

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC EN ABITIBI-TÉMISCAMINGUE

FACTEURS QUI INFLUENCENT LA CINÉTIQUE DE FERMENTATION CHEZ LA
FLÉOLE DES PRÉS (*PHLEUM PRATENSE* L.)

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE
EXTENSIONNÉE DE
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

PAR
MARIE-ANDRÉE SYLVESTRE

JANVIER 2011

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Dans un premier temps je voudrais exprimer ma reconnaissance à ma directrice de recherche Dre Carole Lafrenière d'avoir permis de réaliser ce beau projet et de m'avoir fait connaître et aimer le monde de l'agriculture. Merci pour ton encadrement et ton support continu. Dr Pascal Drouin, merci pour ton aide précieuse et tes conseils en microbiologie tout au long de la réalisation de ce projet.

Un merci spécial à Marie-France Thibeault pour son expertise en laboratoire et ses judicieux conseils ainsi qu'à toute l'équipe du laboratoire qui était toujours prête à m'aider. Andrée-Anne Dupuis et Frédérique Langlois, merci de vous être déplacées jusqu'à Kapuskasing avec moi et d'avoir passé une nuit debout pour m'aider.

Merci à Marcelle Mercier et son équipe pour leur aide lors de mes passages à Kapuskasing, à Pierre Therrien pour son travail au champ ainsi qu'à Steve Méthot pour son aide précieuse au niveau de l'analyse statistique des résultats.

Merci au Dr David Davies pour les échantillons de l'inoculant Power Start ainsi qu'à la Coop Fédérée pour ceux du Biomax SI-50. Merci aussi à Développement Économique Canada pour l'aide financière apportée à ce projet.

Finalement, un merci particulier à mes parents, Line et Robert, pour votre soutien financier mais surtout pour votre soutien moral. Merci d'avoir toujours été là, dans les hauts comme dans les bas, tout au long de ce long processus. Merci aussi à mon frère, Jérôme, pour ton aide.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES TABLEAUX	v
LISTE DES FIGURES	vi
LISTE DES ABRÉVIATIONS	viii
RÉSUMÉ	xi
CHAPITRE I	
REVUE DE LITTÉRATURE	
1.1 Processus d'ensilement	1
1.1.1 Phase aérobie.....	1
1.1.2 Phase de fermentation	3
1.1.3 Phase de stabilité anaérobie	4
1.1.4 Phase d'alimentation	4
1.2 Caractéristiques biochimiques de la plante	5
1.2.1 Pouvoir tampon	5
1.2.2 Sucres fermentescibles par les bactéries lactiques.....	6
1.2.3 Matière sèche	8
1.3 Bactéries lactiques dans les ensilages	10
1.3.1 Bactéries lactique épiphytes (BLE).....	10
1.3.1.1 Types de BLE.....	10
1.3.1.2 Variabilité des bactéries lactiques épiphytes.....	11
1.3.2 Bref historique des inoculants lactiques.....	13
1.3.2.1 Sélection des souches de bactéries lactiques.....	14
1.3.2.3 Nombre de bactéries lactiques	16
1.3.2.4 Mode d'application des inoculants lactiques	16
1.4 Objectifs et hypothèses	17
CHAPITRE II	
MATÉRIEL ET MÉTHODE	
2.1 Préparation du matériel végétal.....	19

2.2 Fabrication des silos.....	20
2.3 Ouverture des silos.....	21
2.4 Analyses biochimiques.....	22
2.4.1 Fourrage vert	22
2.4.2 Ensilage	22
2.5 Analyses microbiologiques	24
2.5.1 Dénombrement des bactéries lactiques épiphytes.....	24
2.5.2 Dénombrement des spores de <i>Clostridium</i>	25
2.6 Analyses statistiques	26
2.6.1 Dispositif expérimental	26
2.6.2 Analyses des données.....	26

CHAPITRE III RÉSULTATS ET DISCUSSION

3.1 Résultats.....	28
3.1.1 Caractéristiques biochimiques des fourrages de fléole des prés	28
3.1.2 Dénombrement microbiens : bactéries lactiques et spores de <i>Clostridium</i> ..	29
3.1.3 Cinétique de fermentation	32
3.1.3.1 pH.....	32
3.1.3.2 Acide lactique et AGV	34
3.1.3.3 Sucres solubles.....	35
3.1.4 Évaluation de la conservation	37
3.2 Discussion	38

CONCLUSION 43

RÉFÉRENCES 67

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
CHAPITRE 1	
1. Degré de polymérisation (DP) des fructanes pour différentes graminées fourragères	9
2. Dénombrement des BLE sur différentes espèces de plantes fourragères.....	12
CHAPITRE 3	
3. Effet des doses de bactéries lactiques sur les caractéristiques biochimiques des fourrages de fléole des prés (<i>Phleum pratense</i> L.) lors de la mise en silo expérimentaux (essai 1).....	44
4. Effet de deux types d'inoculant lactique et de leur mode de préparation sur les caractéristiques biochimiques des fourrages de fléole des prés (<i>Phleum pratense</i> L.) lors de la mise en silo expérimentaux (essai 2).....	45
5. Analyse de la variance (valeur de F) de l'effet des doses de bactéries lactiques et des temps d'ouvertures des silos pour différentes variables reliées à la fermentation durant le processus d'ensilement (essai 1).....	46
6. Analyse de la variance (valeur de F) de différents traitements d'inoculant et des temps d'ouvertures des silos pour différentes variables reliées à la fermentation durant le processus d'ensilement (essai 2).....	47
7. Données climatiques enregistrées au site de Kapuskasing durant la saison 2007	48
8. Effet des doses de bactéries lactiques sur les paramètres de la cinétique de fermentation (essai 1).....	49

9. Effet de deux types d'inoculant lactique et de leur mode de préparation sur les paramètres de la cinétique de fermentation (essai 2).....	50
10. Effet des doses de bactéries lactiques sur les paramètres de conservation après 105 jours de fermentation (essai 1).....	51
11. Effet de deux types d'inoculant lactique et leur mode de préparation sur les paramètres de conservation après 105 jours de fermentation (essai 2).....	52

LISTE DES FIGURES

Figure		Page
1.	Effet des doses de bactéries lactiques ajoutées aux fourrages de fléole des prés (<i>Phleum pratense</i> L.) sur l'évolution dans le temps des dénombrements de bactéries lactiques ($\log \text{UFC} \cdot \text{g FF}^{-1}$) durant le processus de fermentation pour les 4 traitements (essai 1).....	53
2.	Effet des types d'inoculant et de leur mode de préparation ajoutés aux fourrages de fléole de prés (<i>Phleum pratense</i> L.) sur l'évolution dans le temps des dénombrements de bactéries lactiques ($\log \text{UFC} \cdot \text{g FF}^{-1}$) durant le processus de fermentation pour les 5 traitements (essai 2).....	54
3.	Effet des doses de bactéries lactiques ajoutées aux fourrages de fléole des prés (<i>Phleum pratense</i> L.) sur l'évolution dans le temps du pH durant le processus de fermentation pour les 4 traitements (essai 1).....	55
4.	Effet des types d'inoculant et de leur mode de préparation ajoutés aux fourrages de fléole de prés (<i>Phleum pratense</i> L.) sur l'évolution dans le temps du pH durant le processus de fermentation pour les 5 traitements (essai 2).....	56
5.	Effet des doses de bactéries lactiques ajoutées aux fourrages de fléole des prés (<i>Phleum pratense</i> L.) sur l'évolution dans le temps des concentrations en acide lactique ($\text{g} \cdot \text{kg MS}^{-1}$) durant le processus de fermentation pour les 4 traitements (essai 1).....	57
6.	Effet doses de bactéries lactiques ajoutés aux fourrages de fléole de prés (<i>Phleum pratense</i> L.) sur l'évolution dans le temps des concentrations en acide acétique ($\text{g} \cdot \text{kg MS}^{-1}$) durant le processus de fermentation pour les 4 traitements (essai 1).....	58
7.	Effet des types d'inoculant et de leur mode de préparation ajoutés aux fourrages de fléole de prés (<i>Phleum pratense</i> L.) sur l'évolution dans le temps des concentrations en acide lactique ($\text{g} \cdot \text{kg MS}^{-1}$) durant le processus de fermentation pour les 5 traitements (essai 2).....	59

8.	Effet des types d'inoculant et de leur mode de préparation ajoutés aux fourrages de fléole de prés (<i>Phleum pratense</i> L.) sur l'évolution dans le temps des concentrations en acide acétique ($\text{g} \cdot \text{kg MS}^{-1}$) durant le processus de fermentation pour les 5 traitements (essai 2).....	60
9.	Effet doses de bactéries lactiques ajoutés aux fourrages de fléole de prés (<i>Phleum pratense</i> L.) sur l'évolution dans le temps des concentrations en glucose ($\text{g} \cdot \text{kg MS}^{-1}$) durant le processus de fermentation pour les 4 traitements (essai 1).....	61
10.	Effet doses de bactéries lactiques ajoutés aux fourrages de fléole de prés (<i>Phleum pratense</i> L.) sur l'évolution dans le temps des concentrations en fructose ($\text{g} \cdot \text{kg MS}^{-1}$) durant le processus de fermentation pour les 4 traitements (essai 1).....	62
11.	Effet doses de bactéries lactiques ajoutés aux fourrages de fléole de prés (<i>Phleum pratense</i> L.) sur l'évolution dans le temps des concentrations en xylose ($\text{g} \cdot \text{kg MS}^{-1}$) durant le processus de fermentation pour les 4 traitements (essai 1).....	63
12.	Effet des types d'inoculant et de leur mode de préparation ajoutés aux fourrages de fléole de prés (<i>Phleum pratense</i> L.) sur l'évolution dans le temps des concentrations en glucose ($\text{g} \cdot \text{kg MS}^{-1}$) durant le processus de fermentation pour les 5 traitements (essai 2).....	64
13.	Effet des types d'inoculant et de leur mode de préparation ajoutés aux fourrages de fléole de prés (<i>Phleum pratense</i> L.) sur l'évolution dans le temps des concentrations en fructose ($\text{g} \cdot \text{kg MS}^{-1}$) durant le processus de fermentation pour les 5 traitements (essai 2).....	65
14.	Effet des types d'inoculant et de leur mode de préparation ajoutés aux fourrages de fléole de prés (<i>Phleum pratense</i> L.) sur l'évolution dans le temps des concentrations en xylose ($\text{g} \cdot \text{kg MS}^{-1}$) durant le processus de fermentation pour les 5 traitements (essai 2).....	66

LISTE DES ABRÉVIATIONS

°C	Degré Celsius
AGV	Acide gras volatil
AOAC	Association des chimistes analytiques
BLA	Bactérie lactique
BLE	Bactérie lactique épiphyte
cm	Centimètre
CLHP	Chromatographie en phase liquide à haute pression
CO ₂	Dioxyde de carbone
DP	Degré de polymérisation
FF	Fourrage frais
g	Gramme
ha	Hectare
HCl	Chlorure d'hydrogène
hrs	Heures
kg	Kilogramme
L	Litre
Log	Logarithme
M	Molaire
MgO	Oxygène de magnésium
Min	Minute
mL	Millilitre
MS	Matière sèche
N	Azote
NH ₄ NO ₃	Nitrate d'ammonium
pH	Potentiel hydrogène
pHw	pH de stabilité anaérobie
p/v	Partie par volume
UFC	Unité formant des colonies
µL	Micro-litre
URDAAT	Unité de recherche et développement en agroalimentaire de l'Abitibi-Témiscamingue
RCA	Reinforced Clostridial Agar
SS	Sucre solubles
vs	Versus
W	Watts

RÉSUMÉ

L'ensilage permet de conserver le fourrage par un processus de fermentation lactique ce qui limite les pertes de rendement et de valeur nutritive. Le fourrage ainsi acidifié et maintenu en conditions anaérobies peut alors être conservé pour nourrir les animaux durant la période d'hivernage. Théoriquement, lorsque l'ensilabilité des plantes est bonne, la conservation sera elle aussi adéquate. Toutefois, des études récentes ont démontré que la corrélation entre l'ensilabilité et la conservation n'est pas très élevée. L'une des hypothèses est que le pHw (pH de stabilité anaérobie) n'est pas atteint assez rapidement. Le temps de latence (temps avant que le pH commence à descendre) ainsi que le déclin du pH (descente du pH de l'ensilage jusqu'au pHw) seraient trop long. Le nombre de bactéries lactiques, l'efficacité des ces bactéries à produire de l'acide lactique, de même que la spécificité de leur métabolisme fermentaire pour certains sucres pourraient modifier ces paramètres et ainsi améliorer la conservation. Les deux essais réalisés pour ce projet avaient pour objectif d'étudier ces facteurs. Dans le premier essai, la fléole des prés (*Phleum pratense* L.) au premier cycle de végétation à 35% de MS, a été traitée avec un inoculant lactique contenant du *Lactobacillus plantarum* (Biomax SI-50). L'inoculant a été appliqué sur le fourrage à trois doses différentes ; 10^5 , 10^6 et 10^7 UFC ·g de FF⁻¹. Dans le deuxième essai, la même plante au deuxième cycle de végétation à 30% de MS, a été traitée avec le Biomax SI-50 et le Powerstart contenant lui aussi un *Lactobacillus plantarum* (Aber-F1) mais ayant la caractéristique d'utiliser les fructanes. Ces deux inoculants ont soit été réhydratés dans l'eau juste avant leur application sur les fourrages ou activés entre 22 et 24 heures avant leur application dans un bouillon nutritif. Pour chacun des traitements, des silos expérimentaux avec 250 g de fourrage ont été fabriqués. Des silos ont été analysés après 0, 6, 12, 24, 48, 72 heures ainsi que 1, 2, 4 et 15 semaines d'incubation afin d'étudier la cinétique du pH. Le premier essai a démontré que l'addition d'un inoculant permet une diminution plus rapide du pH que le témoin ($P < 0,05$). Toutefois, les doses d'inoculant ne permettent pas de diminuer le temps de latence comparativement au témoin ($P > 0,05$). Dans le cas du deuxième essai, il n'y a pas eu de différence ni sur la vitesse de diminution ni sur le temps de latence entre tous les traitements ($P > 0,05$). Pour les deux essais, le pH de stabilité anaérobie a été atteint et les teneurs en acides butyriques observées sont difficiles à interpréter. La cinétique des différents acides organiques des ensilages nous indiquent certaines particularités qui semblent être reliées aux sucres.

Mots-clés : Inoculant lactique, Bactérie lactique, Ensilage, Fermentation, Fléole des prés (*Phleum pratense* L.), sucres.

CHAPITRE I

REVUE DE LITTÉRATURE

En production animale la récolte et la conservation des fourrages sont très importantes puisque celles-ci constituent de 40 à 100% de la diète. L'objectif de l'ensilage est de conserver le fourrage tout en limitant les pertes de matière sèche et de valeur nutritive. Le processus d'ensilage permet d'extraire l'oxygène et d'acidifier le fourrage par fermentation des sucres grâce aux bactéries lactiques. Le fourrage ainsi acidifié et maintenu en conditions anaérobies peut alors être conservé pour nourrir les animaux.

1.1 Processus d'ensilage

Le processus d'ensilage est généralement divisé en quatre phases lesquelles sont influencées par de nombreux facteurs.

1.1.1 Phase aérobie

La première phase, la phase aérobie, commence lors de la fauche et se termine lorsqu'il n'y a plus d'oxygène dans le milieu. Elle est caractérisée par la respiration des cellules végétales, une dégradation des protéines du fourrage, c'est-à-dire la protéolyse et la croissance des bactéries aérobies.

La respiration cellulaire transforme les sucres en gaz carbonique, en eau et en énergie (sous forme de chaleur) en utilisant l'oxygène (Amyot, 2003; Muck et Pitt, 1993). La respiration est donc nécessaire afin de retirer l'oxygène de l'ensilage et ainsi créer un milieu anaérobie. Par contre, cette phase ne doit pas trop se prolonger puisqu'elle utilise les sucres nécessaires aux bactéries lactiques pour acidifier le milieu (Rook et Hatfield, 2003). La respiration contribue aussi à la hausse de la température dans le silo. L'augmentation de la température accélère toutes les réactions enzymatiques du processus d'ensilage, les bonnes comme les mauvaises (Muck et Pitt, 1993). Une augmentation de la température jusqu'à 32°C est acceptable considérant que les bactéries lactiques responsables de la fermentation lors de l'ensilage ont une température de croissance optimale aux environs de 30°C (Lafrenière *et al.*, 1998). Cependant, à des températures s'élevant au-dessus de cette valeur, c'est la croissance des bactéries butyriques et des entérobactéries qui est favorisée (Rook et Hatfield, 2003). À des températures élevées (> 50°C), les sucres se lient aux protéines par la réaction de Maillard. Les protéines deviennent alors non-disponibles pour les microorganismes du rumen ce qui diminue la valeur alimentaire d'un ensilage (Lafrenière *et al.*, 1998). L'entrée d'oxygène dans le silo doit donc être minimisée. Pour ce faire, il faut que le matériel soit compact, le silo fermé rapidement et ce, de façon étanche (Lafrenière *et al.*, 1998; Pahlow *et al.*, 2003).

La dégradation des protéines de l'ensilage origine de la protéolyse. La protéolyse est l'hydrolyse des protéines en peptides et acides aminés principalement par des enzymes de la plante. Les produits de cette protéolyse peuvent ensuite être utilisés par différents types de bactéries (*Clostridium* et entérobactéries) pour donner de l'azote ammoniacal, des amines et des acides organiques. Cette dégradation des protéines réduit l'utilisation de l'azote de l'ensilage par les ruminants (Amyot, 2003; Rook et Hatfield, 2003).

Durant cette phase, les microorganismes peuvent se développer avec plus ou moins d'intensité dépendamment des facteurs environnementaux (conditions climatiques) et agronomiques (espèce de la plante et stade de maturité, fertilisation et préfanage) ainsi que des conditions d'entreposage (type de silo, temps de remplissage, étanchéité du silo, densité et quantité d'oxygène). Certaines levures, moisissures et bactéries aérobies passeront alors en état de latence aussitôt que l'oxygène sera éliminé du silo (Pahlow *et al.*, 2003). Cette phase doit donc être la plus courte possible.

1.1.2 Phase de fermentation

La phase de fermentation débute lorsque l'oxygène est complètement éliminé du silo. L'atteinte de ces conditions induit la lyse des cellules. Elle permet donc d'augmenter la disponibilité des sucres pour les bactéries lactiques dont seulement une partie avait été rendu disponible lors des traitements mécaniques du fourrage (hachage, lacération et macération). Plus l'ensilage est humide et plus la température est élevée, plus il y aura de lyse cellulaire (Muck et Pitt, 1993). La lyse permet aussi le relâchement des enzymes pouvant hydrolyser les protéines. Si l'anaérobiose est maintenue et que les sucres facilement fermentescibles ne sont pas limitants, les bactéries lactiques vont dominer la microflore et ainsi produire assez d'acide lactique pour abaisser suffisamment le pH et assurer la stabilité anaérobie. Si les sucres fermentescibles sont présents en concentration limitée, la fermentation sera moins intense et la diminution du pH sera moins importante. Si les concentrations en acides organiques sont trop faibles, les entérobactéries et les *Clostridium* ne seront donc pas inhibés (Muck et Pitt, 1993).

1.1.3 Phase de stabilité anaérobie

La troisième phase est la stabilité anaérobie. Elle est atteinte lorsque le pH est suffisamment bas pour inhiber la croissance de microorganismes indésirables. Le pH à atteindre pour inhiber les bactéries butyriques est en relation avec la teneur en matière sèche. Plus, la matière sèche est faible, plus le pH devra être bas (Wieringa, 1969). Un ensilage butyrique est caractérisé par des quantités d'acide butyrique et d'azote ammoniacale élevées. Durant cette phase, si les sucres sont en concentration élevée, les levures fermentaires (levures qui n'ont pas besoin d'oxygène pour leur croissance) vont pouvoir les utiliser pour produire de l'éthanol (Pahlow *et al.*, 2003). Durant cette phase, il est important de s'assurer de l'étanchéité des silos car les levures et certaines moisissures près de la surface peuvent se développer s'il y a présence d'air.

1.1.4 Phase d'alimentation

La quatrième phase, celle de l'alimentation, débute lors de l'ouverture du silo. L'oxygène peut alors diffuser au travers le matériel ensilé, ce qui ramène le milieu en condition aérobie. Les levures non-fermentaires pouvant tolérer l'acidité vont être les premières à se développer. Elles vont d'abord métaboliser les sucres résiduels et ensuite l'acide lactique pour produire du CO₂, de l'eau et de la chaleur. Le pH va ainsi augmenter et il y aura prolifération des autres microorganismes indésirables, comme les *Bacillus* (Pahlow *et al.*, 2003). Lors de la mise en silo, tout devrait être mis en œuvre pour que la phase aérobie soit courte et, par conséquent, que les microorganismes aérobies indésirables n'aient pas le temps de se développer pour ainsi assurer une meilleure stabilité aérobie lors de la phase d'alimentation (Lafrenière *et al.*, 1998).

1.2 Caractéristiques biochimiques de la plante

Plusieurs facteurs doivent être pris en considération afin de réussir un ensilage et en assurer sa conservation. Une bonne maîtrise des technologies reliées à la fabrication et aux conditions d'entreposage est nécessaire afin d'avoir une bonne conservation. Les différentes plantes fourragères possèdent des caractéristiques différentes en relation avec leur «aptitude» à la fermentation. Cette aptitude est déterminée principalement par leurs caractéristiques biochimiques telles que le pouvoir tampon, les teneurs en sucres et en matière sèche. À partir de ces trois caractéristiques, on peut déterminer le coefficient de fermentation du fourrage, qui représente l'ensilabilité de la plante. Plus la valeur du coefficient de fermentation est grande (45 et plus), plus la probabilité d'obtenir une bonne conservation est élevée (Weissbach, 1996).

