

ECOLE SUPERIEURE D'AGRICULTURES

Angers Loire

55, rue Rabelais – B.P. 748

49007 ANGERS CEDEX 01

TEL. : 02.41.23.55.55



CHAMBRE D'AGRICULTURE

PAYS DE LA LOIRE

9, Rue André Brouard

CS 70510

49105 ANGERS

Maître de stage: Brigitte LAMBERT



**L'ensilage inoculé par du kéfir,  
une pratique innovante en élevage de ruminant**

**STAGE Recherche et Innovation - 2019**

Kéfir, Ensilage, Ruminant

**RENARD Pacôme**

Promotion 118



**Auteur:** Pacôme RENARD

**Promotion:** 118

**Signalement du rapport:** “L’ensilage inoculé par du kéfir, une pratique innovante en élevage de ruminant”, 29 pages, 12 tableaux, 9 graphiques, 25 références bibliographiques

**Mots clefs:** kéfir, ensilage d’herbe, ruminant, inoculum bactérien, conservation, stabilité

### RESUME D’AUTEUR

Les fourrages fermentés font partie des aliments essentiels dans l’élevage des ruminants. L’ensilage représente souvent l’aliment principale de la ration en période hivernale. Ainsi son contrôle est primordial afin de garantir la rentabilité de l’exploitation agricole. Afin d’assurer sa qualité, certains agriculteurs utilisent des conservateurs. Seulement ces derniers sont souvent très onéreux ; certains se tournent vers une solution fermentée autoproduite. Le kéfir correspondait à ces critères grâce à sa forte concentration en bactéries lactiques et sa stabilité à température ambiante. Cependant aucun essai n’a été effectué pour quantifier les effets d’un inoculum de kéfir sur de l’ensilage d’herbe. Grâce à une technique de fermentation sous mini-silo en tube PVC, l’expérimentation a pu être menée dans le cadre du projet PEI “santé animale”, volet 2.1 “le kéfir en multi-filière”. 4 modalités d’inoculum ont été testées, un témoin, un inoculum bactérien Pioneer®, un inoculum de kéfir Défi’for® et un inoculum de kéfir “sauvage” (composition inconnue et issue de grain de kéfir). 2 modalités de matière sèche (25% et 40% de MS) sont testées, ainsi que 2 modalités de temps de fermentation (intermédiaire et final). Des analyses de fourrage ont été effectuées pour décrire la qualité du fourrage, la valeur microbiologique, la stabilité du fourrage et l’état chimique. Quelques effets significatifs entre les 3 inocula et le témoin sont ressortis. Concernant l’inoculum Pioneer®, une amélioration de la concentration en acide acétique finale est observée, ainsi qu’une baisse de concentration en acides lactiques intermédiaire. Pour l’ensilage à 40% de MS sa concentration en acides lactiques final est supérieure, suivie d’un pH final plus faible et d’une baisse de NDF final. L’inoculum de kéfir Défi’for® amène à une baisse de concentration en acides lactiques intermédiaire, dans le cas de l’ensilage à 40% de MS, la concentration en acides acétiques intermédiaire est plus faible. Ensuite dans le cas de l’ensilage à 25% de MS, le pH intermédiaire est plus élevé et une valeur en ADF final plus faible. Enfin concernant l’inoculum de kéfir sauvage, dans le cas d’un ensilage à 25% de MS, le pH intermédiaire est plus élevé et la valeur en NDF final est plus faible. En conclusion, peu d’effets bénéfiques sur la conservation de l’ensilage sont décelés, les seuls observables sont obtenus par l’inoculum Pioneer®. De façon globale pour ce type d’ensilage d’herbe, l’ajout d’un inoculum ralentit la fermentation et amène une baisse de la quantité des constituants pariétaux.



