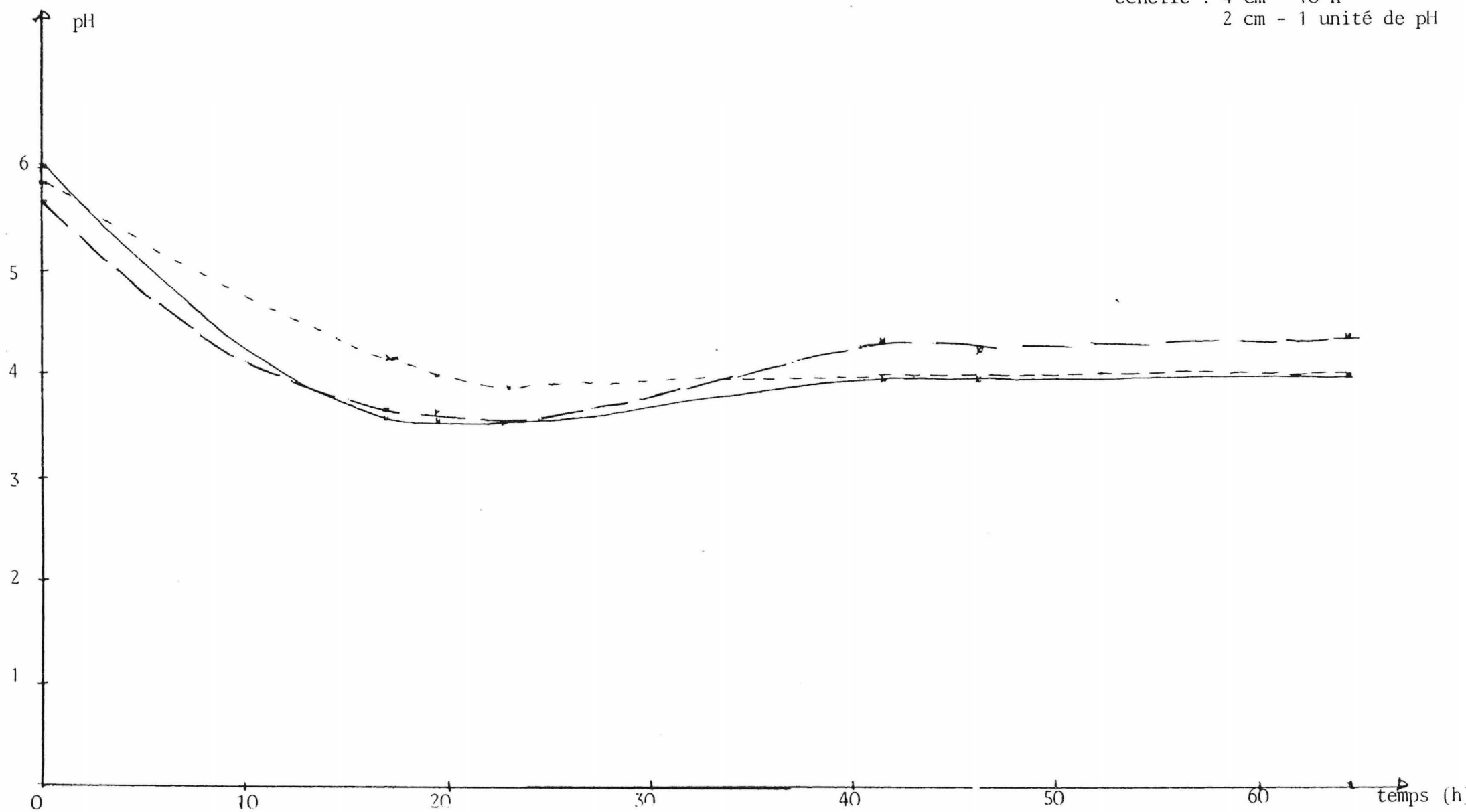


Figure 11 : Cinétique de l'activité bactérienne des fourrages traités à l'ensipron
et désilés à 30 jours.

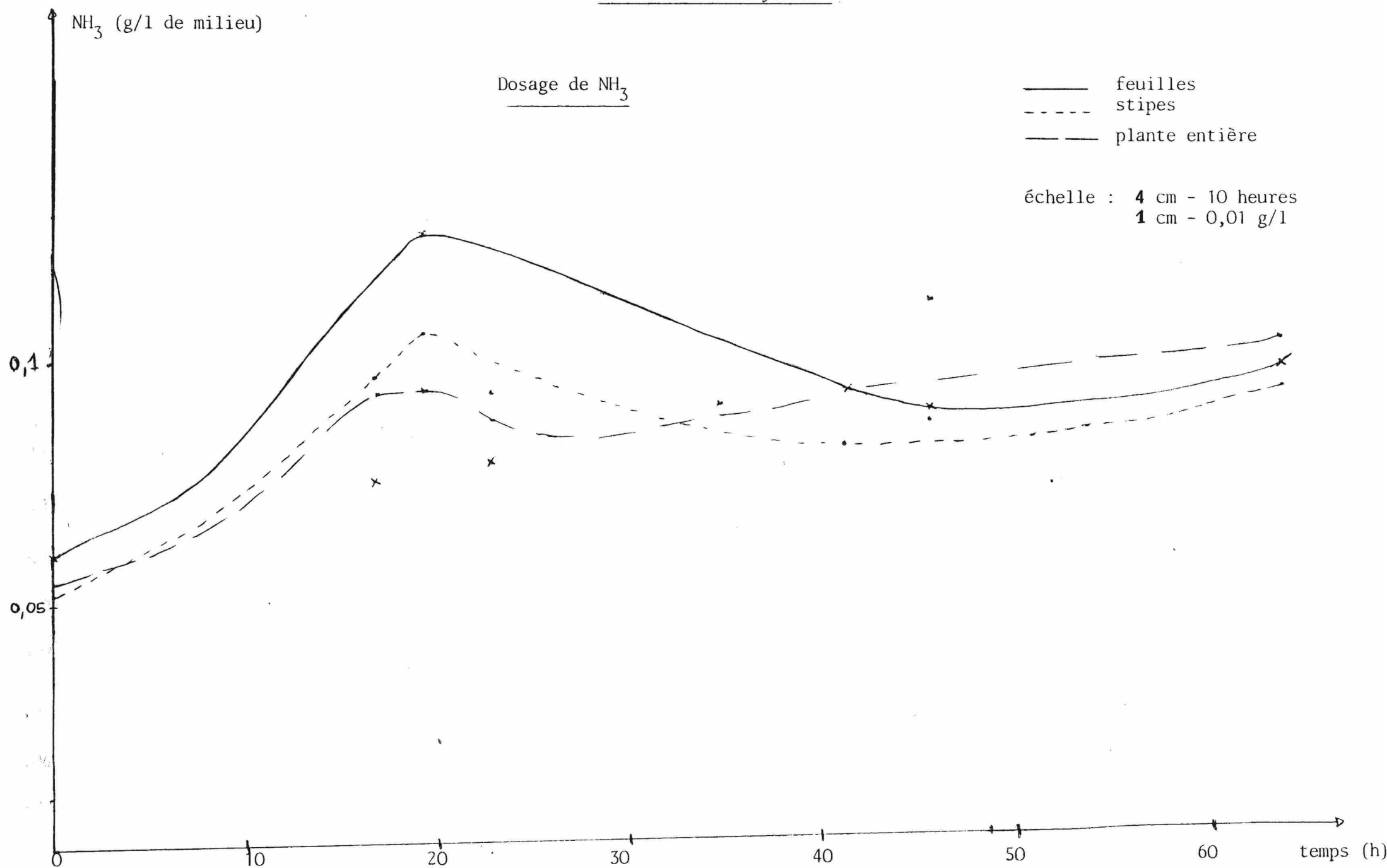


Figure 12 : Cinétique de l'activité bactérienne des fourrages traités à l'ensipron et désilés à 30 jours