1.2.1 Pouvoir tampon

Le pouvoir tampon est la capacité d'une plante à résister aux changements de pH. Plus le pouvoir tampon sera élevé, plus il sera difficile d'abaisser le pH et plus la quantité d'acide lactique devant être produite sera élevée. Le pouvoir tampon est calculé selon la quantité d'anions issus de la dissociation des acides organiques, d'orthophosphates, de sulfates, de nitrates et de chlorures de la plante (Lafrenière, 2002). Le pouvoir tampon est déterminé au laboratoire d'après la quantité d'acide lactique nécessaire pour abaisser le pH initial d'un échantillon de plantes jusqu'à un pH de 4 (McDonald *et al.*, 1991). Les graminées ont un pouvoir tampon moins élevé que les légumineuses parce que leur concentration en acides organiques est plus faible. Par ailleurs, le pouvoir tampon diminue avec la maturité d'une plante et le niveau de préfanage atteint et il augmente suite à l'application d'une fertilisation azotée (McDonald *et al.*, 1991).

1.2.2 Sucres fermentescibles par les bactéries lactiques.

Les cellules végétales synthétisent différents types de sucres, mais ils ne sont pas tous fermentescibles par les bactéries lactiques. Les sucres de la plante sont regroupés en deux catégories : sucres structuraux et les sucres non-structuraux. Les sucres structuraux regroupent les polysaccharides tels que les substances pectiques, l'hémicellulose et la cellulose. Ils composent les parois cellulaires et les fibres. Ces sucres ne sont pas utilisés directement par les bactéries lactiques. Ils doivent être préalablement hydrolysés en monosaccharides (McDonald *et al.*, 1991). Cette hydrolyse est principalement effectuée par des enzymes de la plante ou encore par les acides organiques produits lors de la fermentation lorsque le milieu devient acide. Ils ont donc une contribution plus ou moins importante à l'abaissement du pH (Fenlon *et al.*, 1995).

Les sucres non-structuraux sont principalement le sucrose, le glucose, le fructose, les fructanes et l'amidon. L'amidon est surtout présent dans les légumineuses et les plantes tropicales et il n'est généralement pas fermenté par les bactéries lactiques. De plus, l'amidon n'est pas soluble dans l'eau alors que les autres sucres non-structuraux le sont ; c'est pourquoi, les sucres importants pour l'ensilage sont appelés sucres solubles (SS) (McDonald *et al.*, 1991). Chez les graminées de climat tempéré, les fructanes constituent la principale réserve de sucres non-structuraux (McDonald *et al.*, 1991) et ils sont une importante source d'énergie lors de la repousse après la fauche ou le broutage. Les fructanes sont des chaînes linéaires avec un nombre variable de fructoses attachés à une molécule de sucrose. Le degré de polymérisation (DP) dépend du nombre de fructose et varie beaucoup d'une espèce à l'autre et au sein d'une même espèce (tableau 1). Le stade de maturité et les conditions climatiques précédents la coupe sont des facteurs qui peuvent influencer le nombre de DP chez une plante (Winters *et al.*, 1998). Les concentrations totales en SS sont très variables. Les quantités de glucose et fructose peuvent représenter de 1 à 3% de

la quantité totale de SS tandis que le sucrose peut atteindre 20 à 80% des SS (%M.S) (McDonald *et al.*, 1991). Les fructanes peuvent constituer entre 50 et 90% de la fraction de SS disponible chez une plante (Winters *et al.*, 1998). On retrouve d'avantage de SS chez les graminées que chez les légumineuses (McDonald *et al.*, 1991). Pour une même espèce de graminée, les quantités de SS peuvent varier selon les conditions agronomiques tel que le moment de la journée, le stade de maturité, la fertilisation, l'intensité lumineuse et la température (Smith, 1973). Par exemple, les quantités de SS augmentent tout au long de la journée pour ensuite diminuer lorsque la nuit arrive. Selon les données rapportées par McDonald *et al.* (1991) et Smith (1973), ce sont les quantités de sucrose qui semblent varier de façon plus importante. Pelletier *et al.*, (2009) ont démontré que les quantités de fructanes peuvent aussi varier selon le moment de la journée. Les concentrations en SS augmentent selon le stade de maturité, pouvant passer de $139 \text{ g} \cdot \text{kg MS}^{-1}$ (début mai) à $245 \text{ g} \cdot \text{kg MS}^{-1}$ (début juin) (McDonald *et al.*, 1991). Cette augmentation est principalement relié aux quantités plus élevées de fructanes (Smith, 1973; Pelletier *et al.*, 2009).

Malgré que l'on retrouve beaucoup plus de fructanes que tout autre SS sur les plantes, leur contribution comme substrats pour les bactéries lactiques au début de la fermentation est plutôt faible puisque ces derniers sont dégradés lentement (Winters *et al.*, 1998). Même s'ils peuvent être utilisés directement par les bactéries lactiques, les SS tels que le glucose et le fructose qui sont les substrats principaux des bactéries lactiques sont en quantités limités pour débiter la fermentation (Winters *et al.*, 1998). Le taux de diminution des fructanes est autant le produit des enzymes de la plante que celui des BLE. Par contre, il y aurait moins de 3% des BLE qui seraient capables d'utiliser directement les fructanes (Merry *et al.*, 1995). Les fructanes doivent être hydrolysés pour ensuite contribuer au processus de fermentation. Les liens de type furanosyl qui relient les molécules de fructoses seraient très sensibles aux conditions acides (Lafrenière, 2002). Les fructanes seraient donc hydrolysés durant le processus de fermentation avec l'abaissement du pH. Par contre, des essais faits au laboratoire

de l'URDAAT n'ont pas permis de démontrer l'hydrolyse de ces liens même à des pH inférieurs à 4,0 (Drouin, communication personnelle).

1.2.3 Matière sèche

La teneur en matière sèche joue aussi un rôle important dans l'aptitude d'une plante à la fermentation. Plus la matière sèche sera faible, plus le pH doit descendre bas pour inhiber le développement des bactéries butyriques (Wieringa, 1969). Par ailleurs, les fourrages ensilés à une matière sèche plus grande que 50% fermenteront moins intensément qu'avec une matière sèche plus basse (Kung, 2000). L'augmentation de la matière sèche élève la pression osmotique du milieu ce qui a comme effet d'inhiber le développement des bactéries lactiques. Une pression osmotique donnée n'a pas le même effet sur toutes les bactéries. Une matière sèche entre 30 et 35% permet d'inhiber la croissance des bactéries butyriques mais pas celles des bactéries lactiques (Kung, 2000). Pour permettre de contrôler les bactéries butyriques, Weissbach (1996) ont déterminé la relation entre la matière sèche à atteindre et la capacité d'acidification d'une plante :

$$Y = 450 - 80(X)$$

où $X = \text{sucre solubles (g} \cdot \text{kg MS}^{-1}) / \text{pouvoir tampon (g acide lactique} \cdot \text{kg MS}^{-1})$

$$Y = \text{MS (g} \cdot \text{kg FF}^{-1})$$

Tableau 1. Degré de polymérisation (DP) des fructanes pour différentes graminées fourragères.

Espèces	DP	Références
Ray-grass (<i>Lolium perenne</i> L.)	26 ^x	Merry <i>et al.</i> , 1995
	30	Rook et Hatfield, 2003
Fléole des prés (<i>Phleum pratense</i> L.)	80	Müller et Steller, 1995
	155	Rook et Hatfield, 2003
	260	Smith, 1973
Dactyle pelotonné (<i>Dactylis glomerata</i> L.)	52	Rook et Hatfield, 2003
Brome (<i>Bromus inermis</i> L.)	26	Smith, 1973

^x Équivaut sensiblement au nombre d'unités de fructose sur une chaîne de fructanes

1.3 Bactéries lactiques dans les ensilages

1.3.1 Bactéries lactique épiphytes (BLE)

1.3.1.1 Types de BLE

Les bactéries lactiques épiphytes (BLE) sont celles que l'on retrouve naturellement sur la plante. Il existe deux types de bactéries lactiques, les homofermentaires (*Lactobacillus*, *Pediococcus* et *Streptococcus*) et les hétérofermentaires (*Lactobacillus* et *Leuconostoc*). Les homofermentaires fermentent les sucres disponibles en acide lactique seulement tandis que les hétérofermentaires, produisent en plus, de l'acide acétique et de l'éthanol (McDonald *et al.*, 1991). L'acide lactique permet de diminuer plus efficacement le pH que l'acide acétique et l'éthanol (Kung, 2000). Il est donc préférable d'avoir d'avantage de BLE homofermentaires que de BLE hétérofermentaire lors de la mise en silo.

Les différentes espèces et souches de bactéries lactiques présentes sur la plante jouent aussi un rôle important dans la fermentation. Leur composition sur la plante est très diversifiée et varie selon les paramètres associées à l'ensilabilité (Bolsen *et al.*, 1996). Les résultats de Lafrenière (2002) ont démontrés que la composition des BLE peut varier d'une récolte à l'autre. Les plus grandes quantités de BLE homofermentaires ont été observées lors de la récolte tardive du premier cycle de végétation ainsi que lors de la récolte au deuxième cycle de végétation tandis que les plus grandes quantités de BLE hétérofermentaires ont été observées lors de récolte hâtive au premier cycle de végétation. Le préfanage a aussi influencé la composition de BLE mais différemment d'une récolte à l'autre. Il est donc difficile de prévoir la composition de BLE sur les plantes et l'ajout d'un inoculant lactique homofermentaire peut pallier à ce problème.

1.3.1.2 Variabilité des bactéries lactiques épiphytes

Le nombre de bactéries lactiques épiphytes varie beaucoup d'une étude à l'autre (tableau 2) et plusieurs facteurs peuvent venir expliquer cette variation. Moran *et al.*, (1991) ont démontré qu'il y a des différences quant au nombre de BLE sur les différentes espèces de plantes fourragères mais aussi au niveau des parties de la plante. Des dénombrements variant de 10^4 et 10^7 UFC · g FF⁻¹ ont été observés entre les différentes parties de la plante. Le nombre le plus élevé de BLE a été mesuré au niveau des parties mortes à la base de la plante ($7,39 \log$ UFC · g FF⁻¹) (Moran *et al.*, 1991).

Il y a beaucoup de variation entre des échantillons prélevés avant la fauche et les échantillons prélevés quelque temps après la fauche (Pahlow, 1991). Les dénombrements effectués après la fauche sont plus élevés que ceux fait avant. Les délais entre les deux dénombrements apparaissent trop courts pour expliquer une croissance des BLE durant cet intervalle d'échantillonnage. Pour expliquer ces observations, Pahlow (1991) a proposé l'hypothèse suivante : la majorité des bactéries lactiques seraient en dormance lorsqu'elles sont sur la plante au champ. Lors de la coupe certaines enzymes seraient relâchées et permettraient d'inhiber cet état de dormance. Il y a aussi de la variabilité pour les BLE durant la saison. Les travaux de Rooke (1990) ont démontré que le nombre de bactéries lactiques épiphytes est variable durant la saison. On en retrouve davantage en juillet et août lors de la deuxième coupe ($5,5 \log$ UFC · g FF⁻¹), qu'en mai et juin, lors de la première coupe ($4,9 \log$ UFC · g FF⁻¹). Plus près de nous, des variabilités saisonnières ont aussi été observées pour les BLE dans un même champ avec des variations de 10^3 à 10^5 UFC · g FF⁻¹ de la fin juin au début du mois août (Lafrenière, 2002). Ces observations semblent indiquer que les températures durant la croissance des plantes peuvent aussi venir influencer le nombre de BLE.

Tableau 2. Dénombrement des BLE sur différentes espèces de plantes fourragères

Espèces	BLE (log UFC · g FF ⁻¹)	Références
Graminées	4,0 à 6,0	Lafrenière, 2002
	2,9 à 7,3	Dellaglio et Torriani, 1991
Ray-grass vivace (<i>Lolium perenne</i> L.)		
	Juillet 5,46	Rooke, 1990
	Mai 4,85	Rooke, 1990
Ray-grass annuel (<i>Lolium multiflorum</i> L.)		
	7,23	Moran et al. 1991
Luzerne	5,3	Lafrenière, 2002
	2,6 à 4,7	Lafrenière, 2002
	3,7	Lafrenière, 2002
	3,8 à 8,3	Lafrenière, 2002
	1,3 à 3,6	Dellaglio et Torriani, 1991
Maïs	1.0 à 5,48	Dellaglio et Torriani, 1991

1.3.2 Bref historique des inoculants lactiques

L'ensilage est un processus complexe où interviennent plusieurs facteurs. Pour assurer une bonne conservation, les producteurs peuvent avoir un contrôle sur quelques-uns de ces facteurs comme l'espèce de plante, le type de silo, la technique de mise en silo; mais ils n'ont aucun contrôle sur les conditions climatiques ou encore sur le nombre de bactéries lactiques épiphytes et leur efficacité. Ce sont ces prémisses qui ont servi l'industrie pour le développement des inoculants lactiques. Présentement, il existe différentes formulations de ces inoculants et ils représentent 78% des additifs disponibles sur le marché canadien (Ouellet et Lafrenière, 2005).

L'utilisation des bactéries lactiques comme inoculant a commencé au début du 20^e siècle. Le premier objectif de ces inoculants était d'améliorer la phase de fermentation lors du processus de fermentation (Weinberg et Muck, 1996). Malgré de bons résultats au niveau expérimental, les premières applications en conditions commerciales n'ont pas été un succès. Les souches utilisées n'étaient pas adaptées aux conditions d'ensilage des plantes et les cultures bactériennes n'étaient souvent plus viables au moment de l'application sur le fourrage.

Les premières études sur les inoculants lactiques utilisaient des bouillons de culture. Cette façon de faire a été la même pour les entreprises commerciales. Les inoculants lactiques arrivaient à la ferme sous forme de bouillon de culture pour être ensuite appliqués directement sur les fourrages (Merry *et al.*, 1994). Le temps entre la mise en culture et l'application sur les fourrages à la ferme était trop long; conséquemment les bactéries mourraient par manque de nutriments.

1.3.2.1 Sélection des souches de bactéries lactiques

Une meilleure connaissance des réactions microbiologiques et biologiques dans le processus d'ensilage a permis le développement de nouveaux inoculants plus efficaces.

Les travaux de Whittenbury ont permis d'élaborer une liste de critères auxquelles une souche bactérienne devrait satisfaire afin d'être utilisée comme inoculant (Weinberg et Muck, 1996). La souche doit être compétitive envers les autres microorganismes épiphytes, elle doit croître rapidement, elle doit être homofermentaire et produire un maximum d'acide lactique et ce, en peu de temps. Elle doit être tolérante à l'acide, être capable de croître dans un matériel à haute teneur en matière sèche et finalement tolérer une température de 50°C (Weinberg et Muck, 1996). Encore aujourd'hui, les recherches sur la sélection des souches de bactéries lactiques comme inoculant se basent principalement sur ces critères.

Par contre, les inoculants lactiques développés sous ces conditions ne sont pas toujours capables de donner un ensilage de qualité. Ils ont de la difficulté à dominer la fermentation et ne sont pas capables d'inhiber complètement l'activité des microorganismes indésirables. Avec les années, de nouveaux critères de sélection ont été ajoutés à la liste dont la capacité d'assurer une stabilité aérobie (Weinberg et Muck, 1996).

Certains chercheurs essaient d'isoler de nouvelles souches de bactéries lactiques qui pourraient être mélangées avec une ancienne souche ou utilisées seules et qui pourraient être efficaces pour des fourrages spécifiques. D'autres veulent inclure une souche de bactérie lactique hétérofermentaire, comme le *Lactobacillus buchneri*, ou encore sélectionner des souches de bactéries lactiques pour leur habilité à contrôler les microorganismes pathogènes de l'ensilage tel que les *Listeria*. Il y a aussi l'utilisation de microorganismes autres que les bactéries lactiques comme les bactéries propioniques qui produisent de l'acide propionique, un inhibiteur des levures (Weinberg et Muck, 1996).

En manipulant génétiquement par recombinaison ou clonage de gènes spécifiques comme ceux de l'amylase, de la cellulase et de la xylanase on pourrait arriver à développer un inoculant. En effet, ces enzymes peuvent dégrader les polysaccharides augmentant ainsi la disponibilité des sucres solubles (Weinberg et Muck, 1996).

Il a été mentionné précédemment que les concentrations en fructanes des plantes sont beaucoup plus importantes que les sucres tels que le fructose, le glucose et le sucrose. De plus, moins de 3% des bactéries lactiques peuvent utiliser directement les fructanes. Il devient donc intéressant de sélectionner des souches de bactéries lactiques capables d'utiliser ces fructanes pour en faire un inoculant spécifique pour les fourrages de graminées. Une telle bactérie a été sélectionnée par l'équipe de Davies *et al.*, (2002). Selon les résultats obtenus par cette équipe, cette bactérie lactique serait capable d'utiliser les fructanes et permettrait une meilleure fermentation des ensilages. Ce nouvel inoculant est commercialisé en Europe sous la marque Power Start.

1.3.2.3 Nombre de bactéries lactiques

L'inoculant doit permettre une diminution rapide du pH dans les ensilages. Pour que le pH commence à descendre, une population d'environ 10^8 UFC · g FF⁻¹ doit être atteinte (Jaster, 1995). Comme il a été mentionné plus haut, les quantités de bactéries lactiques épiphytes sont très variables (tableau 2). De plus, de ce nombre plusieurs sont hétérofermentaires. Un faible nombre de bactéries lactiques allongera le temps de latence qui précède le déclin du pH puisque la quantité d'acide lactique sera atteinte plus lentement (Jones *et al.*, 1992).

Selon Pahlow (1986) et Satter *et al.* (1991) pour qu'un inoculant ait un effet positif sur la fermentation et les performances animales, le nombre de bactéries inoculées doit être de dix fois supérieur au nombre de bactéries lactiques épiphytes. Compte tenu des observations faites en Europe avec le projet Eurobac (Lingvall et Lindgren, 1986), les recommandations sur le nombre de bactéries lactiques à ajouter sont de 10^6 UFC · g FF⁻¹. En Amérique, les recommandations sont de 10^5 UFC · g FF⁻¹ (Bolsen *et al.*, 1996).

1.3.2.4 Mode d'application des inoculants lactiques

Avec les avancées technologiques tels que l'arrivée des méthodes d'encapsulation et de lyophilisation, les inoculants lactiques présentement sur le marché sont sous forme de poudre hydrosoluble ou granulaire. Les poudres hydrosolubles, obtenues par lyophilisation, sont réhydratées dans l'eau à la ferme selon les instructions du fabricant et appliquées uniformément sur le fourrage lors de la récolte ou au silo.

Depuis quelques années, certaines équipes de chercheurs ont repris l'idée d'utiliser des inoculants sous la forme d'un bouillon nutritif (Merry *et al.*, 1994). Leur hypothèse est que le temps d'activation des bactéries lactiques provenant des inoculants est plus lent que celui des bactéries lactiques provenant des inoculants activés dans un bouillon nutritif. L'équipe de Merry *et al.*, (1994) a démontré que l'application d'une souche de bactérie métaboliquement active (activé dans un bouillon de culture durant 24 hrs) comparée à une même souche de bactérie mais sous forme hydrosoluble réhydraté dans l'eau juste avant son application sur le fourrage permet un démarrage plus rapide de la fermentation. Le temps de latence est ainsi moins long et le déclin du pH va être beaucoup plus rapide. Contrairement aux premières générations de ce type d'inoculant, celui développé ces dernières années est mis en bouillon par le producteur à la ferme et appliquée directement sur le fourrage (Davies *et al.*, 2002).

1.4 Objectifs et hypothèses

Théoriquement, lorsque l'ensilabilité des plantes est bonne, la conservation sous forme d'ensilage sera aussi bonne. Toutefois, des études récentes ont démontré que la corrélation entre l'ensilabilité et la conservation n'est pas très élevée. L'une des hypothèses est que le pH_w (pH de stabilité anaérobique) n'est pas atteint assez rapidement. Le temps de latence (temps avant que le pH commence à descendre) ainsi que le déclin du pH (descente du pH de l'ensilage jusqu'au pH_w) seraient trop longs. Le nombre de bactéries lactiques, les sucres disponibles pour la fermentation et leur utilisation par les bactéries lactiques ainsi que leur mode d'application sur les plantes lors de l'ensilage sont tous des facteurs qui peuvent influencer les paramètres de la fermentation. L'objectif de cette étude est donc, dans un premier essai, de déterminer si la dose d'inoculant lactique appliquée sur les fourrages a un impact les paramètres de la cinétique de fermentation ainsi que sur les paramètres de conservation. Dans un deuxième essai, les deux objectifs sont de déterminer si

l'utilisation d'un inoculant ayant la propriété d'utiliser les fructanes comparé à un inoculant n'ayant pas cette caractéristique pourra influencer les paramètres de la cinétique de fermentation ainsi que les paramètres de conservation et si le mode d'application (réhydraté ou en culture viable) d'un inoculant peut aussi influencer ces paramètres

Hypothèses

1. L'application de 10^6 UFC · g FF⁻¹ et plus d'un inoculant lactique permet un démarrage plus rapide de la fermentation (diminution du temps de latence), une diminution rapide du pH (taux de diminution du pH) et améliore les paramètres de conservation comparativement à une application de l'ordre de 10^5 UFC · g FF⁻¹ qui est la dose recommandée en Amérique du Nord.
2. L'application d'un inoculant pouvant utiliser directement les fructanes permet un démarrage plus rapide de la fermentation (diminution du temps de latence), une diminution rapide du pH (taux de diminution du pH) et améliore les paramètres de conservation.
3. L'application d'un inoculant métaboliquement actif sur les fourrages permet un démarrage plus rapide de la fermentation (diminution du temps de latence), une diminution plus rapide du pH (taux de diminution du pH) et améliore ainsi les paramètres de conservation

CHAPITRE 2

MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1 Préparation du matériel végétal

Les deux essais ont été réalisés sur le site de la Ferme de recherche sur le bovin de boucherie de Kapuskasing (49° 25' latitude, 82° 23' longitude). Pour les deux essais, une parcelle (30,5 m x 91,4 m) de fléole des prés (*Phleum pratense* L.) cultivar Champ (9 kg · ha⁻¹) a été ensemencée avec un semoir Brillon en 2006. Cette parcelle a été implantée dans un loam argileux Hearst ayant été en jachère la saison précédente. Une analyse de sol, réalisée l'automne 2005 a déterminé que ce sol avait un pH de 7,4, une concentration en phosphore de 32 g · kg⁻¹ et une concentration en potassium de 242 g · kg⁻¹. Lors de l'implantation au printemps 2006, 30 kg N · ha⁻¹ sous forme de NH₄NO₃ ont été épandus à la volée immédiatement après le semis. Aucune fertilisation phosphatée et potassique n'a été nécessaire selon l'analyse de sol. Le contrôle des mauvaises herbes annuelles a été fait par la fauche des parcelles au mois de juillet. Une fauche a été faite à la fin septembre à 8 cm de la surface du sol. Au printemps 2007, pour l'essai 1, la parcelle a reçu une fertilisation azotée de 70 kg N · ha⁻¹ sous forme de NH₄NO₃ épandus à la volée. Après la première coupe, une fertilisation azotée de 50 kg N · ha⁻¹ a été appliquée pour permettre une deuxième récolte en août pour l'essai 2.