**Reporting report:** "Silage inoculated with kefir, an innovative practice in ruminant farm", 29 pages, 12 tables, 9 graphs, 25 bibliographical references

**Keywords:** kefir, grass silage, ruminant, bacterial inoculum, conservation, stability

### ABSTRACT

Fermented fodder is one of the essential foods in ruminant farming. Silage is often the main food of the ration in winter. Thus, its control is essential to guarantee the profitability of the farm. To ensure its quality, some farmers use inoculant. Nevertheless, these are often very expensive, some have turned to a fermented solution self-produced. Kefir present these criteria thanks to its high concentration of lactic acid bacteria and its stability at room temperature. However, no tests have been made to quantify the effects of a kefir inoculum on grass silage. Thanks to a mini-silo fermentation technique in PVC tube, the experiment was carried out within the framework of the PEI project " animal health ", section 2.1 " kefir in multi-sector ". 4 inoculum modalities were tested, a control, a Pioneer® bacterial inoculum, a Defi'for® kefir inoculum and a "wild" kefir inoculum (composition unknown and derived from kefir grain). 2 modalities of dry matter (25% and 40% DM) are tested, as well as 2 modalities of fermentation time (intermediate and final). Forage analyzes were performed to describe forage quality, microbiological value, forage stability, and chemical status. Some significant effects between the 3 inocula and the control emerged. Concerning the Pioneer® inoculum, an improvement in the concentration of final acetic acids is observed, as well as a drop in intermediate lactic acid concentration. For silage at 40% DM, its final lactic acid concentration is higher, followed by a lower final pH and a lower final NDF. Defi'for® kefir inoculum leads to a lower concentration of lactic acid intermediate, in the case of silage at 40% DM, the concentration of intermediate acetic acid is lower. Then in the case of silage at 25% DM, the intermediate pH is higher and a final ADF value lower. Finally, for the inoculum of wild kefir, in the case of 25% DM silage, the intermediate pH is higher and the final NDF value is lower. In conclusion, few beneficial effects on the conservation of silage are detected, the only observables ones are obtained by the Pioneer® inoculum. Globally for this type of grass silage, the addition of an inoculum slows down the fermentation and causes a decrease in the quantity of the parietal constituents.



## Remerciements

Je tiens à remercier en premier lieu ma maîtresse de stage, Brigitte Lambert, pour son accueil et son aide permanente lors de ce stage. Elle a toujours cherché à le rendre le plus intéressant et le plus instructif possible (ce qu'elle a réussi), rythmé par des activités diverses me permettant de découvrir son travail au sein de la chambre d'agriculture. Merci à l'ensemble des personnes que j'ai pu rencontrer dans les locaux de la chambre d'agriculture pour leur bienveillance. J'aimerais remercier les personnes concernées par le projet comme M. Gilles Grosmond pour l'intérêt qu'il portait à mon travail, à M. François de Meerschmann pour son soutien en analyses statistiques, ainsi qu'à Marc Fougères pour le temps qu'il m'a consacré. Enfin, merci à l'ensemble des exploitants agricoles que j'ai été amené à rencontrer, pour leurs écoutes et leurs implications dans le projet. Plus particulièrement à ceux qui sont venus m'écouter lors de ma restitution. Encore merci à ma maîtresse de stage pour le temps qu'elle a su me consacrer.





# Table des matières

Remerciements

Sigles et Abréviations

|  |    |
|--|----|
| Introduction.....  | 1  |
| I. Contexte de l'étude.....  | 2  |
| A. La Chambre d'agriculture des Pays de la Loire.....                    | 2  |
| B. Le projet PEI « santé animale ».....                                  | 3  |
| II. La conservation de l'ensilage en élevage de ruminants.....           | 4  |
| A. Le rôle des microorganismes.....                                      | 5  |
| B. Les différents conservateurs.....                                     | 8  |
| C. Les méthodes d'évaluation de la qualité des ensilages.....            | 9  |
| III. Le kéfir et son utilisation pour la conservation de l'ensilage..... | 9  |
| A. Définition du kéfir.....  | 9  |
| B. Kéfir et conservation de l'ensilage.....                              | 11 |
| IV. Problématique.....   | 14 |
| V. Matériel et méthodes.....   | 15 |
| A. Le dispositif expérimental mis en place.....                          | 15 |
| B. Les analyses fourragères effectuées.....                              | 17 |
| C. Les méthodes d'analyses des résultats.....                            | 18 |
| VI. Résultats.....   | 20 |
| A. Ensilage à t0, avant fermentation en mini-silo.....                   | 20 |
| B. Ensilage à 8 jours de fermentation.....                               | 21 |
| C. Ensilage à 10 semaines de fermentation.....                           | 22 |
| D. Croisement des résultats et évaluation de la qualité.....             | 23 |
| VII. Discussion.....   | 25 |
| A. Un ensilage d'herbe bien spécifique.....                              | 25 |
| B. Une interprétation des résultats à nuancer.....                       | 27 |
| C. Des pistes d'amélioration.....  | 29 |
| Conclusion.....  | 32 |