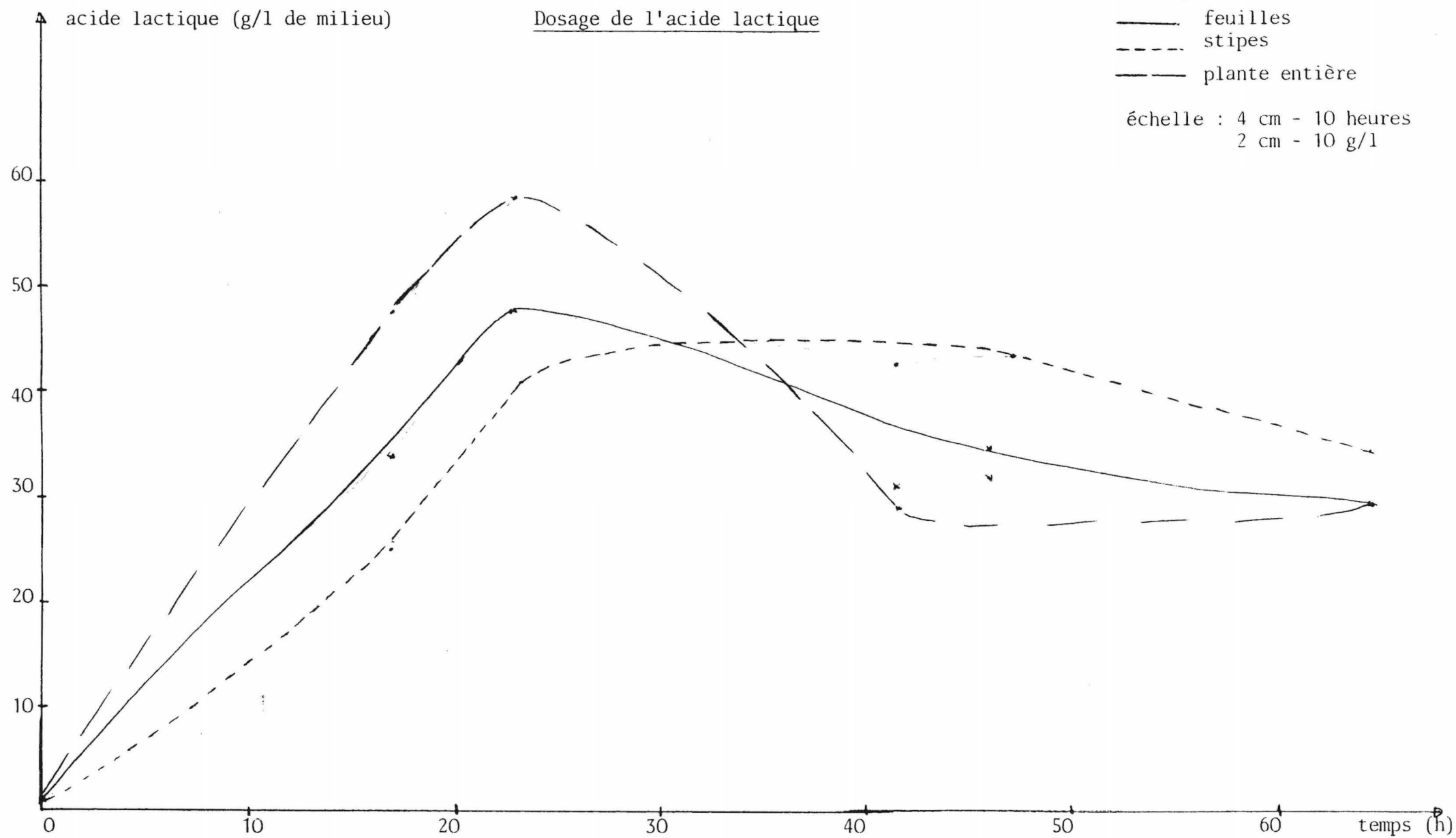


Figure 13 : Cinétique de l'activité bactérienne des fourrages traités à l'ensipron et désilés
à 30 jours.

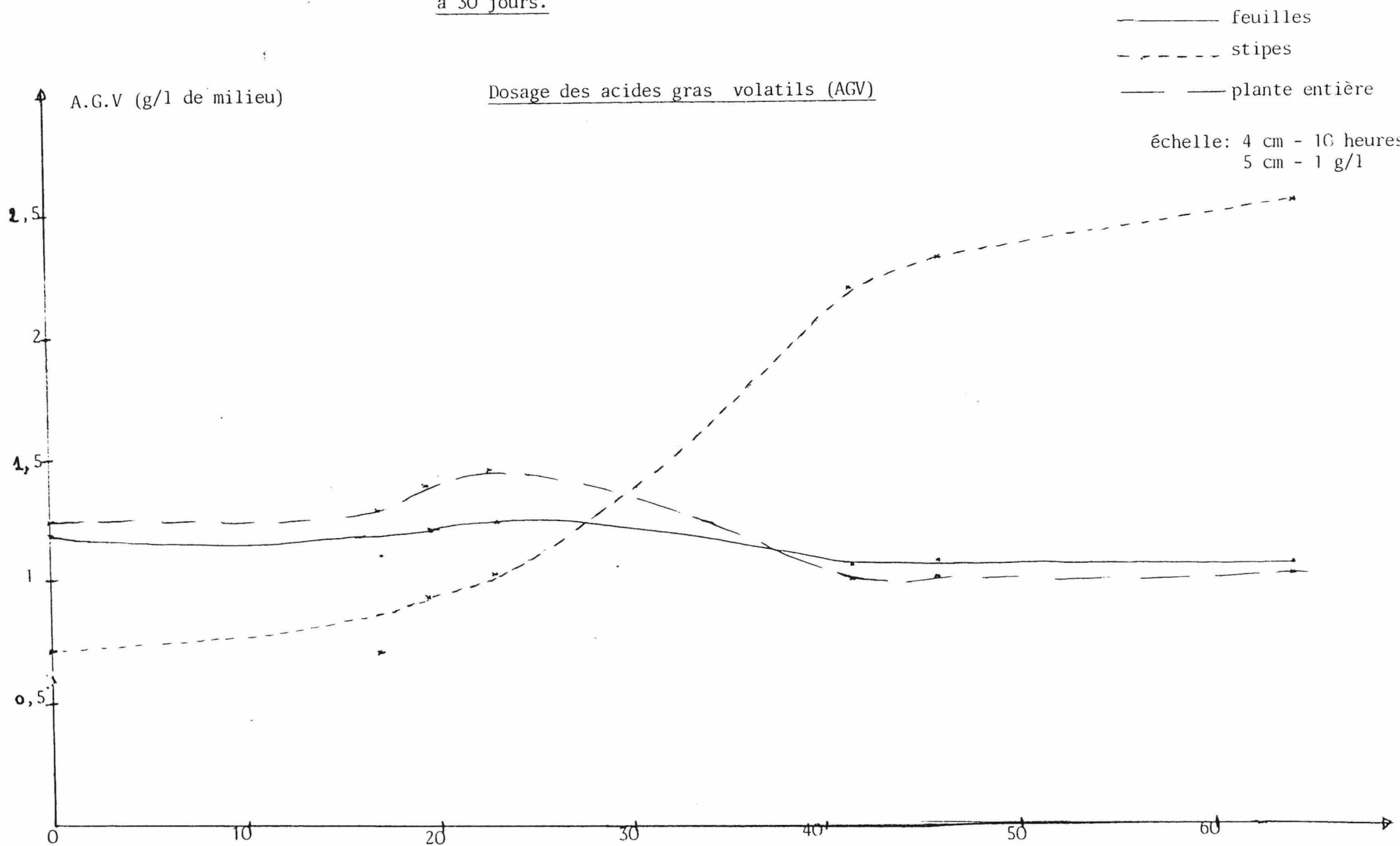


Figure 14 : Cinétique de l'activité bactérienne des fourrages traités à l'ensilatron
et désilés à 60 j.