Pour l'essai 1, la fléole des prés a été récolté au stade début épiaison le 28 juin 2007 ce qui correspond au stade 45-50 de l'échelle de maturité selon Simon et Park (1983). Pour l'essai 2, la récolte a été faite au stade épiaison soit le stade 50-58 de l'échelle de maturité selon Simon et Park (1983) le 27 août 2007. Pour chacun des essais, trois andains de 91,4 m de longueur ont été fauchés à une hauteur variant de 11 à 12 cm. Les andains ont été coupés à intervalles de façon à pouvoir les traiter indépendamment et obtenir les mêmes teneurs en matière sèche pour chacune des répétitions. Une fois l'andain coupé et ramassé à l'aide d'une fourragère, une quantité de 5 kg a été sélectionnée aléatoirement puis préfanée artificiellement au four à air forcé de façon à atteindre une matière sèche de 35%. Cette teneur en matière sèche a été atteinte en moins de deux heures. Le matériel pour chacune des répétitions a ensuite été séparé selon le nombre de traitements (quatre pour l'essai 1 et cinq pour l'essai 2).

2.2 Fabrication des silos

Les silos expérimentaux ont été fabriqués en utilisant des sacs de plastique de 10 x 16 cm et d'une épaisseur de six mils. Chaque sac a été rempli de 250 g de fléole des prés haché. L'air de chacun des sacs a ensuite été évacué à l'aide d'un appareil commercial (Vaccum-Nel, HI-TECH) selon la technique décrite par (Johnson *et al.*, 2005). Les silos ont ensuite été entreposés à 25°C jusqu'à leur ouverture.

Pour l'essai 1, les silos ont été inoculés avec du *Lactobacillus plantarum* (Biomax SI-50, Chr. Hansen Inc.) avec une dose de 10^5 , 10^6 , $10^7 \cdot \text{g FF}^{-1}$. Ces doses ont été comparées à un traitement témoin n'ayant pas reçu de traitement d'inoculation. Pour l'essai 2, deux inoculants commerciaux ont été utilisés soit le Biomax SI-50 (Chr. Hansen Inc.) (*Lactobacillus plantarum*) et le Powerstart (Genus Breeding Ltd, UK) (*Lactobacillus plantarum*). La dose visée pour chaque traitement était de 10^6 UFC $\cdot \text{g FF}$. Pour les traitements avec réhydratation, les deux inoculants ont été réhydratés

dans de l'eau distillée stérile. Cette réhydratation a eu lieu environ 30 minutes avant son application sur les fourrages. Pour les traitements en culture viable, les deux inoculants ont été cultivés entre 22 et 24 heures dans le bouillon de culture fourni avec l'inoculant Powerstart. Ces traitements ont été comparés à un traitement témoin n'ayant pas reçu de traitement d'inoculation. Pour chacun des deux essais, plusieurs silos avec le même traitement ont été préparés pour avoir des temps d'ouverture de silos selon la progression suivante : 0, 6, 12, 24, 48, 72 heures et 7, 14, 28 et 105 jours. Tous les traitements pour les deux essais ont été inoculés par vaporisation (100mL) sur les 5 kg de fourrages. Les traitements témoins de chacun des essais ont aussi été traités avec 100 mL d'eau stérile.

Un échantillon d'environ 300 g sur le 5 kg de chaque répétition a été utilisé pour déterminer la matière sèche. Cet échantillon a été soumis au four micro-onde (Litton, Inc.) durant deux minutes à intensité maximale (1200 W), puis au four à convection (Unitherm Drier, Birmingham & Blackburn Construction Ltd., England) à 55°C jusqu'à l'obtention d'un poids sec constant. Ces échantillons ont ensuite été broyés avec un broyeur Wiley (Standard model 3 ; Arthur H. Thomas Co., Philadelphia, PA, USA) muni d'un tamis de 1 mm et conservés pour des analyses ultérieures.

2.3 Ouverture des silos

Lors de l'ouverture de chaque silo, deux échantillons de 20 g ont été prélevés. Ces échantillons ont été utilisés pour les dénombrements de bactéries lactiques et les *Clostridium*. Un 100 g additionnel a été prélevé puis congelé à -20°C pour les analyses ultérieures de pH, AGV, azote ammoniacal et acide lactique. Finalement, le reste du matériel a aussi été congelé pour éventuellement être lyophilisé (35, Super XL, Virtis, New-York, USA) pour établir la teneur en matière sèche des ensilages. Ces échantillons secs ont par la suite été broyés avec un broyeur Wiley (Standard

model 3 ; Arthur H.Thomas Co., Philadelphia, PA, USA) muni d'un tamis de 1 mm et conservés pour des analyses ultérieures.

2.4 Analyses biochimiques

2.4.1 Fourrage vert

A partir des échantillons séchés et broyés lors de la mise en silo (correspondant au temps 0), les sucres solubles et les nitrates ont été déterminés par colorimétrie. L'extraction des sucres solubles a été faite par agitation de 0,1 g de matériel séché dans 25 ml d'eau distillée à la température de la pièce pendant une heure. Par la suite, ces suspensions ont été filtrées par gravité en utilisant un papier Whatman 541. Les sucres solubles ont été quantifiés à partir du filtrat en utilisant la méthode au phénol/acide sulfurique de Dubois *et al.* (1955) avec le glucose comme courbe d'étalonnage. Les nitrates ont été quantifiés par nitrification de l'acide salicylique selon la méthode utilisé par Lafrenière (2002). Le pouvoir tampon a été déterminé après macération de 1,0 g de matériel séché dans 50 ml d'eau déionisée durant une heure. Le pouvoir tampon a été calculé à partir de la quantité d'acide lactique (0,1N) nécessaire pour faire descendre le pH à 4,0 (Demarquilly 1986). Les milliéquivalents d'acide lactique ont été convertis en grammes d'acide lactique par kg de MS. L'azote total a été déterminé à partir de 0,5 g de matériel séché et broyé selon la méthode 7,022 de l'Association des chimistes analytiques (AOAC 1990).

2.4.2 Ensilage

Le pH des ensilages a été déterminé après une heure de macération de deux échantillons de 10 g d'ensilage congelé dans 50 ml d'eau distillée. La détermination de la matière sèche pour le temps de 105 jours a été réalisée à partir d'un échantillon de 100 g d'ensilage par lyophilisation (Ultra 35 Super XL, Virtis, New York, USA)

jusqu'à l'obtention d'un poids sec constant. Les échantillons ont ensuite été broyés avec un broyeur Wiley (Standard model 3 ; Arthur H. Thomas Co., Philadelphia, PA, USA) muni d'un tamis de 1 mm. L'azote total a été quantifié à partir de 0,5 g de matériel séché et broyé selon la méthode 7,022 de l'Association des chimistes analytiques (AOAC 1990). Les acides gras volatils (AGV) (acide acétique, acide n-butyrique, acide iso-butyrique, acide n-valérique, acide propionique) et l'éthanol ont été extraits à partir d'une quantité de 20 g d'ensilage dans 180 ml d'HCL 0,1M. Ce mélange a été mis dans une bouteille de 250 ml et puis réfrigéré à 4°C durant 24 heures avec une agitation manuelle occasionnelle (Flipot *et al.*, 1976). Une filtration par gravité a été réalisée en utilisant un papier Whatman 541. Le filtrat a été utilisé pour déterminer les AGV, l'azote ammoniacal et l'acide lactique.

Le dosage de l'acide lactique a été fait par colorimétrie selon la méthode de Barker et Summerson (1941) sur les ouvertures de silos de 12, 24, 72 heures et 7, 14, 28 et 105 jours. Des essais préliminaires effectués dans les laboratoires de l'URDAAT ont démontrés que les quantités d'acide lactique au J0 sont trop faibles pour être détectées. Les AGV ont été analysés pour toutes les ouvertures. Un 5 ml de filtrat obtenu lors de l'extraction a été déprotéiné en y ajoutant une résine (1 g) d'échange cationique Dowex (Sigma, Ontario, Canada). Les AGV ont ensuite été déterminés et quantifiés par chromatographie gazeuse (Varian modèle 3800, Montréal, Canada) muni d'un auto-échantillonneur modèle CP 8400. Les échantillons de 1,0 µl ont été vaporisés dans l'injecteur (modèle 1177) avec un ratio de division de 1 :100 à une température de 250°C. Le gaz porteur était de l'hélium avec un débit constant de 1,7 mL min⁻¹. La séparation a été effectuée sur une colonne capillaire (CP-Wax 58/ffap de 50 m x 0,32 mm x 1,2 mm). Le profil de température du four pendant l'élution a été de 100°C pour la première minute, de 100 à 150°C avec une augmentation de 15,0°C par minute, de 150°C à 210°C avec une augmentation de 9,0°C par minute durant 30 minutes pour finalement atteindre une température de 230°C avec une augmentation de 12°C par minute. La détection a été réalisée avec un détecteur à

ionisation dont la flamme atteignait une température de 250°C avec l'azote comme gaz d'appoint.

L'azote ammoniacal a été mesuré à partir d'un volume de 25 ml provenant du même extrait que celui pour les AGV. Le dosage a été fait avec du MgO selon la méthode 920.03 de l'association des chimistes analytiques (AOAC, 1995). Les sucres solubles résiduels ont été dosés par colorimétrie de la même façon que pour les fourrages frais pour les temps 1, 3, 7, 28 et 105 jours. La détermination des types de sucres (glucose, fructose, sucrose et fructanes) et leur concentration, ont été faites par chromatographie liquide haute pression (CLHP) selon la méthode décrite par Pelletier *et al.*, (2009). Les ouvertures 0, 1, 3, 7, 28 et 105 jours ont été analysées pour les deux essais.

2.5 Analyses microbiologiques

2.5.1 Dénombrement des bactéries lactiques épiphytes

Pour chaque ouverture et chacun des traitements, le dénombrement des bactéries lactiques a été effectué. Une quantité de 20 g de matériel a été prélevé et mélangé à 180mL d'eau peptonée stérile (2,0 g de Bacto-peptone L⁻¹ et 0,1 ml L⁻¹ de Tween 80) dans un sac stérile de polyéthylène Whirl Pack. Ces sacs ont été agités dans un Stomacher® (Seward, Royaume-Uni) pendant une minute de chaque côté. À partir de cette suspension, une série de dilution 1 :10 a été faite dans de l'eau peptonée stérile. L'inoculation a été faite en triplicata sur milieu gélosé en utilisant la technique d'étalement en surface. Les bactéries lactiques ont été dénombrées un milieu Rogosa (Oxoid, Ontario, Canada) additionné de 0,4 g L⁻¹ de cycloheximide (Sigma, Ontario, Canada). L'incubation a été faite en milieu aérobie à 28°C durant 3 jours. Les dénombrements ont été faits à partir des plats de Pétri des dilutions qui comptaient entre 20 et 200 colonies.

2.5.2 Dénombrement des spores de *Clostridium*

Le dénombrement des spores de *Clostridium* a été fait à partir de 20 g de matériel prélevé et congelé lors de l'ouverture de chaque silo. Les temps 0, 24 heures, 7, 14 et 105 jours de chaque répétition de chaque traitement ont été analysés. Les 20 g d'ensilage ont été ajoutés à 180 mL d'eau peptonée stérile (2,0 g de Bacto-peptone L⁻¹ et 0,1 ml L⁻¹ de Tween 80) et agité dans un Stomacher® (Seward, Royaume-Uni). Ces sacs ont été mélangés durant une minute de chaque côté. À partir de cette suspension, une série de dilution 1 :10 a été faite dans de l'eau peptonée stérile. Ces dilutions on ensuite été chauffées dans un bain-marie à 70°C durant 20 minutes afin de préserver seulement les spores de *Clostridium*. L'inoculation a été faite en triplicata sur milieu gélosé en utilisant la technique d'étalement en surface. Les clostridies ont été isolés sur le milieu RCA (Reinforced Clostridial Agar) (Oxoid, Ontario, Canada) additionné de Rouge neutre à 0,005% (p/v) (Sigma, Ontario, Canada) et de cyclosérine (Sigma, Ontario, Canada) à 200 mg L⁻¹ (Jonsson, 1990). L'incubation a été faite dans une jarre anaérobie contenant un catalyseur qui permet, par réaction chimique, d'éliminer l'oxygène présent. Les jarres ont été incubées à 28°C durant 7 jours. Le dénombrement a été fait à partir des plats de Pétri des dilutions qui comptaient entre 20 et 200 colonies. Pour être considéré officiellement comme une colonie de *Clostridium*, elle devait être négative au test du peroxyde d'hydrogène et fluorescente au rayon ultra-violet.

2.6 Analyses statistiques

2.6.1 Dispositif expérimental

Pour l'essai 1, le dispositif expérimental était un bloc complet aléatoire avec quatre traitements (témoin, 10^5 , 10^6 et 10^7 UFC g^{-1} de fourrage), dix ouvertures (0, 6, 12, 24, 48, 72 heures et 7, 14, 28 et 105 jours) et trois répétitions avec un total de 120 silos. Les blocs correspondaient aux trois répétitions et les silos étaient considérés indépendants à l'intérieur d'un même bloc. La fabrication des silos a été faite pour chacune des répétitions en suivant l'ordre des traitements à l'intérieur d'une répétition selon le dispositif.

Pour l'essai 2, le dispositif expérimental était aussi un bloc complet aléatoire avec cinq traitements. Les inoculants (Biomax et Powerstart) et leur mode d'application (réhydraté ou cultures viables) étaient en arrangement factoriel. Un total de 150 silos ont été fabriqués pour cet essai (5 traitements x 10 ouvertures x 3 répétitions). La fabrication des silos a été faite pour chacune des répétitions en suivant l'ordre des traitements à l'intérieur d'une répétition selon le dispositif.

2.6.2 Analyses des données

Pour les paramètres biochimiques de la plante ainsi que les paramètres de la conservation la normalité des données a été vérifiée avec la procédure Shapiro-Wilk de SAS 9.2 (2002-2008) et l'homogénéité de variance a été vérifiée à l'aide des graphiques des résidus. L'analyse de variance des données a été faite à l'aide de la procédure MIXED de SAS 9.2 (2002-2008) où les traitements et les ouvertures ont été considérés comme des facteurs fixes alors que les répétitions ont été considérés aléatoires. Lorsque l'analyse de variance a démontré des effets significatifs ($P \leq 0,05$)

entre les traitements, les moyennes ont été comparées en utilisant le test de Tukey ($\alpha=0,05$).

La cinétique de fermentation a été analysée avec les mesures de pH selon le modèle non linéaire développé par Jones *et al.* (1992) :

$$\text{pH} = \text{pH}_a \times \exp^{-k(\text{jour}-\text{lag})} + \text{pH}_z$$

où

$$\text{pH}_a = \text{pH initial} - \text{pH final}$$

k = taux de diminution du pH

pH_z = pH final déterminé dans notre cas à 15 semaines

T₀ = temps de latence avant la diminution rapide du pH

Les paramètres de la cinétique (k et lag) ont été déterminés pour chacune des 12 courbes (essai 1) et 15 courbes (essai 2) générées. L'analyse de variance a été faite selon le dispositif en bloc complet aléatoire pour les paramètres k et lag de la cinétique de fermentation. Pour l'essai 2, l'analyse du dispositif factoriel a été faite à partir d'une table d'ANOVA générale comportant l'effet traitement avec 4 degrés de liberté. Dans l'essai 2 l'utilisation de «contrast» dans SAS 9.2 (2002-2008) avec la procédure MIXED a été utilisée afin de déterminer l'effet du type d'inoculant, du mode d'application et de l'interaction de ces deux facteurs.

Une analyse de variance dans SAS 9.2 (2002-2008) avec la procédure MIXED a été faite sur les variables glucose, fructose, xylose, acide lactique, acide acétique, pH et bactéries lactiques afin de vérifier l'effet du temps. Les graphiques exploratoires ont indiqué qu'une modélisation avec variance hétérogène selon le temps de mesure était appropriée. L'analyse a permis d'évaluer chaque ouverture de façon individuelle ainsi qu'une comparaison multiple entre les temps d'ouvertures afin de vérifier s'il y avait augmentation ou diminution ou aucune variation.

CHAPITRE 3

RÉSULTATS ET DISCUSSION

3.1 Résultats

3.1.1 Caractéristiques biochimiques des fourrages de fléole des prés

La matière sèche visée était de $350,0 \text{ g} \cdot \text{kg FF}^{-1}$ pour les deux essais. La teneur moyenne obtenue pour l'essai 1 a été de $366,0 \text{ g} \cdot \text{kg FF}^{-1}$ tandis que celle obtenue pour l'essai 2 a été de $303,0 \text{ g} \cdot \text{kg FF}^{-1}$ (tableaux 3 et 4). Les contenus moyens en sucres solubles (par colorimétrie) ont été de $100,7 \text{ g} \cdot \text{kg MS}^{-1}$ et de $110,7 \text{ g} \cdot \text{kg MS}^{-1}$ pour l'essai 1 et 2 respectivement (tableaux 3 et 4). Selon Demarquilly (1986), une teneur en sucre de $100,0 \text{ g} \cdot \text{kg MS}^{-1}$ est suffisante pour assurer une bonne fermentation des graminées ensilées avec une teneur en matière sèche de $200,0 \text{ g} \cdot \text{kg FF}^{-1}$ ce qui devrait être plus que suffisant pour les teneurs en matière sèche de la présente étude. Quant au pouvoir tampon, des différences entre les traitements ont été observés pour les deux essais (tableaux 3 et 4) ce qui est souvent le cas puisque les peuplements sont rarement purs à 100% (93% dans cette étude) et que le pouvoir tampon varie selon les espèces végétales (McDonald *et al.*, 1991).

L'ensilabilité, c'est-à-dire l'aptitude des plantes à la fermentation était bonne puisque le coefficient de fermentation (Weissbach, 1996) a été supérieur à 45 que ce soit pour l'essai 1 ou l'essai 2. Les valeurs obtenues dans cette étude sont comparables aux observations faites dans des conditions similaires de croissance et de régie

d'exploitation d'un peuplement de graminées avec en prédominance du dactyle (*Dactylis glomerata* L.) au stade épiaison (Lafrenière, 2002).

3.1.2 Dénombrement microbiens : bactéries lactiques et spores de *Clostridium*

Les populations de bactéries lactiques épiphytes (BLE) lors de l'ensilement ont été de 3,0 log UFC · g FF⁻¹ pour le 1^{er} essai et de 3,6 log UFC · g FF⁻¹ pour l'essai 2 (figures 1 et 2). Ces dénombrements sont faibles en comparaison d'études similaires (tableau 1) mais ils sont comparables à ceux rapportés par Lafrenière (2002) pour une récolte hâtive au premier cycle de végétation. Le nombre de BLE est généralement plus élevé lors d'une deuxième coupe que lors de la première coupe (Roos, 1990). C'est principalement la température qui explique ces variations ; le nombre de BLE augmente avec des températures plus chaudes (Buxton et O'Kiely, 2003). Dans la présente étude, les températures moyennes au site de Kapuskasing lors des 3 jours précédents la mise en silo ont été comparables (tableau 7) pour chacun des essais, ce qui pourrait expliquer les résultats observés.

De façon générale, les bactéries lactiques lors de l'ensilement augmentent en nombre pour atteindre un plateau. Il y a ensuite une diminution de la population en raison de la mortalité. Il s'agit d'une courbe naturelle de croissance des microorganismes. C'est ce qui a été observé que ce soit pour l'essai 1 ou l'essai 2 avec l'analyse statistique des ouvertures en mesures répétées (figures 1 et 2). Toutefois, la réponse n'a pas été la même pour tous les traitements à chacune des ouvertures tel que démontré par des interactions significatives autant pour l'essai 1 (tableau 5) que l'essai 2 (tableau 6).

Pour l'essai 1, lors de la mise en silo au Jour 0, les dénombrements des bactéries lactiques ont été différents pour chaque traitement (figure 1). Ces observations sont logiques puisque pour cet essai, il y avait un ajout de bactéries lactiques variant de 5,0

à $7,0 \log \text{UFC} \cdot \text{g FF}^{-1}$. D'ailleurs, les doses de l'inoculant lactique réellement appliquées ont été inférieures aux doses calculées pour atteindre la quantité désirée. La majorité des additifs à ensilage vendus sur le marché sont des bactéries lactiques lyophilisées. Afin de connaître le nombre réel de bactéries lactiques par gramme d'inoculant et ainsi permettre d'ajuster la dose à appliquer, un dénombrement a été fait quelques jours avant la mise en silo des plantes. À ce moment, le temps d'incubation a dû être allongé à cinq jours au lieu de trois jours tel que préconisé habituellement au laboratoire parce que la croissance était trop faible. Cette période d'incubation plus longue n'a pas été faite lors de la réalisation des silos. Il est donc possible que les bactéries lactiques provenant de l'inoculant n'aient pas eu le temps nécessaire à la formation de colonies visibles sur un milieu gélosé. De plus, il faut mentionner, que le même sachet a été utilisé pour le dénombrement préliminaire au laboratoire et lors de la réalisation de l'essai 1. Il est possible qu'il y ait eu une certaine mortalité même si cet intervalle a été de moins de sept jours et que les inoculants lactiques ont été conservés au réfrigérateur durant cette période.