Bibliographie



## Sigles et Abréviations

ADF : acid detergent fiber

ADL : acid detergent lignin

AGV : acide gras volatil

AIC : critère d'information d'Akaike

BL : bactéries lactiques

cm : centimètres

g : grammes

ha : hectares

kg : kilogrammes

L : Litres

m : mètres

MAT : Matières azotées totales

MF : matière fraîche

MS : matière sèche

NDF : neutral detergent fiber

t : tonnes



## Introduction

De nombreux produits destinés à l'alimentation des animaux sont conservés par fermentation anaérobie. Cette technique de conservation permet une stabilisation du produit afin d'éviter une perte trop importante en qualité au cours du temps et d'apporter une meilleure gestion de l'aliment. En s'intéressant à l'élevages des ruminants, l'ensilage fait partie de l'un de ces produits. Son intérêt en élevage est de conserver facilement des aliments fourragers, essentiels dans l'alimentation des ruminants. Cependant plusieurs facteurs peuvent impacter la qualité de cet aliment, comme la proportion de matière sèche, le pH, la quantité de bactérie lactiques. En période hivernale, l'ensilage peut être quasiment la seule source fourragère des ruminants. Toute baisse de qualité de ce produit peut engendrer une forte perte économique et sanitaire pour l'élevage.

Les éleveurs cherchent à sécuriser leur système en homogénéisant leurs productions grâce à un assemblage précis d'aliments stables. L'objectif est d'obtenir des aliments répondant à un équilibre entre leurs qualités et leurs coûts. Concernant l'ensilage, l'étape de la fermentation anaérobie est centrale pour la qualité du produit. La technique de l'inoculation permet de sécuriser cette étape en favorisant une meilleure fermentation anaérobie. Des inocula commerciaux existent, cependant leur coût d'achat est très élevé. D'autres inocula comme le kéfir existent. C'est un produit fermenté concentré en microorganisme. Il peut être autoproduit, ainsi son coût devient faible.

A travers des formations sur des pratiques alternatives, la chambre d'agriculture des Pays de la Loire diffuse cette pratique. Seulement peu de données scientifiques permettent de prouver son efficacité. Elle s'interroge alors sur l'impact de l'inoculation de kéfir sur l'ensilage. Pour se faire elle met en place des expérimentations avec d'autres organismes grâce à un projet régional PEI santé animale.

Dans un premier temps, les recherches bibliographiques autour de l'ensilage et de l'inoculation du kéfir seront exposées. Dans un deuxième temps, la méthodologie mise en place pour traiter la question sera expliquée. Ensuite les résultats obtenus seront présentés, puis discutés.

Organigramme des directions de la Chambre d'agriculture Pays de la Loire 2019



Schéma 1: Organigramme Chambre d'agriculture des Pays de Loire (source: CAPdL, 2019)

# I. Contexte de l'étude

## A. La Chambre d'agriculture des Pays de la Loire

### 1. Les Chambres d'agriculture, organismes centraux du monde agricole

La Chambre d'agriculture des Pays de la Loire est un organisme consulaire qui fait partie des 18 Chambres d'agriculture régionales.

Les chambre d'agriculture répondent à 4 grandes missions selon le Code rural :

- Représenter les acteurs du monde agricole auprès des pouvoirs publics et des collectivités territoriales
- Accompagner le monde agricole dans son territoire (démarche entrepreneuriale, emploi)
- Contribuer au développement rural
- Améliorer les performances économiques, sociales et environnementales des exploitations

Cette dernière mission amène les Chambres d'agriculture à être un acteur de la recherche et l'innovation sur les pratiques agricoles. Ceci leurs permet ensuite de mettre en place des formations afin de diffuser les connaissances obtenues. Cet organisme national a été créé en 1924 et a pris de plus en plus de place dans le monde agricole français pour en devenir un acteur indispensable.