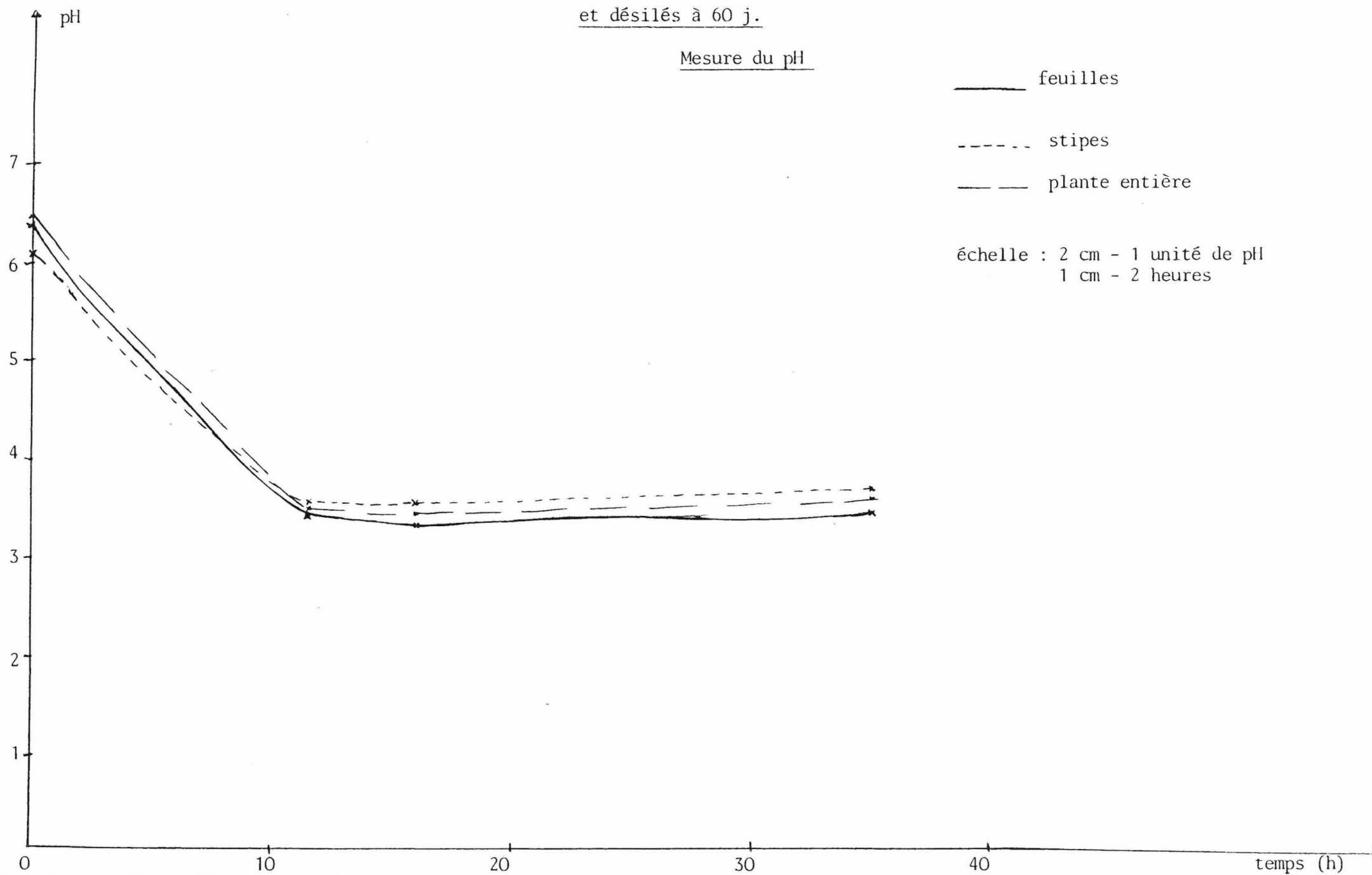


Figure 15 : Cinétique de l'activité bactérienne des fourrages traités à l'ensipron
et désilés à 60 j