Dès la première ouverture au Jour 1, les populations de bactéries lactiques avaient augmenté et les écarts s'étaient atténués entre les traitements inoculés ($7,9$ à $8,9 \log \text{UFC} \cdot \text{g FF}^{-1}$ de la plus faible à la plus forte dose). Le traitement témoin était encore inférieur aux traitements inoculés ; il n'avait atteint que $7,0 \log \text{UFC} \cdot \text{g FF}^{-1}$. Cet effet était encore visible et significatif ($P = 0,06$) lors de l'ouverture au Jour 3. Lors de cette ouverture, tous les traitements inoculés dépassaient $9,3 \log \text{UFC} \cdot \text{g FF}^{-1}$ mais le traitement témoin était à $8,9 \log \text{UFC} \cdot \text{g FF}^{-1}$. Lors de l'ouverture du Jour 7, les quantités de bactéries lactiques ont été similaires ($P > 0,05$) pour tous les traitements jusqu'au Jour 14. À partir de cette ouverture, les populations ont commencé à diminuer pour atteindre un dénombrement moyen de $7,49 \log \text{UFC} \cdot \text{g FF}^{-1}$ au Jour 105 (figure 1).

Pour l'essai 2, au Jour 0, pour les traitements réhydratés, la dose appliquée a été exactement celle calculée soit de $5,0 \log \text{ UFC } \cdot \text{g FF}^{-1}$. Pour ces mêmes inoculants mais cultivés pendant 18 heures avant leur application sur les fourrages, les doses appliquées ont été supérieures aux doses des traitements réhydratés soit $5,8 \log \text{ UFC } \cdot \text{g FF}^{-1}$ pour l'inoculant Biomax et $5,6 \log \text{ UFC } \cdot \text{g FF}^{-1}$ pour le traitement Power Start (figure 2). Les bactéries lactiques en culture viable sont métaboliquement actives et le délai entre leur préparation et leur application a possiblement permis une croissance supplémentaire des bactéries lactiques, ce qui pourrait expliquer les différences observées au Jour 0 entre les modes de préparation. Quant au témoin, les BLE ont été inférieurs aux traitements inoculés lors de la mise en silo avec $3,6 \log \text{ UFC } \cdot \text{g FF}^{-1}$. Au Jour 1, la différence entre les deux méthodes de préparation de l'inoculum était encore observable et de plus, une interaction significative ($P = 0,04$) a été observée entre les modes de préparation de l'inoculum et les inoculants. Pour l'inoculant Biomax, le nombre de bactéries lactiques du traitement hydraté a été de $8,6 \log \text{ UFC } \cdot \text{g FF}^{-1}$ vs de $8,8 \log \text{ UFC } \cdot \text{g FF}^{-1}$ lorsque cultivé alors que pour l'inoculant Power Start, les bactéries lactiques réhydratées ont été de $8,0 \log \text{ UFC } \cdot \text{g FF}^{-1}$ et de $9,1 \log \text{ UFC } \cdot \text{g FF}^{-1}$ pour les bactéries lactiques cultivées. Le nombre de bactéries lactiques du traitement témoin est demeuré inférieur aux traitements inoculés jusqu'au Jour 3 (figure 2).

Les dénombrements des spores de *Clostridium* ont été sous le seuil de détection de $2,0 \log \text{ UFC } \cdot \text{g d'ensilage}^{-1}$ pour tous les traitements jusqu'à Jour 14. Aux ouvertures des Jour 28 et Jour 105, des dénombrements supérieurs à $2,0 \log \text{ UFC } \cdot \text{g d'ensilage}^{-1}$ ont été observés pour les deux essais. Ces observations ont été trop erratiques et variables, et ce pour les deux essais pour qu'il soit possible d'analyser ces résultats sur une base statistique.

3.1.3 Cinétique de fermentation

3.1.3.1 pH

L'utilisation des mesures du pH et l'analyse selon le modèle non linéaire développé par Jones *et al.* (1992) permet de déterminer l'effet des traitements sur le temps de latence, c'est-à-dire le délai entre l'application de l'inoculant et le début de la diminution du pH. Cette analyse permet aussi de déterminer la vitesse de diminution du pH de chacun des traitements et ainsi analyser statistiquement l'effet des traitements sur la vitesse de fermentation.

Dans l'essai 1, des différences ont été observées entre les traitements pour le temps de latence (T_0) pour les doses de bactéries lactiques ajoutées. La dose de 4,5 log UFC · g FF⁻¹ (la plus faible) a eu un temps de latence supérieure à la dose de 6,5 log UFC · g FF⁻¹ (la plus élevée) alors que pour la dose de 5,4 log UFC · g FF⁻¹ (la dose intermédiaire), le temps de latence a été intermédiaire (tableau 8). Il n'y a pas eu de différence significative entre le témoin et les traitements ayant reçu une dose d'inoculant (tableau 8). Pour l'essai 2, le temps de latence a probablement été très court puisqu'il n'a pas été possible de l'évaluer même avec des mesures prises à partir de six heures après le début de la fermentation et ce même pour les traitements témoins (tableau 9). Ces résultats sont contraires à ceux observés par Jones *et al.* (1992) où l'ajout d'un inoculant à un fourrage de luzerne avec une matière sèche de 33% a permis de diminuer le temps de latence. Il faut mentionner que la luzerne a un pouvoir tampon plus élevé que celui des graminées (McDonald *et al.*, 1991) et que cette caractéristique a nécessairement un effet sur le délai où l'on peut observer une diminution du pH puisqu'il faut plus d'acide lactique avant que le pH commence à descendre. La présente étude a été réalisée avec la fléole des prés et le pouvoir tampon n'était pas très élevé (tableaux 3 et 4).

Dans l'essai 1, la vitesse de diminution du pH (k) du traitement témoin a été inférieure à ceux des traitements inoculés (tableau 8). Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par (Jones *et al.*, 1992) qui démontraient que l'ajout d'un inoculant ($3,0 \times 10^5 \text{ UFC} \cdot \text{g FF}^{-1}$) augmentait de façon significative la vitesse de diminution du pH. Par ailleurs, la diminution du pH a été similaire peu importe la dose de bactéries lactiques ajoutée puisqu'aucune différence n'a été observée pour ces traitements (tableau 8). Pour l'essai 2, l'analyse de variance pour la vitesse de diminution du pH (k) a démontré que les traitements avaient tendance à être différents ($P=0,06$). Les deux inoculants ont eu le même effet sur la vitesse de diminution du pH mais la réponse aux méthodes de préparation de l'inoculant avant leur application sur les fourrages a eu tendance ($P = 0,1$) à être différente selon l'inoculant (tableau 9). Pour le Power Start, la culture avant son ajout aux fourrages tend à vouloir démontrer une diminution plus rapide du pH que l'inoculant Biomax dans les mêmes conditions. Le contraire est aussi vrai pour les inoculants seulement réhydratés avant leur application (tableau 9). Pour le traitement témoin, n'ayant pas été inoculés, une diminution moins rapide du pH a été observée (tableau 9).

L'analyse des ouvertures dans le temps de l'essai 1 pour la variable du pH a permis d'observer des différences significatives ($P \leq 0,0001$) entre les traitements et aussi entre les ouvertures mais l'interaction significative entre ces deux variables indiquent que les traitements n'ont pas toujours le même comportement à chacune des ouvertures (tableau 5). Dès les premières 24 heures après l'ensilement (Jour 1), la plus forte dose d'inoculation a permis d'abaisser le pH à un niveau plus bas ($P \leq 0,0001$) que celui des autres traitements (5,3 vs 5,9) (figure 3). Pour les ouvertures Jour 3, Jour 7, Jour 14 et Jour 28 le pH du traitement témoin a eu un pH supérieur à tous les autres traitements (figure 3). Au début et à la fin de la période d'ensilement, aucune différence ($P > 0,05$) n'a été observée entre les traitements (figure 3).

Des différences entre les traitements et aussi entre les ouvertures ont aussi été observées pour l'essai 2. Toutefois, les traitements ont eu tendance ($P = 0,08$) à donner des réponses différentes selon l'ouverture (tableau 6). Au Jour 1, le pH de l'inoculant Power Start a eu tendance ($P = 0,07$) à être plus élevé que celui de Biomax (4,9 vs 4,8) lorsque les inoculants ont été appliqués réhydratés alors que pour l'application en culture viable, le pH de Power Start a été plus faible que celui de Biomax (4,7 vs 4,8). Au Jour 3 et au Jour 7, le pH du témoin était plus élevé que le pH moyen des traitements inoculés (4,4 vs 4,1 au Jour 0 et 4,1 vs 4,0 au Jour 7). Au Jour 28, l'inoculant Biomax avait un pH plus bas ($P = 0,04$) que l'inoculant Power Start et cela a aussi eu tendance ($P = 0,07$) à être observé au Jour 105 bien qu'une remontée du pH ait été observé dans les deux cas (4,1 pour le Biomax vs 4,2 pour le Power Start) (figure 4).

3.1.3.2 Acide lactique et AGV

L'analyse dans le temps de la production d'acide lactique débute avec l'ouverture au Jour 1. Des différences ont été observées entre les traitements mais ceux-ci n'ont pas donné la même réponse selon les ouvertures tel que démontré par une interaction significative ($P \leq 0,0001$) entre ces deux facteurs (tableaux 5 et 6). Pour l'essai 1, au Jour 1, le traitement témoin et la plus faible dose d'inoculation ont produit des concentrations similaires d'acide lactique alors que les deux autres traitements inoculés ont produits des quantités supérieures (figure 5). À partir du Jour 3 les quantités d'acide lactique produites par les traitements inoculés ont été similaires alors que le traitement témoin produisait significativement moins que les traitements inoculés ($11,7 \text{ g} \cdot \text{kg MS}^{-1}$ vs $21,0 \text{ g} \cdot \text{kg MS}^{-1}$). C'est au Jour 7 que les concentrations maximales ont été atteintes et elles ont été les mêmes pour tous les traitements avec une teneur moyenne de $37,45 \text{ g} \cdot \text{kg MS}^{-1}$. Au Jour 14, il y a eu diminution ($P \leq 0,0001$) des quantités d'acide lactique et l'effet a été plus important pour le traitement témoin. Les concentrations en acide lactique ont continué à descendre pour les

traitements ayant reçu un dose d'inoculant jusqu'au Jour 28 mais se sont stabilisées pour le traitement témoin. Les quantités ont par la suite augmenté pour tous les traitements jusqu'au Jour 105 où une concentration moyenne de $33,2 \text{ g} \cdot \text{kg MS}^{-1}$ a été atteinte, soit une concentration similaire à ce qui avait été observé au Jour 7 (figure 5). Toujours pour l'essai 1, les concentrations en acide acétique ont augmenté progressivement jusqu'au Jour 14 mais n'ont jamais dépassé $10 \text{ g} \cdot \text{kg MS}^{-1}$ (figure 6).

Dans l'essai 2, la production d'acide lactique a été la même ($P > 0,05$) pour tous les traitements mais des différences ont été observées entre les ouvertures ($P \leq 0,0001$). Les mêmes observations ont été faites pour l'acide acétique (tableau 6). Il y a eu une augmentation des concentrations en acide lactique jusqu'au Jour 7 ($P \leq 0,0001$) où les concentrations maximales ont été observées avec $37,9 \text{ g} \cdot \text{kg MS}^{-1}$. Une diminution ($P \leq 0,0001$) des concentrations a été observée Jour 28 ($17,7 \text{ g} \cdot \text{kg MS}^{-1}$) suivi d'une remontée ($P \leq 0,0001$) au Jour 105 ($33,69 \text{ g} \cdot \text{kg MS}^{-1}$) (figure 7). Quant aux concentrations en acide acétique, il y a eu une augmentation jusqu'au Jour 3 pour atteindre des concentrations moyennes de $6,9 \text{ g} \cdot \text{kg MS}^{-1}$. Par la suite, les concentrations sont demeurées les mêmes variant entre $6,4$ et $9,2 \text{ g} \cdot \text{kg MS}^{-1}$ (figure 8). Dans les deux essais, les concentrations détectées après 28 jours d'ensilement ont été erratiques et variables.

3.1.3.3 Sucres solubles

La variation des sucres dans le temps a aussi été analysée mais les fructanes et le sucrose n'ont pu l'être parce que ces sucres ont rapidement été dégradés et/ou utilisés lors de l'ensilement. Dans les deux essais, dès l'ouverture des silos au Jour 1, les pertes de sucrose observées ont été de 93% pour l'essai 1 et de 99% pour l'essai 2 indiquant une utilisation importante du sucrose par les microorganismes et/ou l'action enzymatique de la plante. Quant aux fructanes, pour l'essai 1, les concentrations lors

de la mise en silo et lors de l'ouverture au Jour 1 indiquait qu'ils n'avaient pas encore été utilisés ou hydrolysés puisque les concentrations étaient de 10,7 et de 11,2 g · kg MS⁻¹ respectivement pour le Jour 0 et le Jour 1. Toutefois, lors de l'ouverture au Jour 3, aucun fructane n'a été détecté. Pour l'essai 2, bien que les concentrations en fructanes lors de la mise en silo étaient de 51,72 g · kg MS⁻¹, dès l'ouverture au Jour 1, il n'y en avait plus. Les teneurs en matière sèche pourraient expliquer les différences observées entre les deux essais puisqu'elles étaient respectivement de 366,0 g · kg MS⁻¹ et de g · kg MS⁻¹ pour l'essai 1 et l'essai 2 et que plus les fourrages sont humides, plus grande est l'activité enzymatique.

Le glucose et le fructose dans l'essai 1 ont donné des réponses similaires. Pour ces deux sucres, il y a eu des différences entre les traitements et ouvertures. Toutefois, les traitements ont donné des réponses différentes selon les ouvertures tel que démontré par une interaction significative ($P \leq 0,0001$) (tableaux 6 et 7). De façon générale, les teneurs en glucose et en fructose ont augmenté du Jour 0 au Jour 1 possiblement en réponse à l'hydrolyse du sucrose et des fructanes. Il y a eu par la suite une diminution de ces sucres jusqu'au Jour 14 avec une remontée du Jour 14 au Jour 28 mais elle a été toutefois moins importante qu'en début de fermentation. Du Jour 28 au Jour 105, il y a eu diminution du glucose mais non pas du fructose (figures 9 et 10). Toutefois, du Jour 3 jusqu'au Jour 14, les teneurs en glucose et en fructose du traitement témoin ont été supérieures ($P \leq 0,0001$) aux traitements inoculés (figures 9 et 10). La concentration en xylose serait un indice de la dégradation de la fibre durant le processus d'ensilage (McDonald *et al.*, 1991). Bien que les teneurs aient été faibles, il y a une augmentation des concentrations en xylose au cours de l'ensilage jusqu'au Jour 28 avec une diminution par la suite indiquant une utilisation de ce sucre par les microorganismes (figure 11).

Pour l'essai 2, il n'y a pas eu de différence ($P = 0,91$) entre les traitements pour le glucose mais les concentrations ont été variable d'une ouverture à l'autre

($P \leq 0,0001$) (tableau 6). Les teneurs en glucose ont été les mêmes ($P \leq 0,0001$) au Jour 0 et au Jour 1. Par la suite, il y a eu une diminution ($P \leq 0,0001$) jusqu'au Jour 7 pour demeurer stable ($P = 1,00$) jusqu'au Jour 28 et ré-augmenter ($P \leq 0,0001$) par la suite au Jour 105 (figure 12). Pour le fructose les quantités ont augmenté ($P \leq 0,0001$) au Jour 1 pour diminuer ($P \leq 0,0001$) par la suite à l'exception du témoin où les teneurs en fructose sont demeurées supérieures ($P \leq 0,0001$) aux traitements inoculés. Au Jour 28, les teneurs en fructose des traitements inoculés ont augmenté et les concentrations mesurées ont été similaires à celle du témoin ($P = 0,2$). Par la suite, les concentrations ont été les mêmes pour tous les traitements (figure 13). Comme observée lors de l'essai 1, la concentration en xylose augmente durant le processus d'ensilage mais cette augmentation survient qu'à partir du Jour 28 pour les traitements inoculés. Pour le traitement témoin, l'augmentation se fait graduellement jusqu'au Jour 7. Au Jour 7, les concentrations en xylose du traitement témoin ont été supérieures ($P = 0,008$). Par ailleurs, au Jour 28 ($P = 0,0002$) et au Jour 105 ($P = 0,007$), les deux inoculants ont eu des réponses différentes. Pour ces ouvertures, l'inoculant Biomax avaient des concentrations de xylose inférieures ($2,3 \text{ g} \cdot \text{kg MS}^{-1}$) à celle de l'inoculant Power Start ($3,3 \text{ g} \cdot \text{kg MS}^{-1}$) (figure 14).

3.1.4 Évaluation de la conservation

Pour les deux essais, la présence d'acide n-butyrique n'a été détecté à partir de l'ouverture Jour 28. Avant cette ouverture, aucune quantité d'acide butyrique n'a été détectée. Les concentrations ont été de $10,4 \text{ kg} \cdot \text{MS}^{-1}$ pour l'essai 1 et $10,3 \text{ g} \cdot \text{kg MS}^{-1}$ pour l'essai 2. Au Jour 105, les teneurs en acide butyrique ont été erratiques et très variables d'une répétition à l'autre ainsi que d'un traitement à l'autre ($0,0$ à $1,5 \text{ log UFC} \cdot \text{g d'ensilage}^{-1}$). C'est pourquoi aucune analyse statistique n'a été possible.

Que ce soit pour l'essai 1 ou l'essai 2, le pH de stabilité anaérobie (pH_w) a été atteint et dépassé et ce pour tous les traitements inoculés ou encore les traitements témoin (tableau 10 et 11). Toutefois, pour l'essai 1, l'azote ammoniacal a été supérieur aux traitements inoculés avec 9,25% de l'azote total (tableau 10). Cette différence peut s'expliquer par la vitesse de diminution du pH plus lente pour le témoin ce qui a possiblement permis aux entérobactéries un intervalle plus long pour dégrader la protéine (McDonald *et al.*, 1991). Pour l'essai 2, aucune différence ($P < 0,05$) n'a été observée et la teneur moyenne des traitements a été de 4,6% de l'azote total (tableau 11).

3.2 Discussion

Des différences ont été observées pour le temps de latence de l'essai 1 (tableau 8) mais ces différences ne semblent pas importantes d'un point de vue biologique. Le délai entre la mise en silo et le début de la diminution du pH, a varié de 18,2 à 28 heures pour l'essai 1 et a été de moins de 24 heures pour l'essai 2 (tableaux 8 et 9). Pourtant, lors de l'ouverture des silos au Jour 1 de l'essai 1, le nombre de bactéries lactiques variait de 7,0 \log_{10} UFC \cdot g FF⁻¹ pour le traitement témoin à 8,9 pour le traitement avec la plus haute dose de bactéries lactiques ajoutée. Seul le pH du traitement avec la plus haute dose de bactéries lactiques de l'essai 1 avait commencé à diminuer. Par contre, pour l'essai 2, le pH pour tous les traitements avaient commencé à diminuer même le traitement témoin. Pour cet essai, lors de l'ouverture au Jour 1, les dénombrements des bactéries lactiques étaient supérieures à 8,0 \log_{10} UFC \cdot g FF⁻¹ (figure 2). Ces résultats confirment ceux de Jaster (1995) mentionnant qu'il faut une population de bactéries lactiques de 8,0 \log_{10} UFC \cdot g FF⁻¹ pour que le pH commence à descendre. Cette quantité a été atteinte en moins de 24 heures pour la majorité des silos.

Par ailleurs, la vitesse de diminution du pH a toujours été plus rapide pour les traitements inoculés comparativement au traitement témoin pour l'essai 1 (tableau 8 et figure 3) alors que pour l'essai 2, cela a été moins évident (tableau 9 et figure 4) possiblement en raison de la teneur en matière sèche plus faible. Toutefois, cet avantage des ensilages inoculés, n'a pas eu d'effet sur le pH final puisqu'à l'ouverture des silos au Jour 105, le pH était le même pour tous les traitements inoculés et le témoin (figures 3 et 4). Cependant, pour l'essai 1, l'inoculation des fourrages lors de la mise en silo a contribué à diminuer les teneurs en azote ammoniacal tel qu'observé lors de l'ouverture des silos au Jour 105 (tableau 10). C'est probablement la vitesse de diminution plus lente du pH pour le témoin qui peut expliquer ces résultats en permettant aux entérobactéries de se développer pendant une plus longue période. Pour inhiber les entérobactéries, il faut atteindre un pH de 4,5 (McDonald *et al.*, 1991) et ce pH a été atteint entre le Jour 1 et le Jour 3 pour les traitements inoculés alors que pour les ensilages non inoculés, il a été atteint entre le Jour 3 et le Jour 7 (figure 3). Bien que la diminution du pH du traitement témoin de l'essai 2 ait aussi été plus lente, les teneurs en azote ammoniacal ont été les mêmes pour tous les traitements de cet essai, de même que le pH au Jour 105 (tableau 11). La teneur en matière sèche de l'essai 2 était de $303,0 \text{ g} \cdot \text{kg FF}^{-1}$ (tableaux 3 et 4) et le pH de 4,5 a été atteint pour tous les traitements incluant les fourrages inoculés entre le Jour 1 et le Jour 3 (figure 4). Il faut aussi mentionner que l'essai 2 a été réalisé au deuxième cycle de végétation et que les populations microbiennes peuvent avoir été différentes de celle de l'essai 1 réalisé au premier cycle de végétation. Ces résultats semblent indiquer que c'est la vitesse de diminution du pH qui est importante et non le nombre de bactéries lactiques lors de la mise en silo. En ce sens, les inoculants lactiques ont démontré leur efficacité.