### 2. Une diversité de service pour répondre aux besoins

L'organisation des Chambres d'agriculture est très sectorielle. La Chambre d'agriculture des Pays de la Loire est composée de 8 directions (cf. Schéma 1) répondant à des tâches bien précises. Chaque direction est composée de Services eux même découpés en pôle. Le pôle qui s'intéresse aux méthodes alternatives est celui de l'Agriculture Biologique. Il propose de nombreuses formations autour de ces thématiques « soigner par des méthodes naturelles ». Concernant le kéfir la formation est intitulée « Le kéfir, un complexe vivant aux multiples usages ». Ces formations sont proposées depuis plus de 10 ans permettant à des éleveurs de mettre en place ces pratiques dites « alternatives ». Afin d'améliorer ses formations, la chambre d'agriculture essaie d'objectiver l'impact de ces pratiques. Cela s'inscrit dans les objectifs de la chambre d'agriculture, celle-ci cherchant à accompagner les agriculteurs à travers du conseil et des formations pour répondre aux attentes actuelles.





## B. Le projet PEI « santé animale »

### 1. L'origine du projet

L'agriculture française cherche à améliorer la qualité de sa production pour se mettre de plus en plus en phase avec les attentes sociétales actuelles. En effet, les consommateurs de produits agricoles ainsi que les riverains des exploitations agricoles veulent une agriculture plus 'saine'. Cela passe entre autres par la diminution des antibiotiques utilisés parfois de façon massive dans les élevages. Pour répondre à cette problématique, l'état a mis en place un plan EcoAntiBio pour réglementer cette utilisation et aider les éleveurs à changer leur pratique. Il essaie de répondre à 2 objectifs sur 5 ans :

- La réduction de 25% de l'usage des antibiotiques en médecine vétérinaire
- Une réduction particulière des antibiotiques d'importance critique en médecine vétérinaire (les fluoroquinolones et les céphalosporines de 3e et 4e génération)

Les craintes de l'utilisation massive de produits médicamenteux en élevage sont le risque d'une diffusion et d'une augmentation des résistances aux antibiotiques sur les souches communes entre l'homme et l'animal. Ainsi les éleveurs doivent faire face à de nouvelles contraintes techniques et économiques modifiant leurs pratiques d'élevage en place. Les éleveurs se tournent alors vers des pratiques dites « alternatives » pour répondre à ce nouvel enjeu de santé animale. Seulement les antibiotiques n'ont pas d'homologues en médecine dites « alternatives », ce qui amène les éleveurs à revoir leur système en intégrant de nombreux leviers systémiques. Ils passent ainsi d'une action curative à une action préventive en intégrant dans leur réflexion sur la santé animale, l'équilibre physiologique et l'alimentation. Le souci de ces pratiques dites « alternatives », c'est de ne pas encore avoir pu bénéficier de beaucoup de recherches approfondies afin d'objectiver les résultats technico-économiques.

Pour répondre à ces enjeux de réduction d'utilisation des antibiotiques, un appel à projet a été édité par le Conseil Régional des Pays de la Loire sous le nom de « Innover en santé animale et végétale : une opportunité pour concevoir des systèmes agricoles multi-performants ». Les objectifs de ce projet sont de faire un état des connaissances sur les sujets recherchés en l'échangeant entre experts et de rendre ces informations plus accessibles auprès des autres acteurs de la filière (éleveurs, conseillers, vétérinaires...).