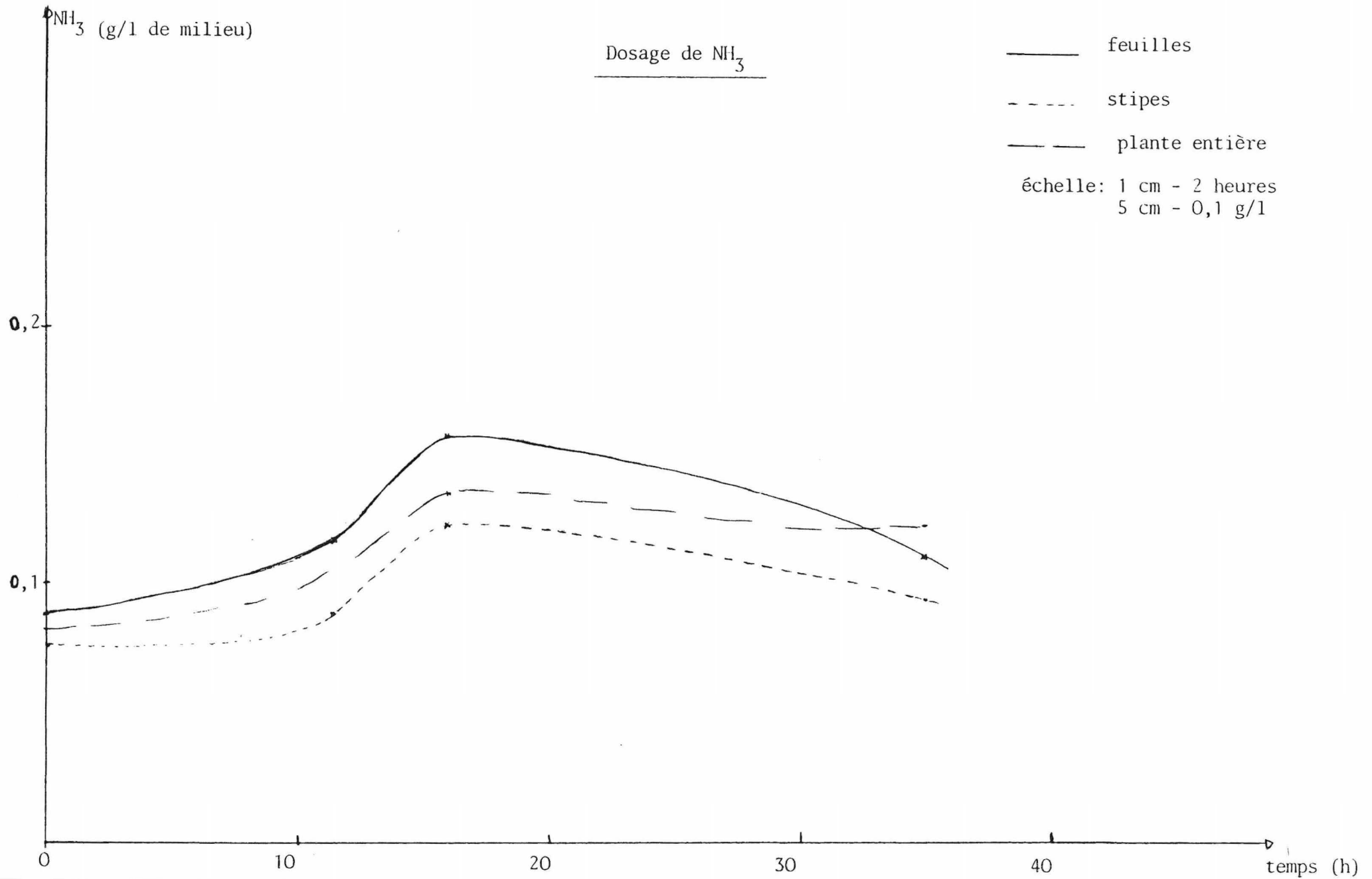


Figure 16 : Cinétique de l'activité bactérienne des fourrages traités à l'ensipron et désilés à 60 j

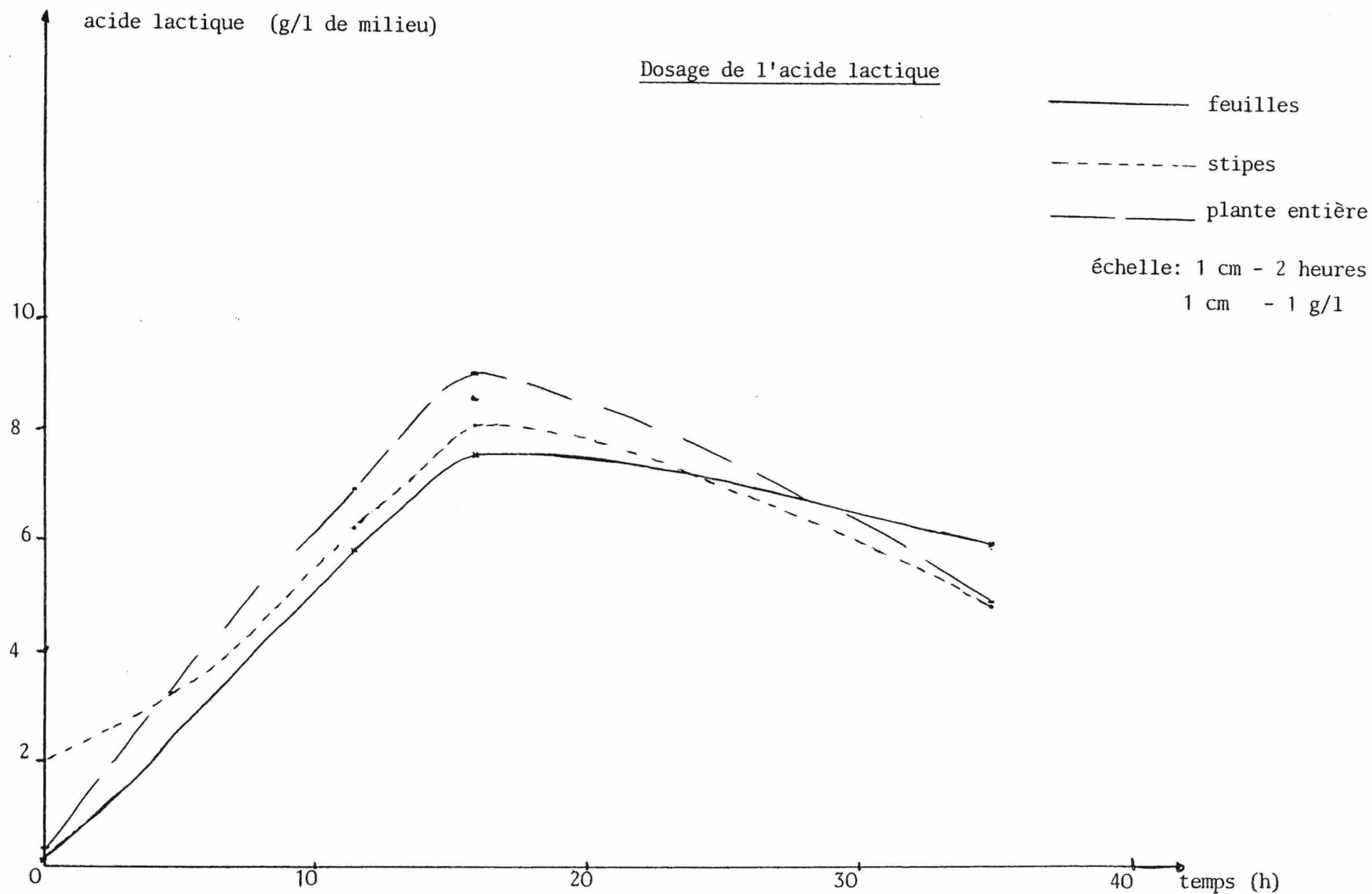


Figure 17 : Cinétique de l'activité bactérienne des fourrages traités à l'ensipron et désilés à 60j