Les sucres solubles ont été quantifiés par colorimétrie et par chromatographie. Dans les deux essais, une quantité supérieure de près de $30,0 \text{ g} \cdot \text{kg MS}^{-1}$ a été observée avec le dosage par colorimétrie (tableaux 3 et 4). Par colorimétrie, l'extrait est

acidifié pour hydrolyser les fructanes (polymères de fructose). Cela permet ainsi de doser tous les sucres potentiellement utilisables lors de la fermentation contrairement à la méthode par HPLC où les principaux sucres sont identifiés, quantifiés puis additionnés pour avoir la quantité totale. Cela pourrait expliquer les différences observées entre les deux méthodes de dosage des sucres.

Chez les graminées, une proportion plus ou importante des sucres sont des fructanes ou encore des polymères de fructose (Smith, 1973). Parmi des populations épiphytes de bactéries lactiques, seulement 3% des populations peuvent utiliser ce polymère de fructose (Müller et Lier, 1994). Les graminées possèdent différentes enzymes permettant de dégrader ces fructanes et il a été démontré que durant le processus d'ensilage, ces enzymes participent à leur dégradation (Merry *et al.*, 1995). Toutefois, en plus du processus de dégradation par les plantes, si les bactéries lactiques peuvent métaboliser ces fructanes, il en résulte une amélioration de la conservation (Winters *et al.*, 1998). L'inoculant Power Start de l'essai 2 est un inoculant capable de métaboliser les fructanes (Davies *et al.*, 2002) et cela devrait lui conférer un avantage compétitif sur l'inoculant Biomax. À l'ouverture des silos au Jour 1, l'inoculant Power Start appliqué en culture métaboliquement active avait un pH inférieur à Biomax lui aussi inoculé en culture viable (4,7 vs 4,8) alors que le contraire était observé pour les mêmes inoculants mais traité par réhydratation avant leur applications sur les fourrages (4,9 vs 4,8). Bien qu'il n'y ait pas eu de différence de production en acide lactique, la population de bactéries lactiques du traitement Power Start cultivé était supérieure à la population Biomax pour le traitement cultivé (9,1 vs 8,7 \log_{10} UFC \cdot g FF⁻¹). Des résultats similaires ont été obtenus avec la luzerne (*Medicago sativa*) pour l'inoculant Power Start. Mais avec la luzerne, l'effet a persisté dans le temps (Kizilsimsek *et al.*, 2007) tandis que cet avantage pour l'inoculant Power Start n'a pas été observé aux autres ouvertures dans la présente étude. Dans l'essai 2, une production plus faible d'acide acétique lors de l'ouverture des silos au Jour 7 pour l'inoculant Power Start (6,7 vs 7,8 g \cdot kg MS⁻¹) a été observé

mais aucun effet sur le pH ou la production d'acide lactique. Une meilleure fermentation, une diminution des quantités d'acide acétique ont été rapporté pour des souches de bactéries lactiques capables de métaboliser des fructanes (Winters *et al.*, 1998).

À notre connaissance, la souche de l'inoculant Biomax ne peut métaboliser les fructanes. Ces résultats indiquent donc que les fructanes ont été rapidement hydrolysés par les enzymes de la fléole des prés. Dès l'ouverture des silos au Jour 1, aucun fructane n'a été détecté indiquant qu'ils étaient déjà hydrolysés. L'augmentation des concentrations en fructose observée lors de cette même ouverture des silos semble confirmer ces observations (figure 13). Des résultats similaires ont été observés pour le témoin de l'essai 2 et aussi pour l'essai 1 (figure 10) indiquant l'importance des enzymes de la plante pour l'hydrolyse des fructanes. Toutefois, pour le traitement témoin de l'essai 2, il semble que les produits de l'hydrolyse soient plus difficiles à métaboliser pour les bactéries épiphytes que pour les bactéries lactiques des inoculants puisque les concentrations en fructose sont demeurées élevées jusqu'au Jour 105 (figure 13). Des observations similaires ont été faites par Winters *et al.* (1998) d'où l'importance pour un inoculant d'être en mesure d'utiliser plusieurs substrats. L'augmentation des teneurs en fructose au Jour 28 est difficile à expliquer puisqu'aucun fructane n'a été détecté après 24 heures d'ensilage.

C'est aussi au Jour 28 que les pics d'acide butyrique et les diminutions des concentrations en acide lactique ont été observés. Ces résultats indiquent une fermentation butyrique (figures 5 et 7). Des dénombrements positifs de spores de *Clostridium* confirment ces observations. Ces profils de fermentation ont été observés pour chacun des essais et ce, autant pour les traitements inoculés que les traitements témoins. Pourtant, au Jour 7, le pH de stabilité anaérobie a été atteint dans tous les cas. Les pH des ensilages sont même nettement inférieurs au pH de stabilité anaérobie. Les profils de fermentation après l'ouverture du Jour 28, soit au Jour 105,

n'indiquent pas ceux d'une fermentation butyrique. Le pH augmente mais tout en étant inférieur au pH de stabilité anaérobie. Les concentrations en acide lactique augmentent de nouveau pour atteindre les mêmes concentrations qu'au Jour 7 et l'acide acétique et butyrique ont été détectés que de façon erratique et très variable. Ce fût la même chose de même pour les dénombrements de spores butyriques. Zhu et Yang (2004) ont démontré que le *Clostridium tyrobutyricum* a un métabolisme particulier lorsqu'il utilise le xylose. Avec un pH variant de 5,0 à 6,3, ces auteurs démontrent que plus le pH est bas plus le *Clostridium tyrobutyricum* produit de l'acide lactique et moins il produit de l'acide butyrique alors que la production d'acide acétique est intermédiaire. Dans les ensilages de graminées, ce *Clostridium* a souvent été identifié dans notre laboratoire par biologie moléculaire (résultats non publiés). De plus, le milieu utilisé dans la présente étude pour le dénombrement des spores butyriques a une certaine sélectivité pour ce *Clostridium tyrobutyricum* (Jonsson, 1990) et plusieurs dénombrements ont été supérieurs au seuil de détection ce qui indique la présence potentielle de cette espèce dans les ensilages. Du xylose a été détecté dans les ensilages bien que les concentration soient faibles. En fait, le xylose est un produit de dégradation de l'hémicellulose lorsque le milieu est acide (McDonald *et al.*, 1991). Dans l'essai 1, il y a eu une utilisation du xylose durant la période d'ensilage alors que dans l'essai 2, cela n'était pas visible (figures 11 et 14). Il faut toutefois mentionner que ce qui est mesuré ce sont les sucres résiduels; s'ils sont utilisés aussi rapidement qu'ils sont formés, il n'y aura pas d'accumulation ou de diminution des sucres conséquence de leur utilisation. Les profils des acides gras volatils au Jour 105 sont toutefois difficiles à expliquer parce que les concentrations en acide butyrique et en acide acétique sont erratiques et variables. Est-ce que la perméabilité des sacs pourrait être un facteur important ? Des sacs de 6 mils ont été utilisés puisque ces épaisseurs sont celles recommandées dans les entreprises agricoles. Des études de perméabilité devront être réalisées pour éliminer ce facteur potentiel de variation.

CONCLUSION

L'augmentation du nombre de bactéries lactiques par l'ajout d'un inoculant sur des fourrages de fléole des prés n'est pas importante pour assurer une bonne fermentation, du moins pour des matières sèches inférieures à $350,0 \text{ g} \cdot \text{kg FF}^{-1}$ puisque les populations augmentent rapidement dès le début du processus d'ensilage. Cela pourrait être différent en conditions commerciales parce que les silos sont fermés moins rapidement. Par contre, l'inoculation parce qu'elle diminue plus rapidement le pH, permet d'améliorer la conservation en diminuant les teneurs en azote ammoniacal. Un inoculant capable d'utiliser les fructanes n'a pas permis une meilleure fermentation comparativement à un autre inoculant. Dans les conditions de cette étude, les enzymes de la fléole des prés ont semblé être très efficaces pour hydrolyser les fructanes. L'utilisation de bactéries métaboliquement actives n'a pas non plus démontré un grand avantage comparativement à un inoculant réhydraté. Enfin, le type de fermentation butyrique rapporté ici mérite d'être étudié plus en profondeur car cela pourrait peut-être expliquer pourquoi les ensilages sont bien conservés et qu'il y a des spores butyriques produites en nombre élevé. Avec ces ensilages, les paramètres normalement utilisés pour évaluer la conservation (matière sèche, pH) sont inadéquats surtout pour la production laitière où le lait est utilisé pour la production fromagère. En production fromagère, les conditions sont favorables au développement des spores butyriques selon les types de fromages produits.

Tableau 3. Effet des doses de bactéries lactiques sur les caractéristiques biochimiques des fourrages de fléole des prés (*Phleum pratense* L.) lors de la mise en silos expérimentaux (essai I).

Nombre initial de BLA ^z log UFC · g FF ⁻¹ y	Paramètres biochimiques						
	Matière sèche g · kg FF ⁻¹ x	Sucres solubles g · kg MS ⁻¹ w (colorimétrie)	Sucres solubles g · kg MS ⁻¹ (CLHP) ^y	Pouvoir tampon g ac. Lac. · kg MS ⁻¹ u	Nitrates g · kg MS ⁻¹	Coefficient de fermentation	
3,0 (BLE) ^t	370,0	99,2	71,4	41,6 b ^q	0,1	56,1	
4,5	358,7	106,3	69,0	43,2 ab	0,1	55,5	
5,4	368,0	97,6	72,6	44,4 a	0,1	54,4	
6,5	368,3	99,6	70,8	43,0 ab	0,1	55,4	
ETM ^s	6,5	3,4	2,5	0,5	0,0	1,1	
Valeurs de F (Probabilité)							
d.l. ^f							
Répétitions	2	1,5 (0,31)	1,3 (0,36)	0,7 (0,52)	2,3 (0,18)	0,8 (0,51)	1,3 (0,35)
Traitements	3	0,6 (0,62)	2,3 (0,18)	0,4 (0,78)	6,1 (0,03)	4,4 (0,07)	0,4 (0,75)
Erreur	6						
Total	11						

^z bactéries lactiques

^y unités formatrices de colonies par gramme de fourrage frais

^x gramme par kilogramme de fourrage frais

^w gramme par kilogramme de matière sèche

^v chromatographie en phase liquide à haute pression (sucrose+glucose+fructose+fructanes)

^u gramme d'acide lactique par kilogramme de matière sèche

^t bactéries lactiques épiphytes

^s erreur type de la moyenne

^r degré de liberté

^q Dans une même colonne, les moyennes suivies d'une lettre différente indiquent qu'il y a une différence significative selon le test de Tukey (P ≤ 0,05)

Tableau 4. Effet de deux types d'inoculant et de leur mode de préparation sur les caractéristiques biochimiques des fourrages de fléole des prés (*Phleum pratense* L.) lors de leur mise en silos expérimentaux (essai 2).

Traitements	Paramètres biochimiques					
	Matière sèche g kg ⁻¹ FF ^{1,z}	Sucres solubles (colorimétrie) g · kg MS ^{-1,y}	Sucres solubles (CLHP) ^x g · kg MS ⁻¹	Nitrates g · kg MS ⁻¹	Pouvoir tampon g ac.Lac. · kg MS ^{-1,w}	Coefficient de fermentation
Témoin (BLE) ^y	321,6	114,4	80,4 ab	0,01	45,2 bc ^s	52,2
Biomax en culture viable	307,4	114,0	84,6 ab	0,01	49,6 ab	50,6
Biomax réhydraté	304,0	104,8	78,7 b	0,01	48,8 ab	48,8
Power Start en culture viable	281,3	112,9	92,7 a	0,01	43,3 c	52,2
Power Start réhydraté	300,9	107,6	77,9 b	0,01	52,5 a	47,9
ETM ^u	11,0	18,8	2,2	0,00	0,9	2,7
Valeurs de F (Probabilité)						
d.l. ^t						
Répétitions	2	0,6 (0,60)	0,0 (0,98)	0,6 (0,49)	2,3 (0,20)	0,3 (0,75)
Traitements	4	1,7 (0,24)	0,1 (0,99)	7,8 (0,04)	1,3 (0,42)	19,6 (0,02)
Erreur	8					0,7 (0,66)
Total	14					

^z gramme par kilogramme de fourrage frais

^y gramme par kilogramme de matière sèche

^x chromatographie en phase liquide à haute pression (sucrose+glucose+fructose+fructanes)

^w gramme d'acide lactique par kilogramme de matière sèche

^v bactéries lactiques épiphytes

^u erreur type de la moyenne

^t degré de liberté

^s Dans une même colonne, les moyennes suivies d'une lettre différente indiquent qu'il y a une différence significative selon le test de Tukey (P≤0,05)

Tableau 5. Analyse de la variance (valeur de F) de l'effet des doses de bactéries lactiques et des temps d'ouvertures des silos pour différentes variables reliées à la fermentation durant le processus d'ensilage (essai 1).

Effets	Variables						
	BLA ^z log UFC · g FF ⁻¹ y	pH	Glucose g · kg MS ⁻¹ x (CLHP) ^w	Fructose g · kg MS ⁻¹ (CLHP)	Xylose g · kg MS ⁻¹ (CLHP)	Acide lactique g · kg MS ⁻¹	Acide acétique g · kg MS ⁻¹
	Valeurs de F (Probabilité)						
d.l. ^y							d.l.
Traitements ^u	3	25,0 (0,0001)	37,7 (0,0001)	18,6 (0,0001)	10,7 (0,0001)	4,3 (0,0082)	3 3,7 (0,0186) 5,9 (0,0016)
Ouvertures ^t	6	637,2 (0,0001)	746,7 (0,0001)	186,9 (0,0001)	153,2 (0,0001)	230,3 (0,0001)	5 277,1 (0,0001) 600,0 (0,0001)
Traitements x Ouvertures	18	25,1 (0,0001)	6,5 (0,0001)	4,0 (0,0001)	6,3 (0,0001)	1,4 (0,1592)	15 2,2 (0,0241) 5,6 (0,0001)

^z bactéries lactiques

^y unité formatrice de colonies par gramme de fourrage frais

^x gramme par kilogramme de matière sèche

^w chromatographie en phase liquide à haute pression

^t degré de liberté. L'analyse de l'acide lactique n'inclut pas les valeurs du Jour 0 et l'analyse de l'acide acétique n'inclut pas celles du Jour 105

^u traitements: 3.0 (témoin); 4.5; 5.4 et 6.5 log UFC · g FF⁻¹

Tableau 6. Analyse de la variance (valeur de F) de l'effet de différents traitements d'inoculant et des temps d'ouvertures des silos pour différentes variables reliées à la fermentation durant le processus d'ensilage (essai 2).

Effets	Variables						
	BLA ^z log UFC · g FF ⁻¹ · y	pH	Glucose g · kg MS ⁻¹ · x (CLHP) ^w	Fructose g · kg MS ⁻¹ (CLHP)	Xylose g · kg MS ⁻¹ (CLHP)	Acide lactique g · kg MS ⁻¹	Acide acétique g · kg MS ⁻¹
	Valeurs de F (Probabilité)						
d.l. ^v							d.l.
Traitements ^u	4	8,1 (0,0001)	5,0 (0,0015)	0,2 (0,9137)	1,2 (0,3112)	15,4 (0,0001)	4 0,9 (0,4487) 0,6 (0,6949)
Ouvertures ^t	5	704,0 (0,0001)	746,7 (0,0001)	67,7 (0,0001)	48,4 (0,0001)	23,4 (0,0001)	4 346,1 (0,0001) 167,5 (0,0001)
Traitements x Ouvertures	20	6,2 (0,0001)	6,5 (0,0836)	0,5 (0,9448)	4,2 (0,0001)	4,6 (0,0001)	16 1,2 (0,3083) 0,8 (0,6589)

^z bactéries lactiques

^y unité formatrice de colonies par gramme de fourrage frais

^x gramme par kilogramme de matière sèche

^w chromatographie en phase liquide à haute pression

^t degré de liberté. l'analyse de l'acide lactique n'inclut pas les valeurs du Jour 0 et l'analyse de l'acide acétique n'inclut pas celles du Jour 105

^u Traitements: Témoïn. Biomax en culture viable, Biomax réhydraté. Power Start en culture viable et Power Start réhydraté

^v ouvertures: 0. 6. 12. 24. 48. 72 heures et 7. 14. 24 et 105 jours

Tableau 7. Données climatiques enregistrées au site de Kapuskasing durant la saison 2007

Saison 2007	T _{min} moy ^z		T _{min} moy		T _{max} moy ^y		T _{max} moy		T _{noy} ^x		Précipitations		Ensoleillement	
	(°C)	(°C)	Moy 90 ans	(°C)	Moy 90 ans	(°C)	(°C)	Moy 90 ans	(°C)	(°C)	(mm) ^w	Moy 90 ans	(mm)	heures
Avril	-6,2	-5,8	6,6	6,1	-0,2	-0,2	95,8	49,1	131,0					
Mai	2,0	1,7	17,5	14,8	9,7	8,3	147,8	65,7	204,0					
Juin	8,5	7,6	21,2	20,9	14,9	14,3	40,4	75,0	180,3					
Juillet	10,9	10,7	22,5	23,4	16,7	17,0	102,8	89,3	216,5					
Août	9,6	9,7	21,3	21,7	15,5	15,7	69,2	82,1	192,6					
Septembre	5,4	5,5	16,9	16,0	11,2	10,7	178,0	88,9	94,2					
Octobre	2,5	-0,2	9,8	8,6	6,1	4,4	76,7	72,4	48,9					
Essai 1 ^v	3,8		18,0		10,9		0,0		10,9					
1 jour avant la récolte	5,1		19,9		12,5		4,6		2,3					
2 jours avant la récolte	11,9		17,9		14,9		0,4		0,2					
3 jours avant la récolte	15,5		30,3		22,9		3,8		8,9					
Essai 2	13,0		26,4		19,7		0,0		5,8					
1 jour avant la récolte	6,8		22,4		14,6		0,0		10,3					
2 jours avant la récolte	69,0		18,3		12,6		0,0		2,6					
3 jours avant la récolte	14,6		23,7		19,2		2,2		6,3					

^z Température minimale moyenne^y Températures maximale moyenne^x Température moyenne^w millimètres^v Essai 1 récolté le 28 juin 2007 et essai 2 récolté le 27 août 2007

Tableau 8. Effet des doses de bactéries lactiques sur les paramètres de la cinétique de fermentation (essai 1).

Paramètres de la cinétique de fermentation	
Nombre initial de BLA ^z log UFC • g FF ⁻¹ y	T ₀ (temps de latence, jour)
k (vitesse de diminution du pH)	k (vitesse de diminution du pH)
3,0 (BLE) ^x	0,9 ab
4,5	1,2 a
5,4	1,0 ab
6,5	0,8 b
ETM ^w	0,1
Valeurs de F (probabilité)	
d.l. ^v	
Répétitions	0,1 (0,88)
Traitements	5,7 (0,03)
Erreur	
Total	

^z bactéries lactiques

^y unité formatrice de colonies par gramme de fourrage frais

^x bactéries lactiques épiphytes

^w erreur type sur la moyenne

^v degré de liberté

^u Dans une même colonne, les moyennes suivies d'une lettre différente indiquent qu'il y a une différence significative selon le test de Tukey (P ≤ 0,05)

Tableau 9. Effet de deux types d'inoculant lactique et de leur mode de préparation sur les paramètres de la cinétique de fermentation (essai 2).

Traitements	Paramètres de la cinétique de fermentation ^z
	k (vitesse de diminution du pH)
Témoin	0,7 a ^v
Biomax en culture viable	0,8 ab
Biomax réhydraté	0,8 b
Power Start en culture viable	0,9 b
Power Start réhydraté	0,8 ab
ETM ^y	0,0
	Valeurs de F (Probabilité)
	d.l. ^x
Répétition	2
Traitements	4
Type d'inoculant	1
Mode d'application	1
Interaction	1
Témoin vs Autres	1
Erreur	6
Total	12

^x Temps de latence (T₀) ne peut être calculé à partir des mesures enregistrées

^y Erreur type sur la moyenne

^z degré de liberté

^v Dans une même colonne, les moyennes suivies d'une lettre différente indiquent qu'il y a une différence significative selon le test de Tukey (P ≤ 0,05)

Tableau 10. Effet des doses de bactéries lactiques sur les paramètres de conservation après 105 jours de fermentation (essai 1).

Nombre initial de BLA ^z log UFC · g FF ⁻¹ y	Paramètres de conservation	
	N-NH ₃ (% de N-Total)	pH final
3,0 (BLE) ^x	9,3 a ^u	4,3
4,5	5,1 b	4,2
5,4	4,4 b	4,1
6,5	3,9 b	4,3
ETM ^w	0,4	0,1
Valeurs de F (probabilité)		
d.l. ^v		
Répétitions	1,0 (0,42)	0,9 (0,45)
Traitements	45,1 (0,0002)	0,9 (0,48)
Erreur		
Total		

^z bactéries lactiques

^y unité formatrice de colonies par gramme de fourrage frais

^x bactéries lactiques épiphytes

^w erreur type sur la moyenne

^v degré de liberté

^u Dans une même colonne, les moyennes suivies d'une lettre différente indiquent qu'il y a une différence significative selon le test de Tukey (P≤0,05)

Tableau 11. Effet de deux types d'inoculant et de leur mode de préparation sur les paramètres de conservation après 105 jours de fermentation (essai 2).