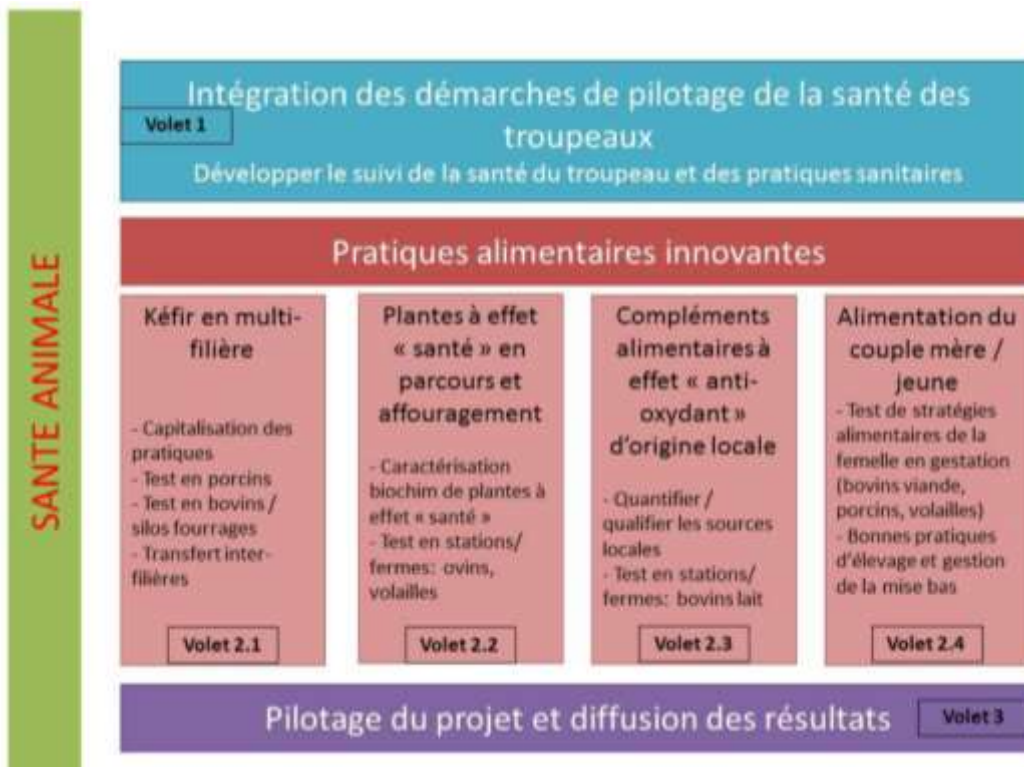


Schéma 2 : Schéma d'ensemble du projet PEI "santé animale" et des différents volets d'action (source: EIP\_AGRI)

## 2. Les acteurs du projet

Ce projet régional met donc en relation beaucoup d'acteurs de la filière animale en plus de la chambre d'agriculture, comme l'IDELE (institut de l'élevage), l'UMR INRA-Oniris (unité de recherche mixte), la CAB (coordination agrobiologique), l'ESA-LARESS (unité de recherche en sciences sociales), l'ESA-URSE (unité de recherche sur les systèmes d'élevage), l'ITAVI (institut de recherche de l'aviculture), différentes fermes expérimentales (les Trinottières, Thorigné d'Anjou), l'iteipmai (institut technique qualifié par le Ministère de l'Agriculture), l'IFIP (institut du porc) et la FR GTV (fédération régionale des groupements technique vétérinaire). Les acteurs sont très diversifiés et touchent à de nombreux domaines dans la filière production animale.

## 3. Les recherches sur le kéfir

La chambre d'agriculture des Pays de la Loire a intégré ce projet pour étudier les impacts possibles du kéfir en élevage. Cette recherche concerne le volet 2.1 dans le domaine « pratiques alimentaires innovantes » et plus particulièrement sur la partie « kéfir en multi-filière » (cf. Schéma 2). Cette partie du projet comporte 3 Objectifs :

- Capitaliser des expériences au sein de diverses filières animales
- Constituer une base de données de résultats d'analyses microbiologiques du kéfir
- Objectiver l'impact du kéfir sur la santé animale et la qualité des fourrages

Les expérimentations qui en découlent concernent 2 espèces d'animaux d'élevage : les porcins et les bovins. Le premier essai concerne l'impact d'inoculation de différents kéfirs et autres inocula bactériens sur de l'ensilage d'herbe. Le second essai sera réalisé sur des porcelets avec différents modes de supplémentation en kéfir en mesurant les performances zootechniques.

Après avoir expliqué le contexte, la synthèse bibliographique qui va suivre s'intègre à la suite d'une première étude bibliographique qui a été effectuée lors du dépôt du projet.