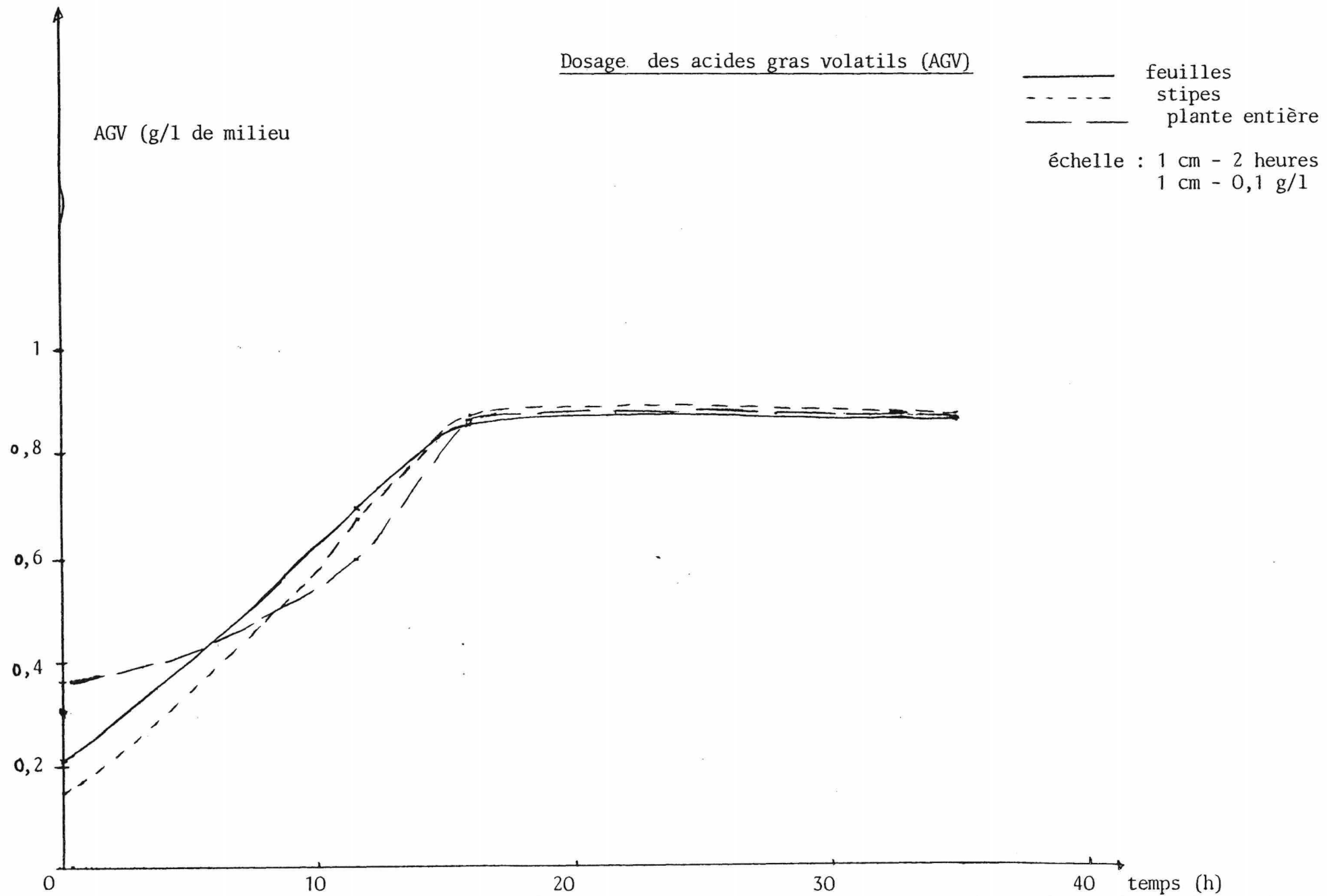


Figure 18 : Cinétique de l'activité bactérienne du fourrage plante entière
(traité à l'ensipron et désilé à 60j) inoculé à différents pH
acides

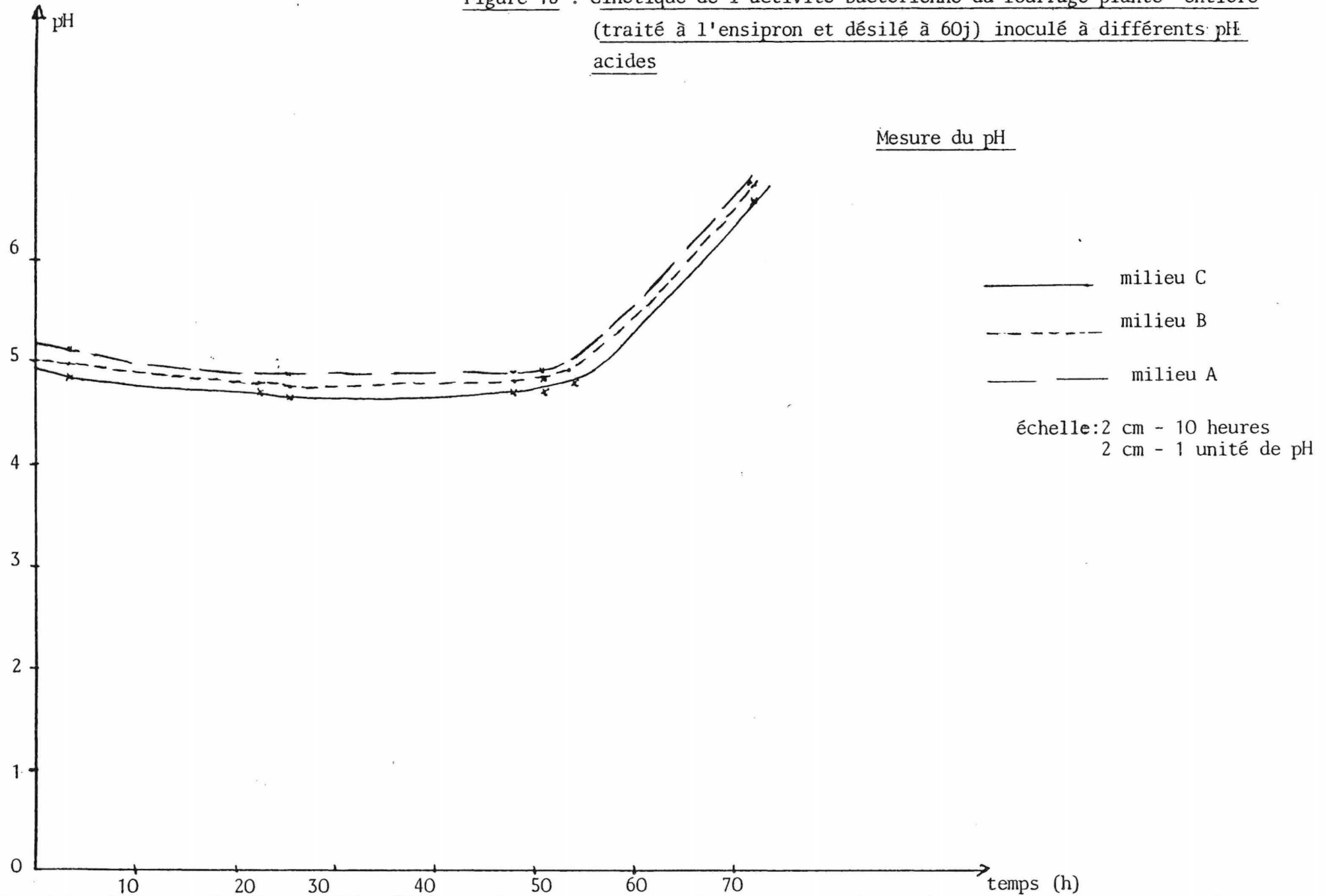


Figure 19 : Cinétique de l'activité bactérienne du fourrage plante entière
(traité à l'ensipron et désilé à 60 j) inoculé à différents pH
acides .