Traitements	Paramètres de conservation	
	N-NH ₃ (% de N-Total)	pH final
Témoin	4,5	4,2
Biomax en culture viable	4,9	4,0
Biomax réhydraté	5,1	4,1
Power Start en culture viable	4,2	4,2
Power Start réhydraté	4,5	4,2
ETM ^s	0,3	0,1
	Valeur de F (probabilité)	
	d.l. ^y	
Répétitions	2	4,8 (0,09)
Traitements	4	1,7 (0,32)
Type d'inoculant	1	5,3 (0,08)
Mode de préparation	1	1,0 (0,38)
Interaction	1	0,0 (0,91)
Témoin vs Autres	1	0,3 (0,61)
Erreur	6	
Total	12	
^x erreur type sur la moyenne		
^y degré de liberté		

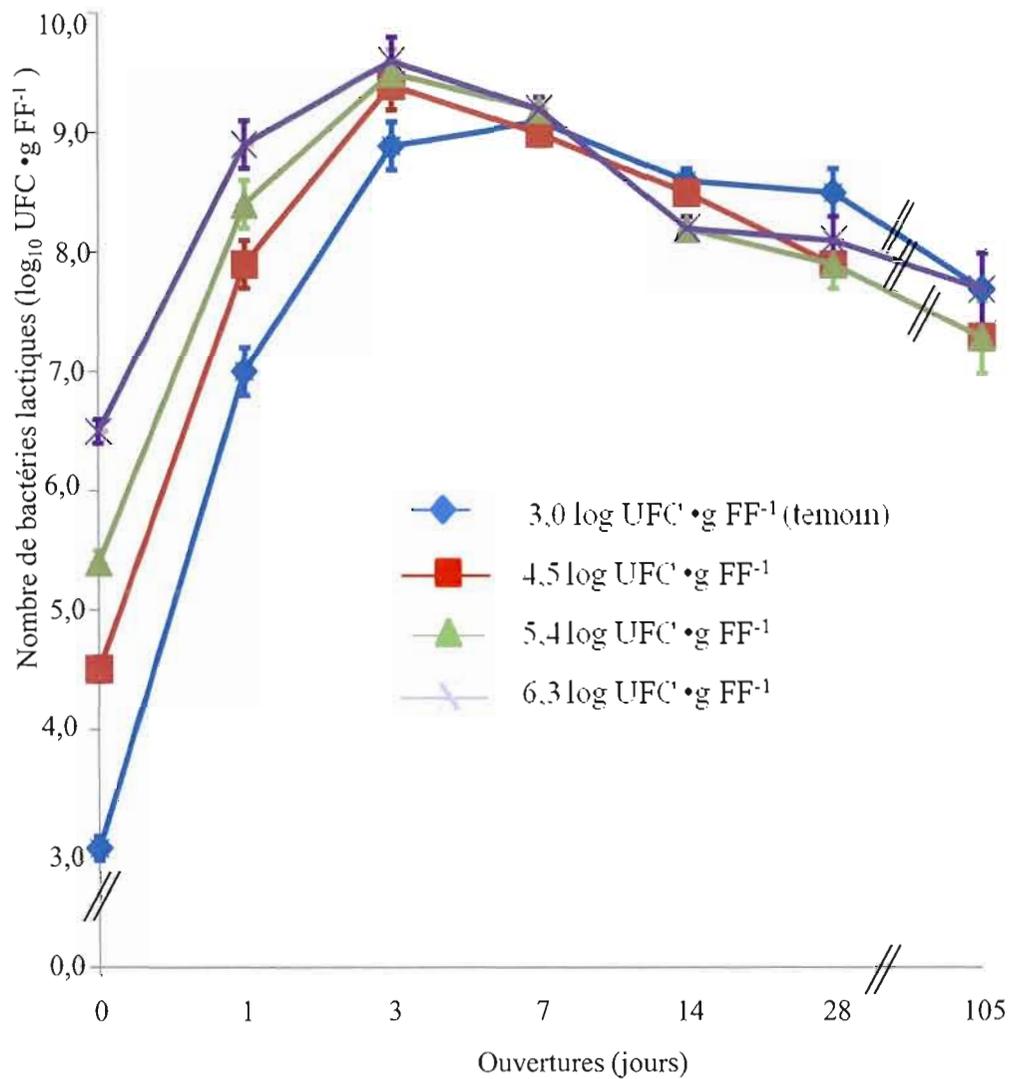


Figure 1. Effet des doses de bactéries lactiques ajoutées aux fourrages de fléole des prés (*Phleum pratense* L.) sur l'évolution dans le temps des dénombrements de bactéries lactiques (log UFC · g FF⁻¹) pour les 4 traitements durant le processus de fermentation (essai 1).

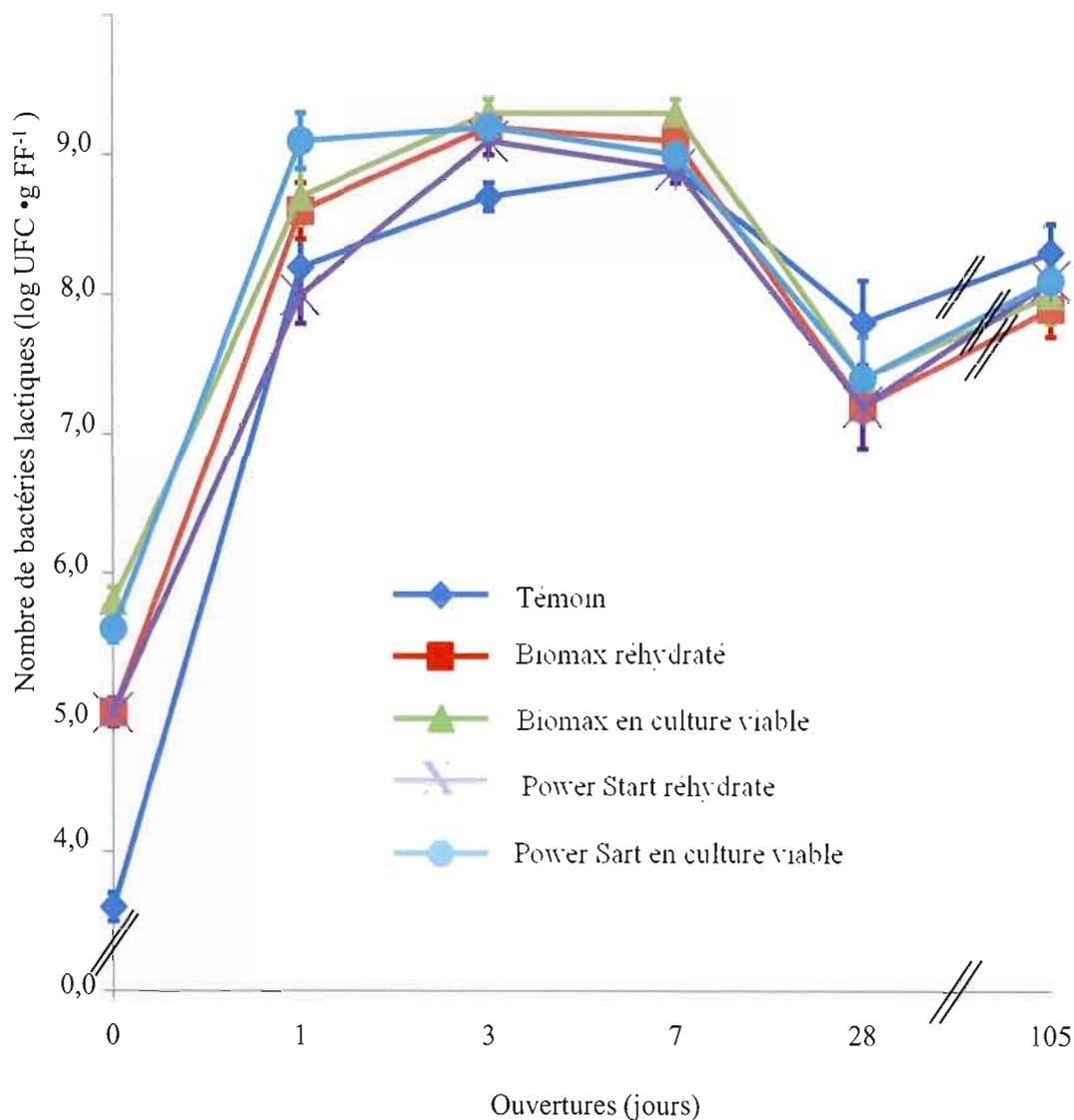


Figure 2. Effet des types d'inoculant et de leur mode de préparation ajoutés aux fourrages de fléole de prés (*Phleum pratense* L.) sur l'évolution dans le temps des dénombrements de bactéries lactiques (log UFC · g FF⁻¹) durant le processus de fermentation pour les 5 traitements (essai 2).

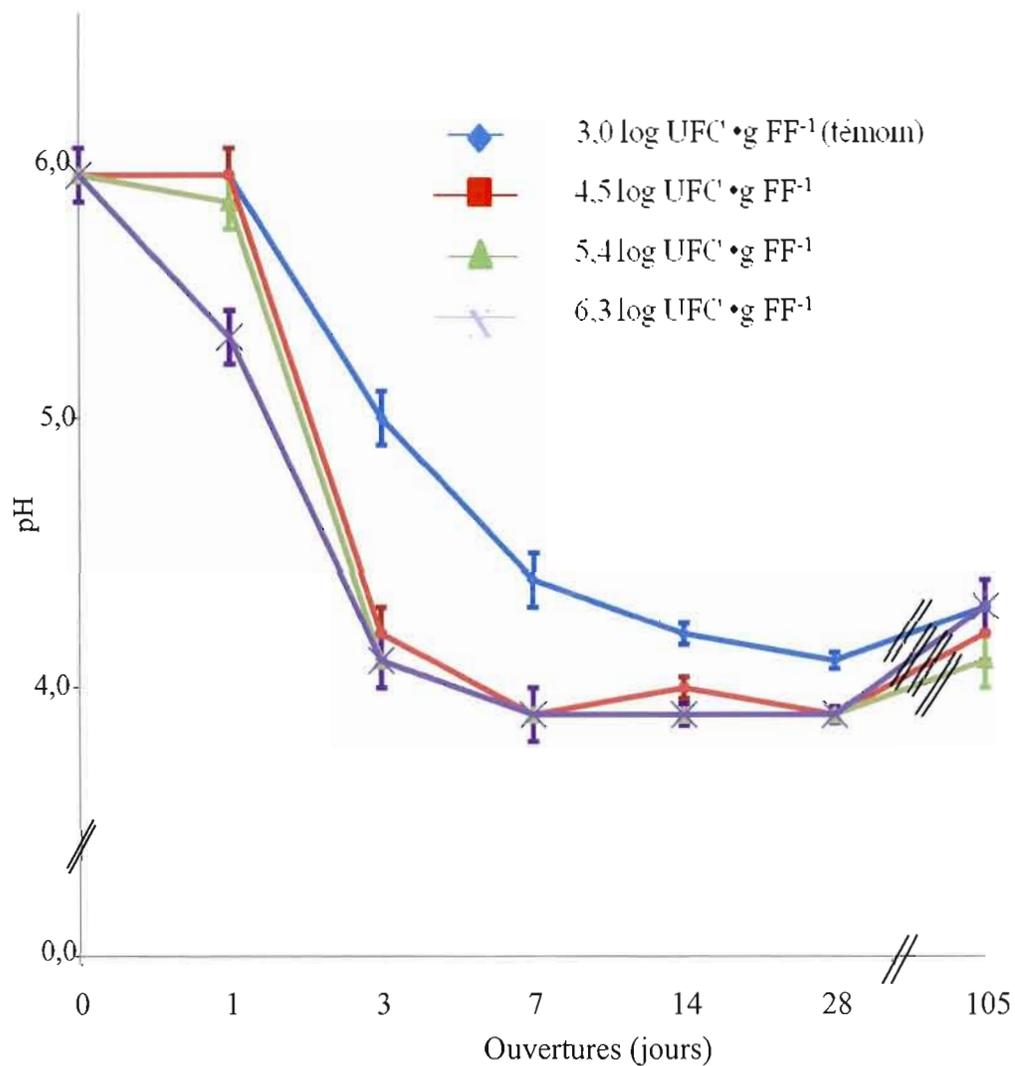


Figure 3. Effet des doses de bactéries lactiques ajoutées aux fourrages de fléole des prés (*Phleum pratense* L.) sur l'évolution dans le temps du pH durant le processus de fermentation pour les 4 traitements (essai 1).

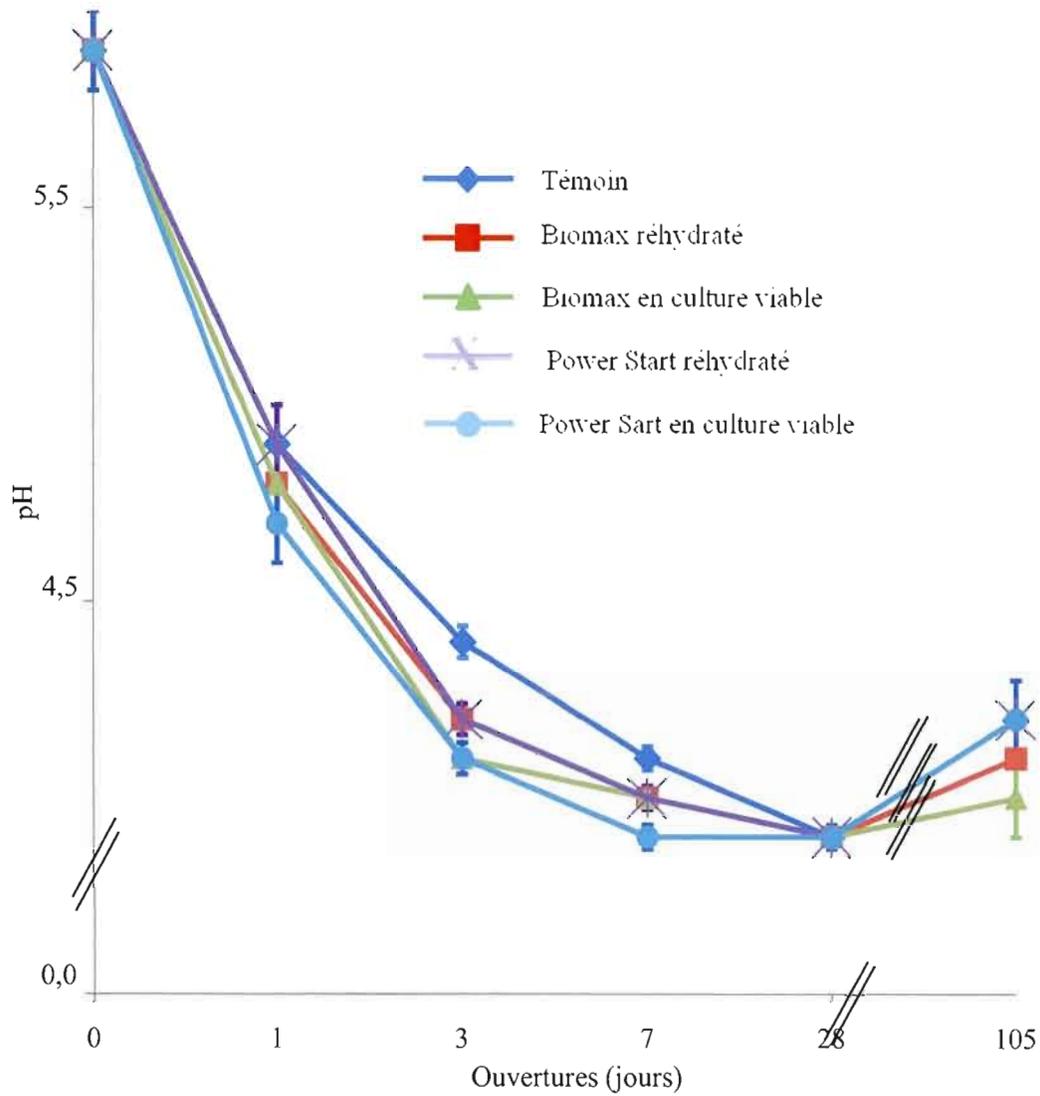


Figure 4. Effet des types d'inoculant et de leur mode de préparation ajoutés aux fourrages de fléole de prés (*Phleum pratense* L.) sur l'évolution dans le temps du pH durant le processus de fermentation pour les 5 traitements (essai 2).

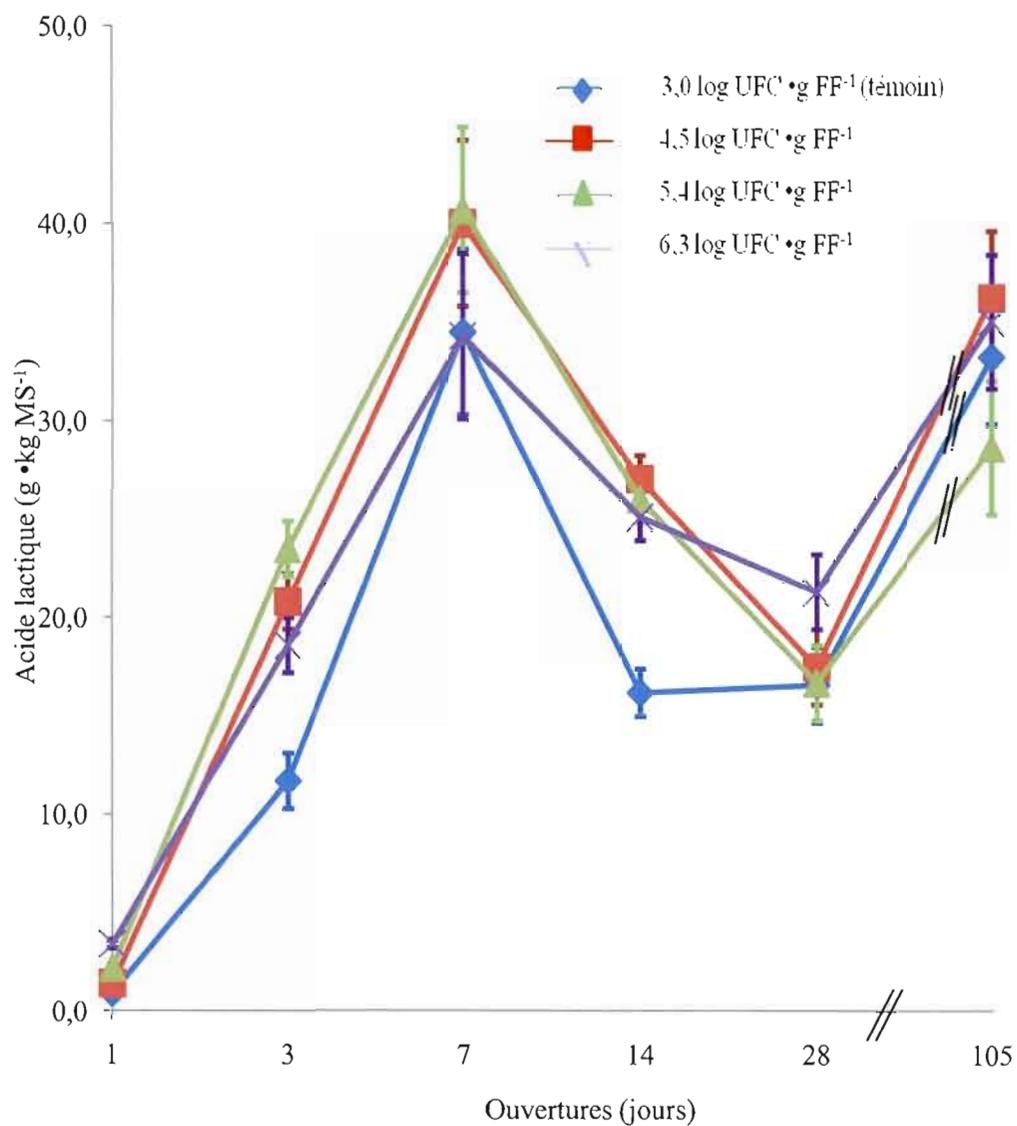


Figure 5. Effet des doses de bactéries lactiques ajoutées aux fourrages de fléole des prés (*Phleum pratense* L.) sur l'évolution dans le temps des concentrations en acide lactique ($\text{g} \cdot \text{kg MS}^{-1}$) durant le processus de fermentation pour les 4 traitements (essai 1).

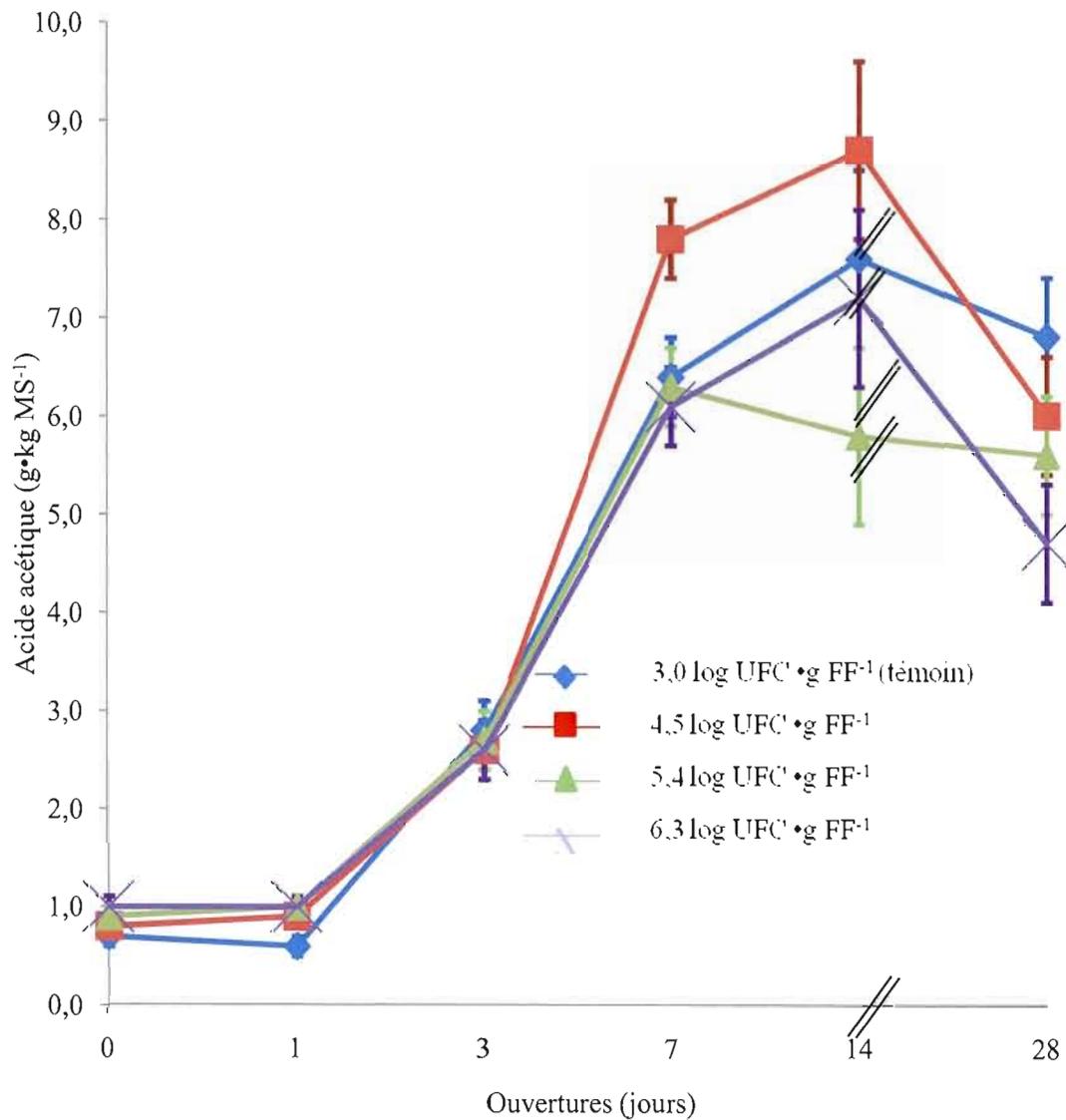


Figure 6. Effet des doses de bactéries lactiques ajoutées aux fourrages de fléole des prés (*Phleum pratense* L.) sur l'évolution dans le temps des concentrations en acide acétique ($\text{g} \cdot \text{kg MS}^{-1}$) durant le processus de fermentation pour les 4 traitements (essai 1).