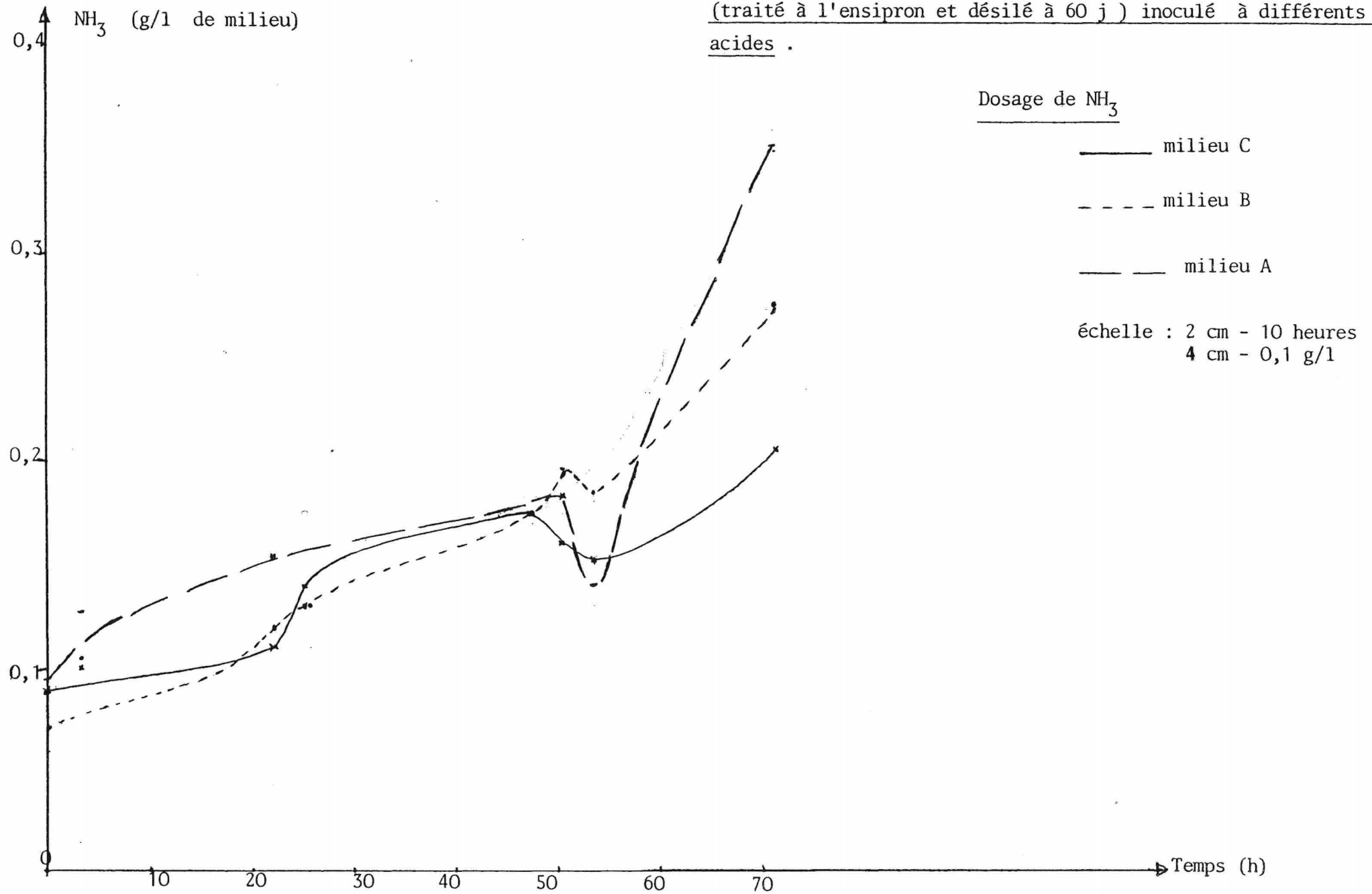
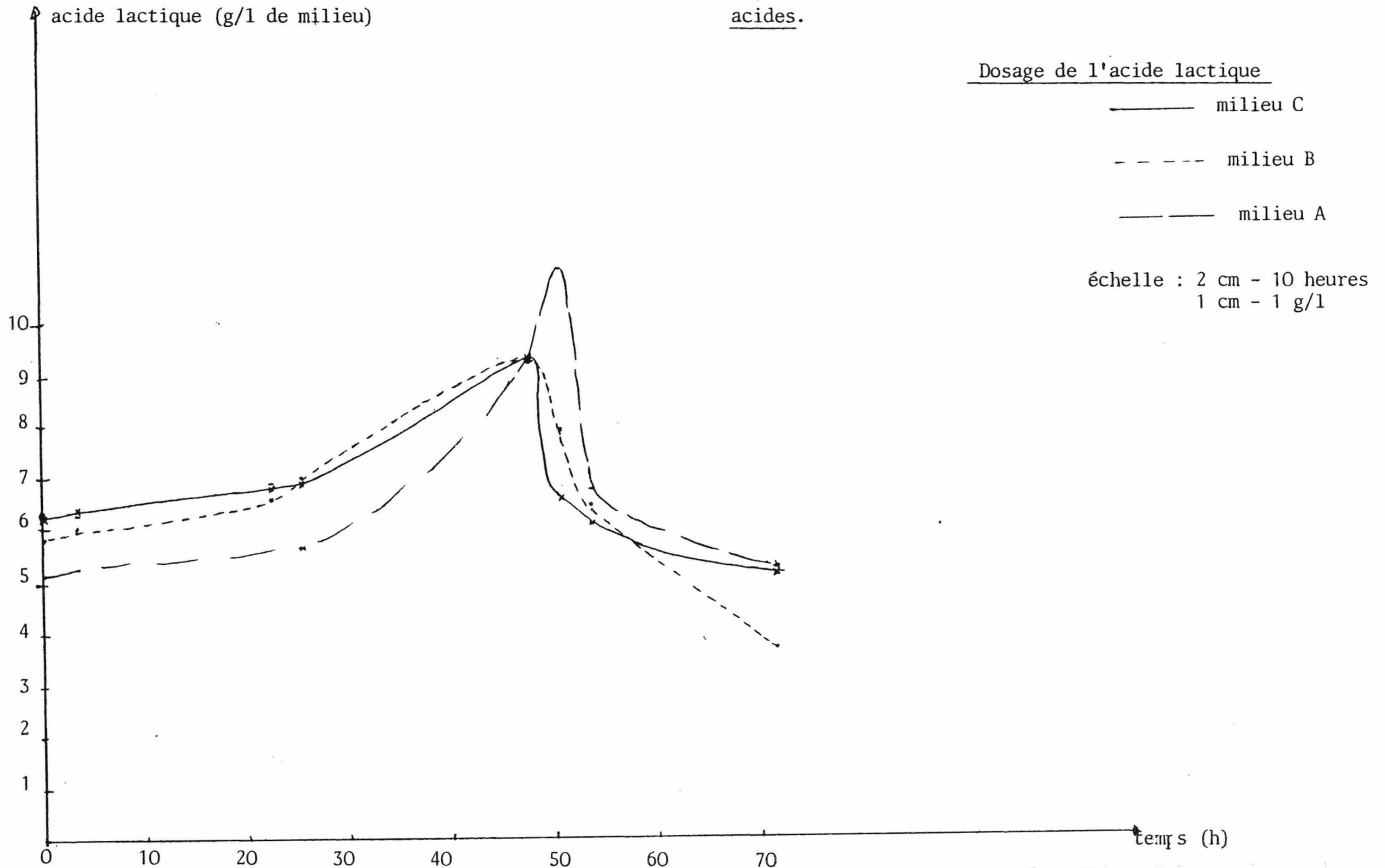
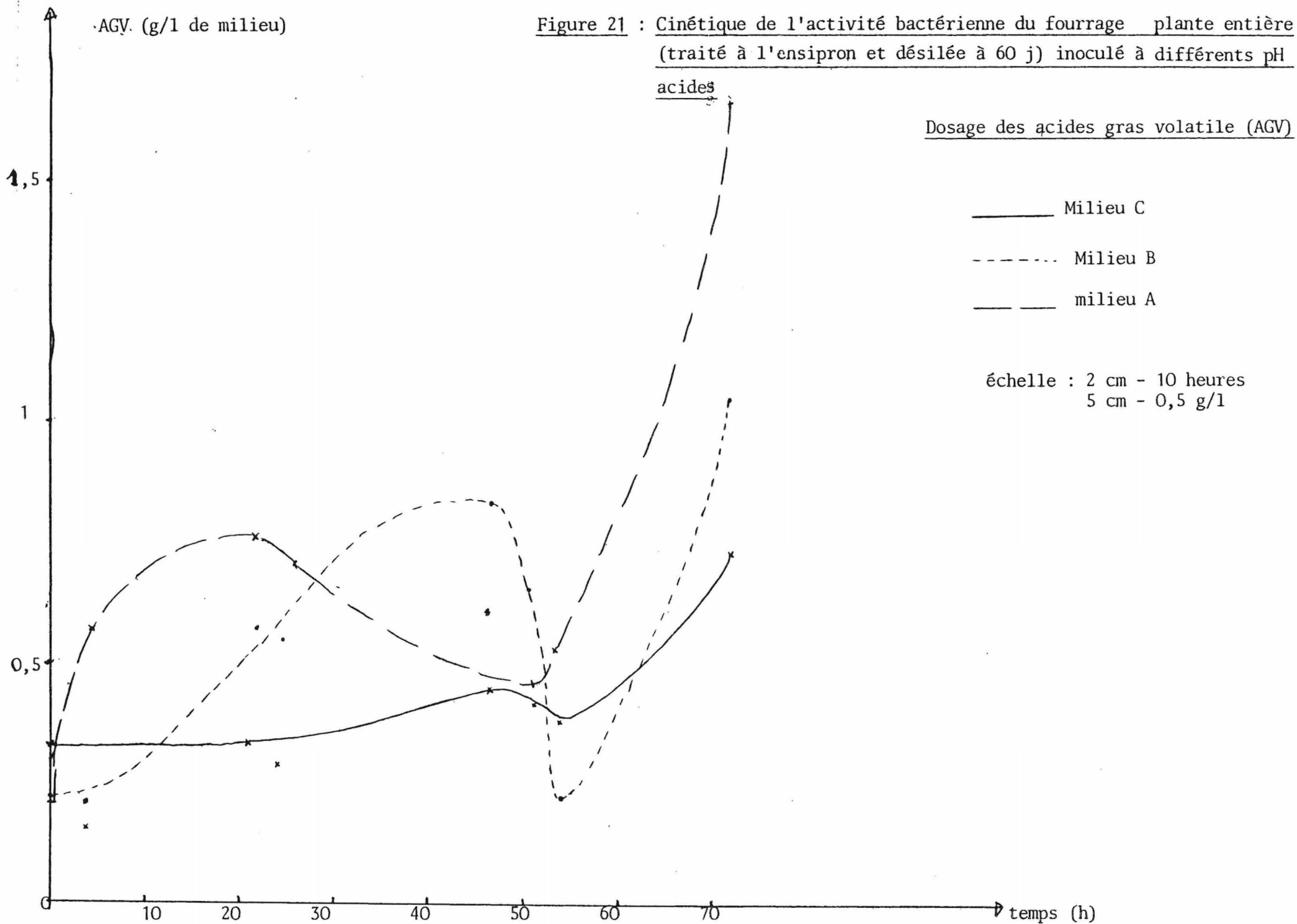


Figure 20 : Cinétique de l'activité bactérienne du fourrage plante entière
(traité à l'ensipron et désilé à 60j) inoculé à différents pH
acides.





TABLEAUX

TABLEAU 1. - MS NON CORRIGEE DE LA PLANTE ENTIERE ENSILEE ET DESILEE AU BOUT D'UNE SEMAINE

(en % de produit frais)

TRAITEMENTS \ JOURS	JO	J+2	J+4	J+8
Sans conservateur	12,0	12,6	11,6	12,7
Ensipron (3,5%)	11,4	13,85	13,4	13,4
Mélasse (25 %)	13,4	14,1	14	13,4

TABLEAU 2. - GLUCIDES SOLUBLES DE LA PLANTE ENTIERE DESILEE AU BOUT DE 2, 4 ET 8 JOURS

(en g/kg MS)

TRAITEMENTS \ JOURS	J0	J+2	J+4	J+8
Sans conservateur	167,12	23,03	-	12,53
Ensipron (3,5%)	188,29	36,69	36,74	34,02
Mélasse (25 %)	318,24	79,68	40,17	9,71

ENSILÉE

TABLÉAU 3. - EVOLUTION DE LA MATIERE ORGANIQUE DE LA PLANTE ENTIERE PENDANT UNE SEMAINE

(en g/% MS)

TRAITEMENTS	JOURS	J0	J+2	J+4	J+8
Sans conservateur		91,07	90,44	90,58	90,71
Ensipron (35‰)		91, 3	91,42	94,22	90,22
Mélasse (25 ‰)		90,46	89,79	89,92	89,7

TABLEAU 4. - MAT SUR PRODUIT SEC BROYE DE LA PLANTE ENTIERE ENSILEE PENDANT UNE SEMAINE

(en g/kg MS)

TRAITEMENTS \ JOURS	J0	J+2	J+4	J+8
Sans conservateur	44,8	40,8	35,6	42,3
Ensipron (35‰)	41,7	36,8	40,6	40,5
Mélasse (25 ‰)	43,6	37,2	30,6	33,5

TABLEAU 5. - PERTE DE MATIERE SECHE POUR LA PLANTE ENTIERE DESILEE A UNE SEMAINE

(en g de MS et en % de MS)

TRAITEMENTS \ JOURS	J + 2	J + 4	J + 8
SANS CONSERVATEUR	3600 ⁽¹⁾ 3578,4 ⁽²⁾ $\Delta = 21,6$ ⁽³⁾ $\Delta(\%) = 0,6$ ⁽⁴⁾	3600 3329,2 $\Delta = 270,8$ $\Delta(\%) = 7,52$	3600 3263,9 $\Delta = 336,1$ $\Delta(\%) = 9,3$
ENSIPRON (3,5‰)	3420 3400,2 $\Delta = 19,8$ $\Delta(\%) = 0,58$	3420 3256,2 $\Delta = 163,8$ $\Delta(\%) = 4,79$	3420 3202,6 $\Delta = 217,4$ $\Delta(\%) = 6,35$
MELASSE (25‰)	4020 3835,2 $\Delta = 184,6$ $\Delta(\%) = 4,6$	4020 3640 $\Delta = 380$ $\Delta(\%) = 9,45$	4020 3537,6 $\Delta = 482,4$ $\Delta(\%) = 12$

(1) Poids du fourrage initial x MS du fourrage initial (g de MS)

(2) Poids du fourrage désilé x MS du fourrage désilé (g de MS)

(3) $\Delta = (1) - (2)$ (g de MS)

(4) $\Delta(\%) = \frac{(1) - (2)}{(1)} \times 100$ (% de MS)

TABLEAU 6. - EVOLUTION DU PH DE LA PLANTE ENTIERE ENSILEE PENDANT UNE SEMAINE

TRAITEMENTS \ JOURS	J0	J+2	J+4	J+8
Sans conservateur	6,2	4,1	3,9	3,7
Ensipron (35%)	5	3,9	4,1	3,8
Mélasse (25 %)	6,1	4,1	3,9	3,6

TABLEAU 7. - NH_3 DE LA PLANTE ENTIERE DESILEE AU BOUT D'UNE SEMAINE

(% N NH_3 /N TOTAL)

TRAITEMENTS \ JOURS	JO	J+2	J+4	J+8
Sans conservateur	-	2,97	3,74	3,56
Ensipron (35‰)	-	2,95	1,38	1,38
Mélasse (25 ‰)	-	4,37	3,51	4,57

TABLEAU 8. - TENEUR EN ACIDE LACTIQUE DE LA PLANTE ENTIERE DESILEE AU BOUT DE 2, 4, ET 8 JOURS

(en g/kg MS)

TRAITEMENTS \ JOURS				
	JO	J+2	J+4	J+8
Sans conservateur	-	20,46	17,72	54,71
Ensipron (35%)	-	0	0,38	1,85
Mélasse (25 %)	-	20,47	34,83	69,73

TABLEAU 9. - ACIDES GRAS VOLATILS DE LA PLANTE ENTIERE DESILEE AU BOUT D'UNE SEMAINE

(en g/kg MS)