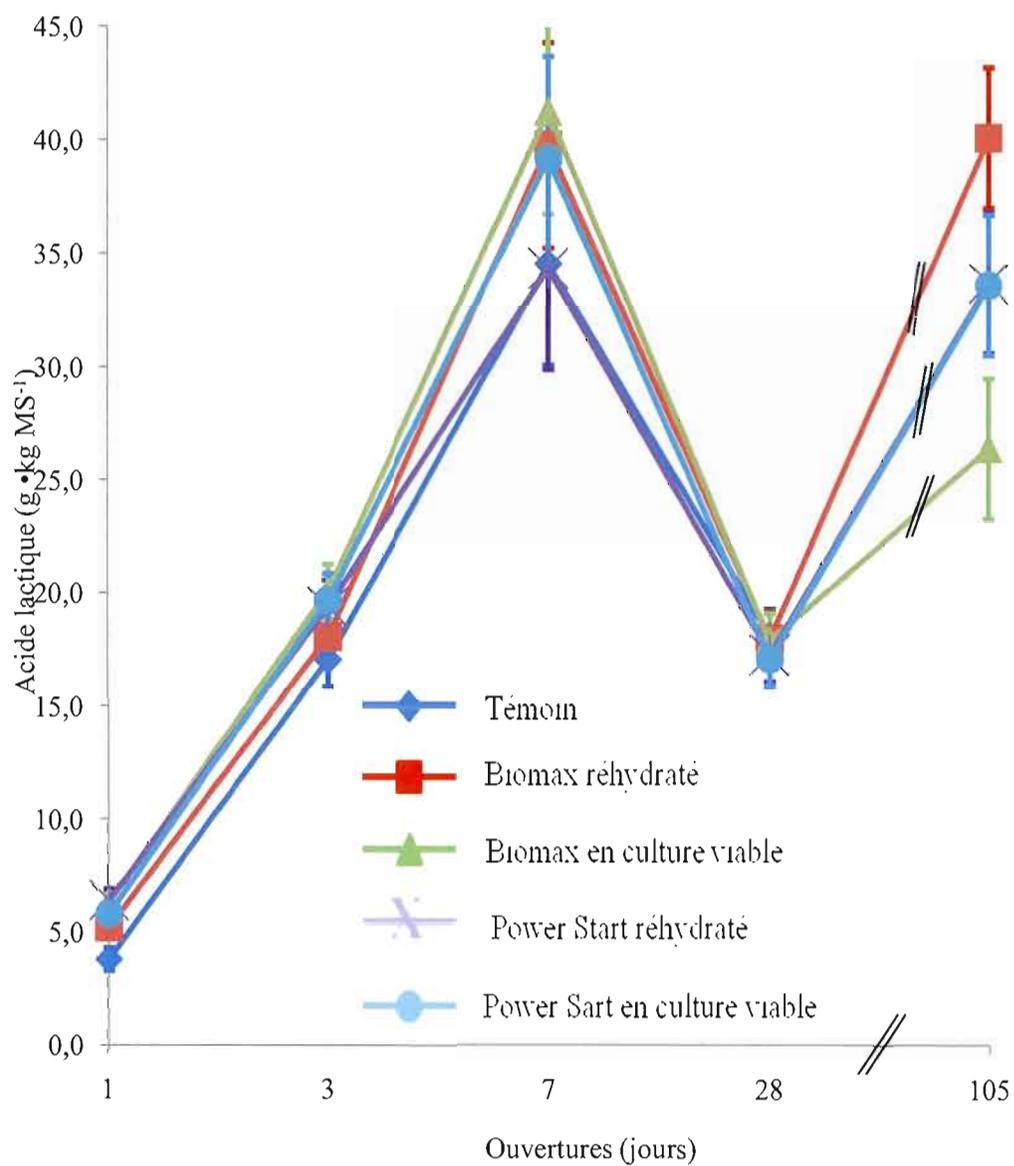


Figure 7. Effet des types d'inoculant et de leur mode de préparation ajoutés aux fourrages de fléole de prés (*Phleum pratense* L.) sur l'évolution dans le temps des concentrations en acide lactique (g · kg MS⁻¹) durant le processus de fermentation pour les 5 traitements (essai 2).

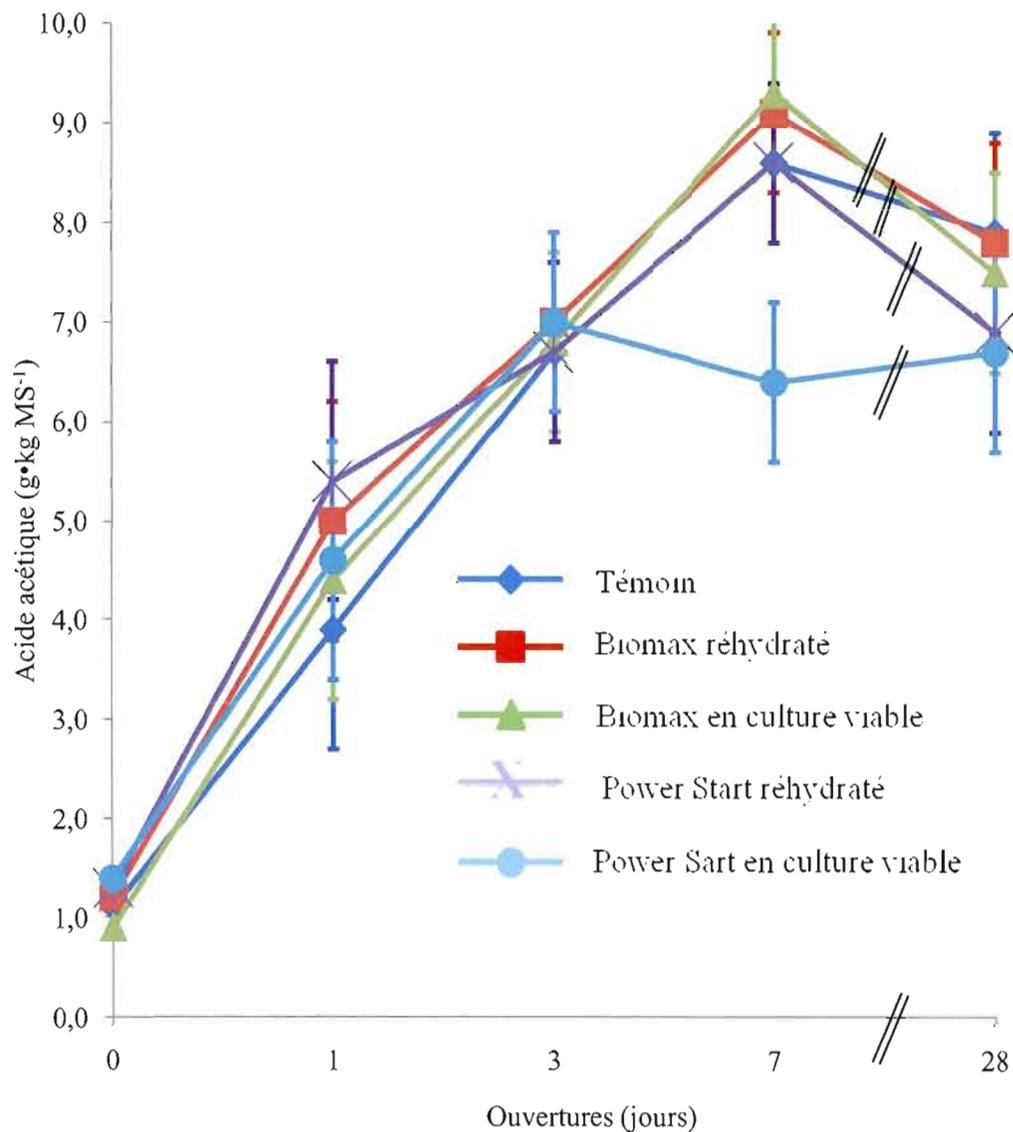


Figure 8. Effet des types d'inoculant et de leur mode de préparation ajoutés aux fourrages de fléole de prés (*Phleum pratense* L.) sur l'évolution dans le temps des concentrations en acide acétique (g ·kg MS⁻¹) durant le processus de fermentation pour les 5 traitements (essai 2).

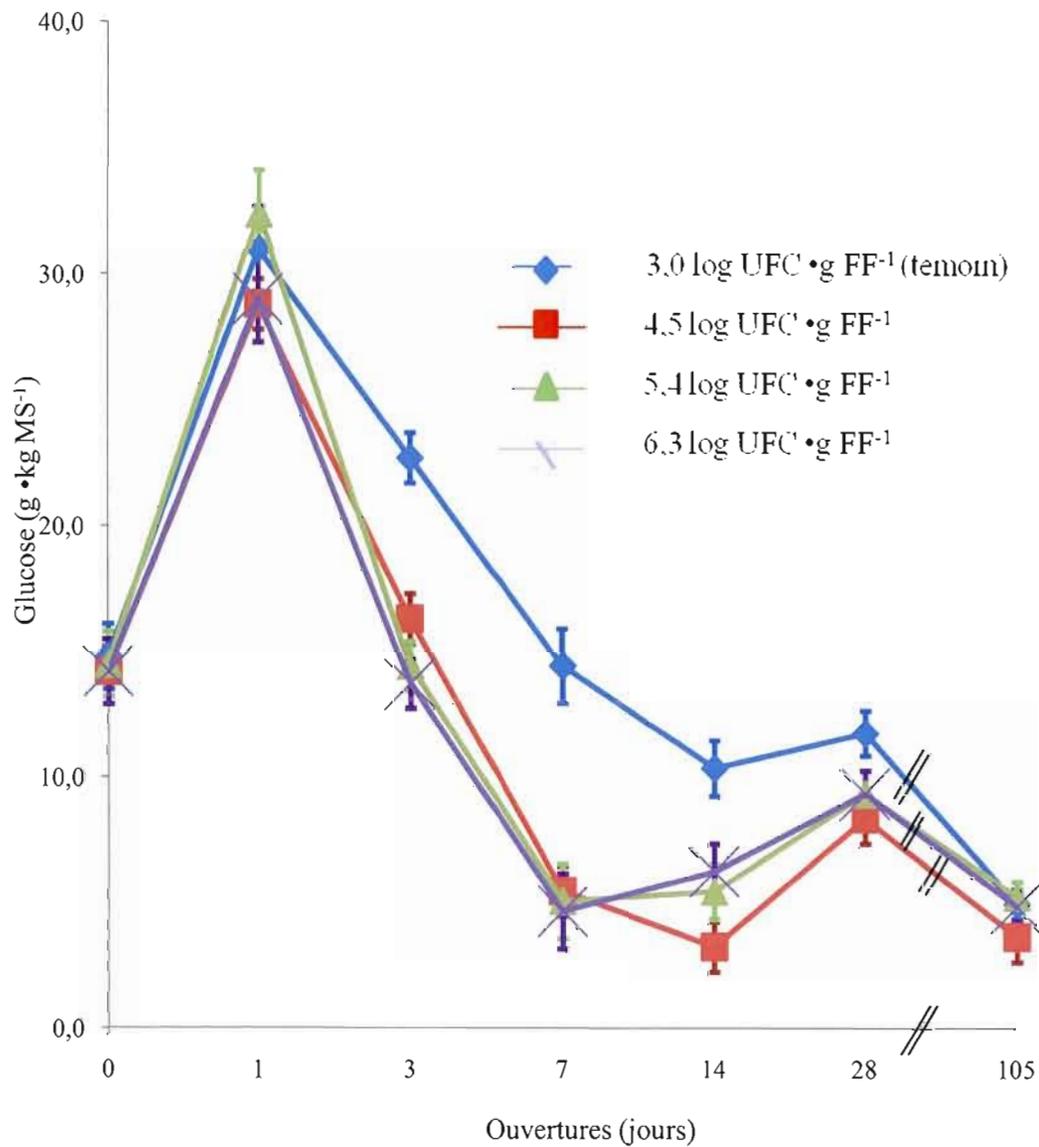


Figure 9. Effet des doses de bactéries lactiques ajoutées aux fourrages de fléole des prés (*Phleum pratense* L.) sur l'évolution dans le temps des concentrations en glucose (g · kg MS⁻¹) durant le processus de fermentation pour les 4 traitements (essai 1).

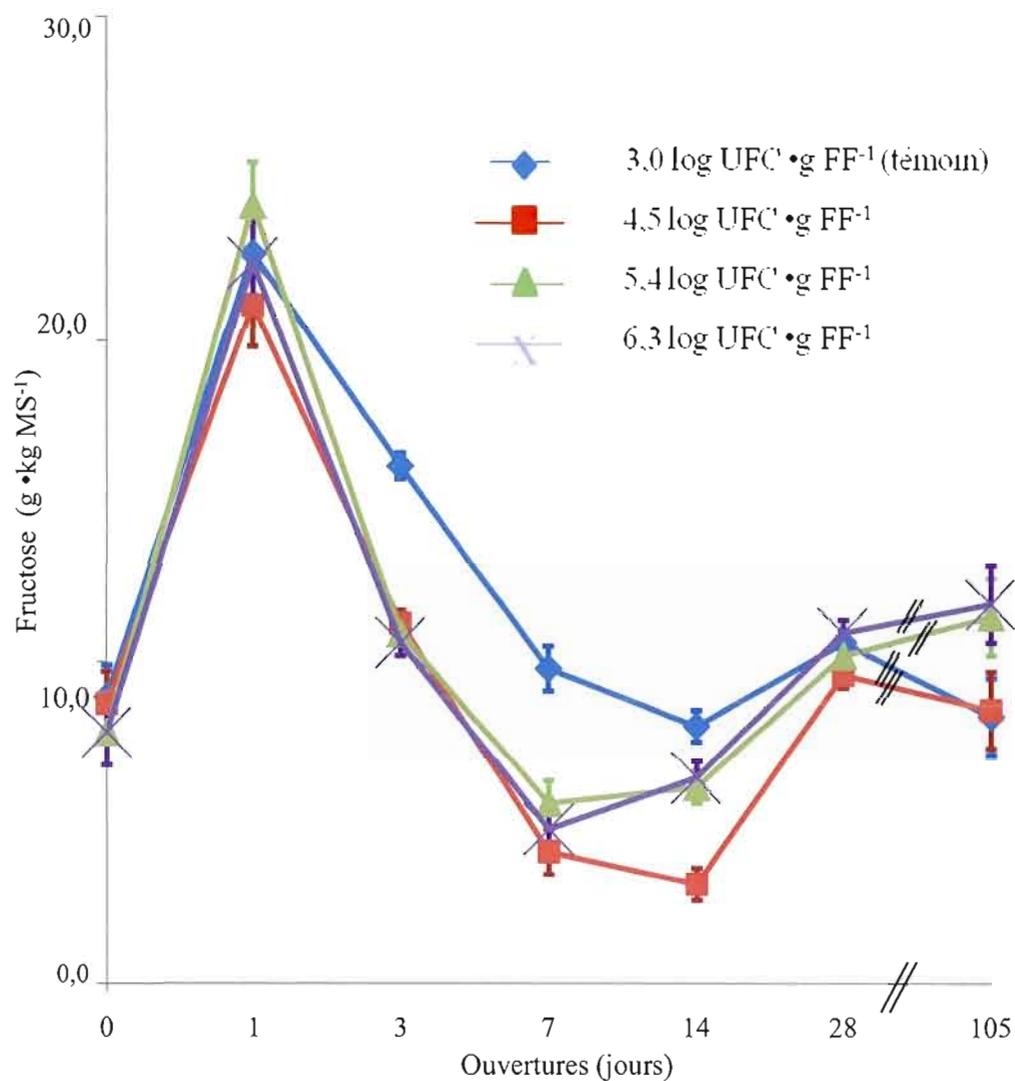


Figure 10. Effet des doses de bactéries lactiques ajoutées aux fourrages de fléole des prés (*Phleum pratense* L.) sur l'évolution dans le temps des concentrations en fructose (g · kg MS⁻¹) durant le processus de fermentation pour les 4 traitements (essai 1).

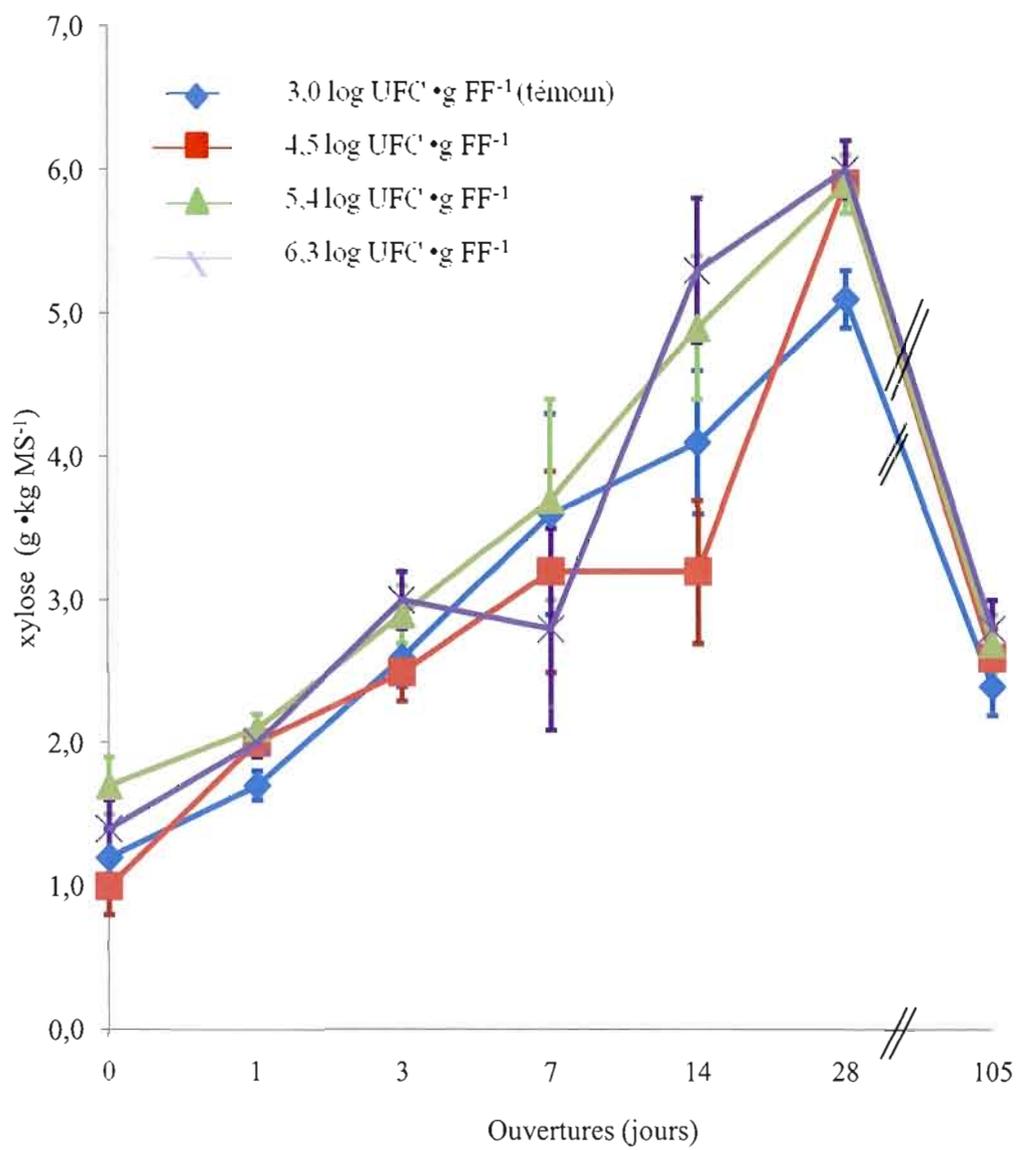


Figure 11. Effet des doses de bactéries lactiques ajoutées aux fourrages de fléole des prés (*Phleum pratense* L.) sur l'évolution dans le temps des concentrations en xylose ($\text{g} \cdot \text{kg MS}^{-1}$) durant le processus de fermentation pour les 4 traitements (essai 1).

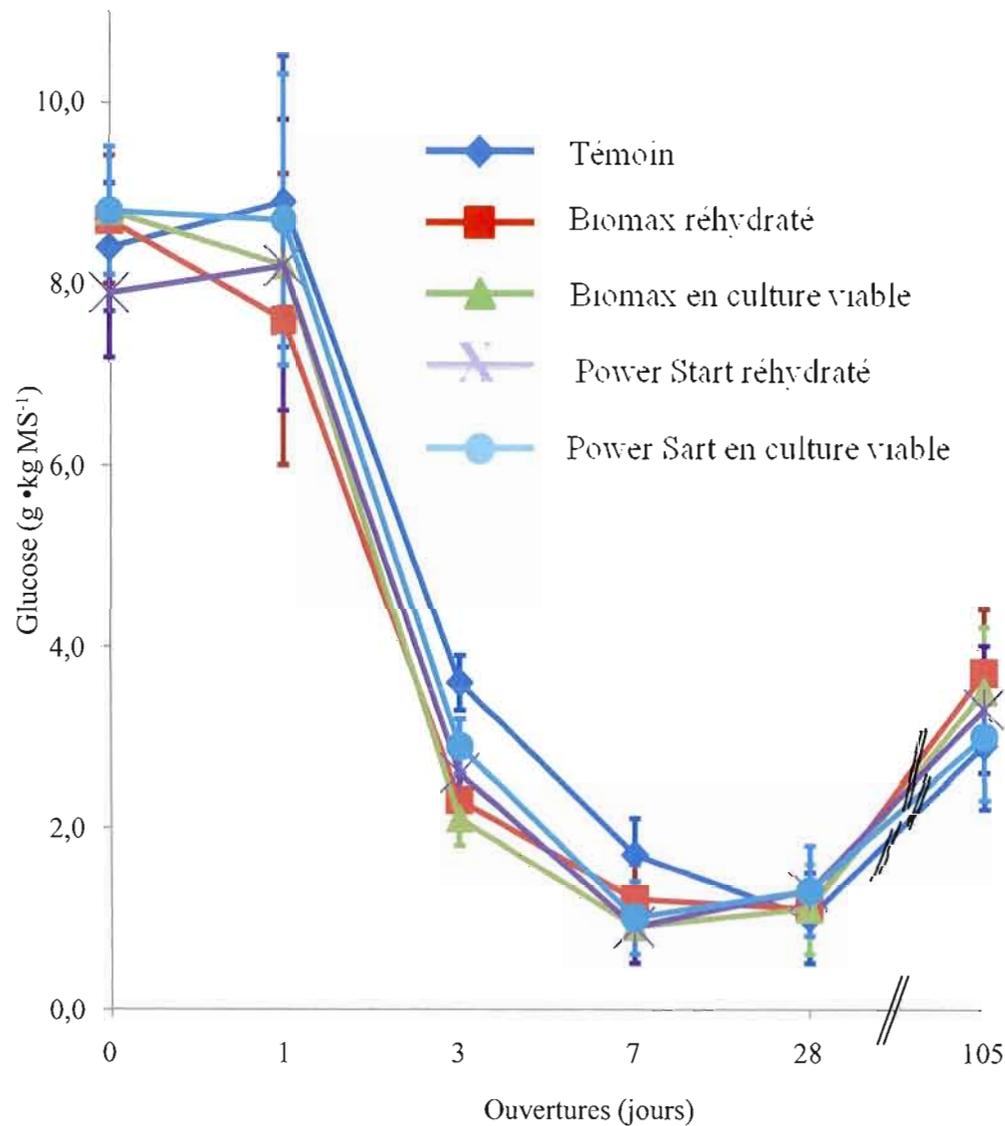


Figure 12. Effet des types d'inoculant et de leur mode de préparation ajoutés aux fourrages de fléole de prés (*Phleum pratense* L.) sur l'évolution dans le temps des concentrations en glucose (g · kg MS⁻¹) durant le processus de fermentation pour les 5 traitements (essai 2).

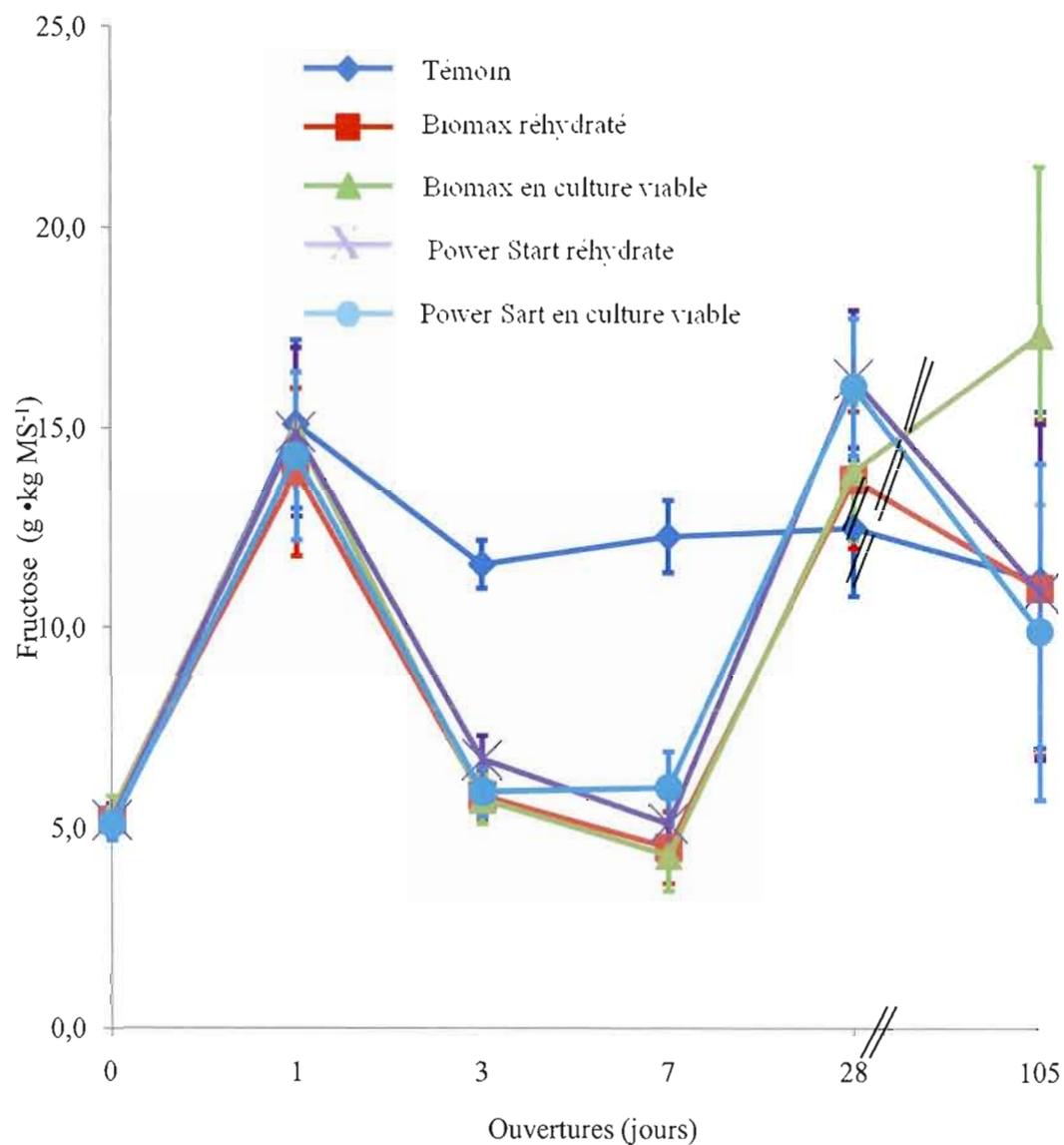


Figure 13. Effet des types d'inoculant et de leur mode de préparation ajoutés aux fourrages de fléole de prés (*Phleum pratense* L.) sur l'évolution dans le temps des concentrations en fructose ($\text{g} \cdot \text{kg MS}^{-1}$) durant le processus de fermentation pour les 5 traitements (essai 2).

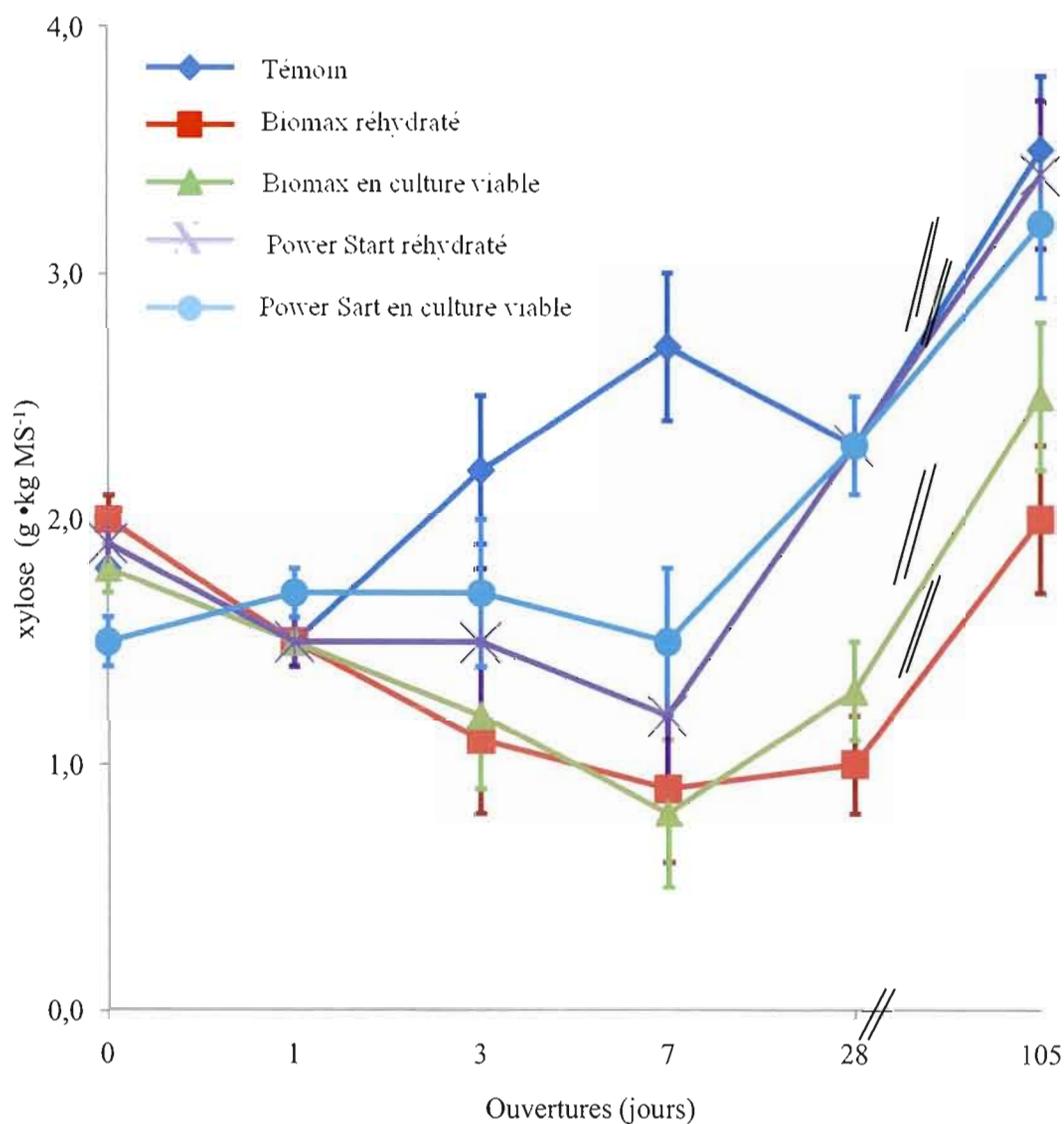


Figure 14. Effet des types d'inoculant et de leur mode de préparation ajoutés aux fourrages de fléole de prés (*Phleum pratense* L.) sur l'évolution dans le temps des concentrations en xylose (g · kg MS⁻¹) durant le processus de fermentation pour les 5 traitements (essai 2).

Références

Amyot, A. 2003. Bien comprendre ce qui se passe dans les fourrages, du champs...à l'animal, un atout pour améliorer sa régie. Colloque régional sur les plantes fourragères. Direction régionale de la Chaudière-Appalaches (13 février 2003).

Association of Official Analytic Chemist 1990. Official method of analysis. 15^e éd. AOAC, Washington, D.C.

Association of Official Analytic Chemist 1995. Official method of analysis. 16^e éd. AOAC, Washington, D.C.

Baker, S.B. et Summerson, W.H. 1941. The colorimetric determination of lactic acid biological material. J.Biol.Chem. 137:535-554.

Bolsen, K. K., Ashbell, G. et Weinberg, Z. G. 1996. Silage fermentation and silage additives. Asian-Austr. J. Anim. Sci. 9: 483-614.

Buxton, D.R. et O'Kiely, P. 2003. Preharvest plant factors affecting ensiling. Pages 199-250 *dans* Buxton, R. D., Muck, R. E. et Harrison, J. H., éd. Silage Science and Technology. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America et Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin.

Davies, D. R., Leemans, D. K., Bakewell, E. L., Winters, A. L., Scollan, N. D., Evans, P., Cooper, A. et Merry, R. J. 2002. Development of novel inoculant from small scale laboratory to large clamp silo. Pages 202-203 *dans* Gechie, L. M. et C.Thomas, éd. Proceedings of the XIIIth International Silage Conference. Auchincruive, Scotland.

Dellaglio, F. et S.Torriani 1991. Microbiological Methods *dans* G.Pahlow et H.Honig, éd. Forage conservation towards 2000. Landbauforschung Volkenrode, Braunschweig, Germany.

Demarquilly, C. 1986. L'ensilage et l'évolution récente des conservateurs. Bull. Tech. C.R.Z.V. 63:5-12.

Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. et Smith, F. 1955. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 28: 350-356.

- Fenlon, D. R., Henderson, A. R. et Rooke, J. A. 1995.** The fermentation preservation of grasses and forage crops. J. Appl. Bact. Symposium Supplement. **79**: 118S-131S.
- Flipot, P., Mowat, D. N., Parkins, J. J. et Buchanan-Smith, J. G. 1976.** Ensiling characteristics of silage treated with sodium hydroxyde. Can. J. Plant. Sci. **56**: 935-940.
- Jaster, E.H. 1995.** Legume and grass silage preservation. CSSA Special publication no.22. Post-Harvesting physiology and preservation of forage. Madison, Wisc.
- Johnson, H. E., Merry, R. J., Davies, D. R., Kell, D. B., Theodorou, M. K. et Griffith, G. W. 2005.** Vacuum packing: a model system for laboratory-scale silage fermentations. J. Appl. Microbiol. **98**: 106-113.
- Jones, B. A., Satter, L. D. et Muck, R. E. 1992.** Influence of bacterial inoculant and substrate addition to lucerne and ensiled at different dry matter contents. Grass Forage Sc. **47**: 19-27
- Jonsson, A. 1990.** Enumeration and confirmation of *Clostridium tyrobutyricum* in silages using neutral red, D-cycloserine and lactate dehydrogenase activity. J. Dairy Sci. **73**: 719-725.
- Kizilsimsek, M., Schmidt, R. J. et Jr, L. K. 2007.** Effects of a mixture of lactic acid bacteria applied as freeze-dried or fresh culture on the fermentation of alfalfa silage. J. Dairy Sci. **90**: 5698-5705.
- Kung, L. J. 2000.** Silage fermentation and additives *dans* Miller Publishing Co. éds. Direct-fed Microbial, Enzyme and forage additive Compendium. Minnetonka, MN.
- Lafrenière, C. 2002.** Étude de l'ensilabilité et des bactéries lactiques épiphytes des graminées et leurs effets sur la fermentation et la conservation des ensilages entreposés en silo-meule. Thèse de doctorat. Université Laval. Québec, Canada. 141 p.
- Lafrenière, C., Berthiaume, R., Drapeau, R. et Amyot, A. 1998.** Comment conserver une bonne récolte sous forme d'ensilage. Pages 58-108 *dans* CPVQ, éds. Colloque sur les plantes fourragères. L'ensilage : du champ à l'animal. Alma (17 novembre) et Sherbrooke (18 novembre).
- Lingvall P. et Lindgren, S. 1991.** Proceedings of the Eurobac Conference (12-16 August 1986). Grovfoder: Grass and Forage Reports, Swedish University of Agricultural Science, Uppsala, Suède. 188 p.

- McDonald, P., Henderson, N. et Heron, S. 1991.** The biochemistry of silage. P.McDonald, Henderson, N. et Heron, S., éd. 2e éd. Chalcombe Publications, Bucks. UK. 340 p.
- Merry, R. J., Dhanoa, M. S. et Theodorou, M. K. 1994.** Use of freshly cultured lactic acid bacteria as silage inoculant. *Grass Forage Sc.* 50:112-123.
- Merry, R. J., Winters, A. L., Thomas, P. I., Müller, M. et Müller T. 1995.** Degradation of fructans by epiphytic and inoculated lactic acid bacteria and by plant enzymes during ensilage of normal and sterile hybrid ryegrass. *J. Appl. Bact.* 79: 583-591.
- Moran, J. P., O'Kiely, P., Wilson, R. K. et Crombie-Quilty, M. B. 1991.** Lactic acid bacteria level on grass grown for silage in Ireland. Pages 283-286 *dans* G.Pahlow et H.Honig, éd. Forage Conservation towards 2000. Landbauforschung Volkenrode, Braunschweig. Germany.
- Muck, R. E. et Pitt, R. E. 1993.** Ensiling and its effect on crop quality. Pages 57-66 *dans* Northeast Regional Agric. Engng Service, Cooperative extension, éd. Silage: Field to Feedbunk, NRAES-67. Hershey, Pennsylvania.
- Müller, M. et Lier, D. 1994.** Fermentation of fructans by epiphytic lactic acid bacteria. *J. Appl. Bact.* 76:406-411.
- Müller, M. et Steller, J. 1995.** Comparative studies of degradation of grass fructan and inulin by strains of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* and *Lactobacillus plantarum*. *J. Appl. Bact.* 78: 229-236.
- Ouellet, A.-M. et Lafrenière, C. 2005.** Additifs et inhibiteurs de moisissures pour fourrages. MAPAQ et URDAAT, éd. Rouyn-Noranda. 38 p.
- Pahlow, G. 1986.** Microbiology of inoculants, crops and silages. Pages 45-59 *dans* Pettersson, K. P. et Lindgren, S., éd. Proceedings of 3rd General Meeting of European Grassland Federation. Braunschweig, Germany.
- Pahlow, G. 1991.** Role of microflora in forage conservation. Pages 26-36 *dans* G.Pahlow et H.Honig, éd. Forage Conservation towards 2000. Landbauforschung Volkenrode, Braunschweig.
- Pahlow, G., Muck, R.E., Driehus, F., Elerink, S. J. W. H. et Spoelstra, S. F. 2003.** Microbiology of silage. Pages 31-79 *dans* Buxton, R. D., Muck, R. E. et Harrison, J.

H., éd. Silage Science and Technology. American Society of Agronomy , Crop Science Society of America et Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin.

Pelletier, S., Tremblay, G. F., Lafrenière, C., Bertrand, A., Bélanger, G., Castonguay, Y. et Rowsell, J. 2009. Nonstructural carbohydrate concentration in timothy as affected by N-fertilization, stage of development and time of cutting. *Agron. J.* 101: 1372-1380.

Rooke, J. A. 1990. The number of epiphytic bacteria on grass at ensilage on commercial farms. *J. Sci. Food Agric.* 51: 525-533.

Rook, J. A. et Hatfield, R. D. 2003. Biochemistry. Pages 95-135 *dans* Buxton, R. D., Muck, R. E. et Harrison, J. H., éd. Silage Science and Technology. American Society of Agronomy , Crop Science Society of America et Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin.

SAS® 2002-2008. Statistics. SAS Institute Inc. vers. 9.2. Cary, NC.

Satter, L. D., Muck R.E., B.A. Jones, Dhinam, T. R., Woodford, J. A. et Wacek, C. M. 1991. Efficacy of bacterial inoculant for lucerne silage. Pages 416-418 *dans* G.Pahlow et H.Honig, éd. Forage Conservation towards 2000. Landbauforschung Volkenrode, Braunschweig, Germany.

Simon, U. et Park, B. H. 1983. A descriptive scheme for development in perennial forage grasses. Pages 416-418 *dans* Smith, J. A. et Hays, V. W., éd. Proceeding of the XIV International Grassland Congress. Lexington, KY.

Smith, D. 1973. Nonstructural Carbohydrates. Pages 105-155 *dans* Butler, G. W. et Bailey, R. W., éd. Chemistry and Biochemistry of Herbage. Academic Press, London et New York.

Weinberg, Z. G. et Muck, R. E. 1996. New trends and opportunities in the development and use of inoculant for silage. *FEMS Microbiology Reviews* 19: 53-68.

Weissbach, F. 1996. New developments in crops conservation. Pages 11-25 *dans* Proceedings of the XIth International Silage Conference, University of Wales, UK. Aberystwyth, UK.

Wieringa, G. W. 1969. Influence of moisture and nutrient content of forage plants on fermentation processes. Pages 133-137 *dans* S.Lindgren et K.P.Pettersson, éd. Proceedings of 3rd General Meeting of European Grassland Federation. Braunschweig, Germany.

Winters, A. L., Merry, R. J., Müller, M., Davies, D. R., Pahlow, G. et Müller, T. 1998. Degradation of fructans by epiphytic and inoculant lactic acid bacteria during ensilage of grass. *J. Appl. Bact.* 84: 304-312.

Zhu, Y. et Yang, S.-T. 2004. Effect of pH on metabolic pathway shift in fermentation of xylose by *Clostridium tyrobutyricum*. *J. Biotechnol.* 110: 143-157.