TRAITEMENTS \ JOURS	J + 2			J + 4			J + 8		
	AGV totaux	C ₂ [*]	C ₄ ^{**}	AGV totaux	C ₂ [*]	C ₄ ^{**}	AGV totaux	C ₂ [*]	C ₄ ^{**}
Sans conservateur	7,28	5,2	-	10,82	8,15	-	9,42	6,87	1,1
Ensipron (35‰)	0,75	0,47	-	2,26	1,42	0,19	2,45	1,16	0,77
Mélasse (25 ‰)	7,80	6,09	-	11,98	9,95	-	13,76	11,63	-

* acide acétique

** acide butyrique

TABLEAU 10. - MATIERE SECHE DES DIFFERENTS FOURRAGES A L'ENSILAGE

(en % de produit frais)

FOURRAGES TRAITEMENTS	FEUILLES		STIPES		PLANTE ENTIERE	
	30 J	60 J	30 J	60 J	30 J	60 J
SANS CONSERVATEUR	20,1	19,6	9,6	8,5	11,5	11,1
ENSIPRON (3,5 ‰)	20	19,9	10,1	9,2	11,7	12

TABLEAU 11. - MATIERE SECHE DES DIFFERENTS FOURRAGES AU DESILAGE

(en % de produit frais)

FOURRAGES TRAITEMENTS	FEUILLES		STIPES		PLANTE ENTIERE	
	30 J	60 J	30 J	60 J	30 J	60 J
SANS CONSERVATEUR	19,35	20	11	9,9	10,95	12,8
ENSIPRON (3,5 ‰)	19,1	17,3	12,1	10,85	12,85	12,45

TABLEAU 12. - MATIERES ORGANIQUES DES DIFFERENTS FOURRAGES AU DESILAGE

(% de la MS)

FOURRAGES TRAITEMENTS	FEUILLES		STIPES		PLANTE ENTIERE	
	30 J	60 J	30 J	60 J	30 J	60 J
SANS CONSERVATEUR	90,7	90,8	93,51	90,85	89,8	92,4
ENSIPRON (3,5 ‰)	90,56	89,67	93,24	91,44	90,37	91,18

TABLEAU 13. - MAT SUR PRODUIT SEC BROYE DES DIFFERENTS FOURRAGES A L'ENSILAGE

(en g/kg MS)

FOURRAGES TRAITEMENTS	FEUILLES		STIPES		PLANTE ENTIERE	
	30 J	60 J	30 J	60 J	30 J	60 J
SANS CONSERVATEUR	89,3	27,3	20,6	43,1	41,9	-
ENSIPRON (3,5 ‰)	105,8	-	46,5	31,1	-	37

TABLEAU 14. - MAT SUR PRODUIT SEC BROYE DES DIFFERENTS FOURRAGES AU DESILAGE
(g/kg de MS)

FOURRAGES TRAITEMENTS	FEUILLES		STIPES		PLANTE ENTIERE	
	30 J	60 J	30 J	60 J	30 J	60 J
SANS CONSERVATEUR	89,4	26,8	29,1	24,2	51,9	47,9
ENSIPRON (3,5 ‰)	114	100,1	33,5	32,3	68,5	61,2

TABLEAU 15. - PERTE DE MATIERE SECHE DES DIFFERENTS FOURRAGES AU DESILAGE

(en g de MS et en % de MS)

FOURRAGES TRAITEMENTS	FEUILLES		STIPES		PLANTE ENTIERE	
	30 J	60 J	30 J	60 J	30 J	60 J
SANS CONSERVATEUR	4020 ⁽¹⁾ 3845,8 ⁽²⁾ $\Delta=174,2$ ⁽³⁾ $\Delta(\%)=4,33$ ⁽⁴⁾	3920 3875 $\Delta = 45$ $\Delta(\%)=1,11$	2880 2508 $\Delta = 372$ $\Delta(\%)=12,9$	2550 2126 $\Delta= 424$ $\Delta(\%)=16,6$	3450 2841,5 $\Delta = 608,5$ $\Delta(\%) = 17,6$	3330 2800 $\Delta = 530$ $\Delta(\%)=15,9$
ENSIPRON (3,5‰)	4000 3788,5 $\Delta = 211,5$ $\Delta(\%)=5,28$	3980 3434,05 $\Delta = 545,95$ $\Delta(\%)=13,71$	3030 2752 $\Delta = 278$ $\Delta(\%)=9,17$	2760 2132 $\Delta = 628$ $\Delta(\%)=22,75$	3510 3251,05 $\Delta = 258,95$ $\Delta(\%)=7,37$	3600 2829 $\Delta = 771$ $\Delta(\%)=21,42$

(1) Poids du fourrage initial x MS de ce fourrage (g de MS)

(2) Poids du fourrage désilé x MS de ce fourrage (g de MS)

(3) $\Delta = (1) - (2)$ (g de MS)(4) $\Delta(\%) = (1) - (2) \times 100$ (% de MS)

TABLEAU 16. - PH DES DIFFRENTS FOURRAGES A L'ENSILAGE ET AU DESILAGE

FOURRAGES TRAITEMENTS	FEUILLES			STIPES			PLANTE ENTIERE		
	0J	30J	60J	0J	30J	60J	0J	30J	60J
SANS CONSERVATEUR	5,6	4,6	3,9	5,95	4,4	3,5	6,1	4,4	3,5
ENSIPRON (3,5 ‰)	5	4,8	4,2	4,8	3,8	3,9	5,5	4,3	3,9

TABLEAU 17. - ACIDE LACTIQUE DES DIFFERENTS FOURRAGES AU DESILAGE

(g/kg de MS)

FOURRAGES TRAITEMENTS	FEUILLES		STIPES		PLANTE ENTIERE	
	30 J	60 J	30 J	60 J	30 J	60 J
SANS CONSERVATEUR	10,68	33,89	3,67	54,42	15,25	47,48
ENSIPRON (3,5 ‰)	3,31	17,02	1,23	4,12	4,89	11,11

TABLEAU 18. - NH_3 DES DIFFERENTS FOURRAGES AU DESILAGE

(% N NH_3 /N TOTAL)

FOURRAGES TRAITEMENTS	FEUILLES		STIPES		PLANTE ENTIERE	
	30 J	60 J	30 J	60 J	30 J	60 J
SANS CONSERVATEUR	0,65	2,46	0,85	4,3	0,48	0,48
ENSIPRON (3,5 ‰)	0,36	1,04	0,5	0,5	0,21	0,33

TABLEAU 19. - ACIDES GRAS VOLATILS DES DIFFERENTS FOURRAGES AU DESILAGE

(30 jours)

(g/kg de MS)

ORGANES TRAITEMENTS	FEUILLES			STIPES			PLANTE ENTIERE		
	AGV totaux	Acide acét.	Acide butyr.	AGV totaux	Acide acét.	Acide butyr.	AGV totaux	Acide acét.	Acide butyr.
SANS CONSERVATEUR	14,96	5,21	8,21	31,96	12,94	17,52	40,21	15,45	19,6
ENSIPRON (3,5 ‰)	16,66	7,2	9,04	13,3	6,14	5,16	38,83	22,38	12,28

TABLEAU 20. - ACIDES GRAS VOLATILS DES DIFFERENTS FOURRAGES AU DESILAGE 60 J

(g/kg de MS)

ORGANES TRAITEMENTS	FEUILLES			STIPES			PLANTE ENTIERE		
	AGV totaux	Acide acét.	Acide butyr.	AGV totaux	Acide acét.	Acide butyr.	AGV totaux	Acide acét.	Acide butyr.
SANS CONSERVATEUR	11,53	3,816	7,08	16,11	11,83	2,68	20,6	10,6	7,63
ENSIPRON (3,5 ‰)	26,2	15,3	8,48	21,32	13,15	6,57	14,1	7,31	5,6