## II. La conservation de l'ensilage en élevage de ruminants

Le terme "ensilage" désigne à la fois la technique de conservation des aliments par acidification anaérobie contrôlée et le produit fini, stabilisé grâce à un pH acide et conditionné. (Paragon *et al.*, 2004). Cette partie concernera le rôle des microorganismes lors de l'élaboration de l'ensilage, la description des différents produits pouvant être utilisés pour améliorer sa conservation ainsi que les méthodes d'évaluation de la qualité de l'ensilage.

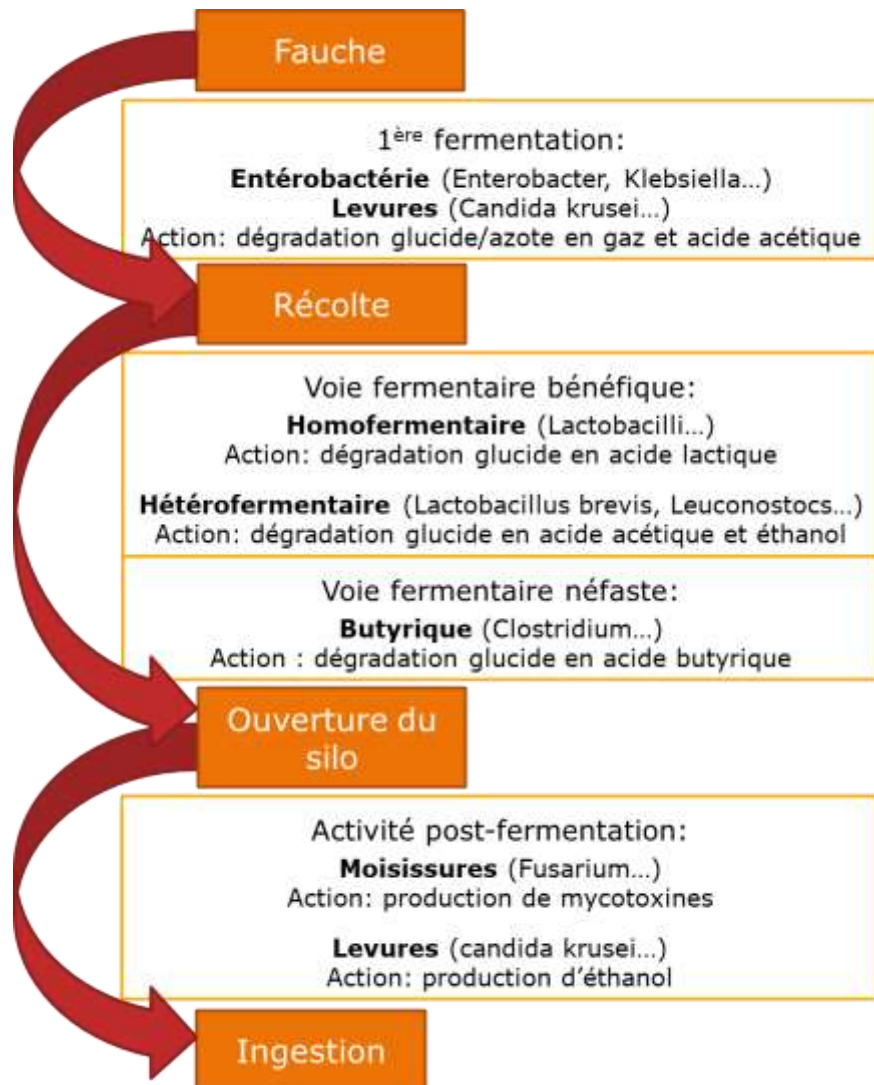


Schéma 3 : Elaboration d'un ensilage à partir d'un fourrage vert (échelle microbienne)  
 source : Paragon et al., 2004

## A. Le rôle des microorganismes

### 1. L'évolution d'un fourrage vert à de l'ensilage

Le processus d'élaboration de l'ensilage débute lors de la fauche de la plante (cf. Schéma 3). A ce moment-là la circulation interne de la plante est coupée provoquant un dessèchement qui conduit à une diminution progressive de son activité métabolique. Les microorganismes aérobiques, comme les Entérobactéries et les levures, présents naturellement sur la plante commencent à la dégrader (Paragon *et al.*, 2004). Ces activités enzymatiques et microbiennes aérobiques altèrent le produit induisant une dégradation des sucres et de l'azote en produisant des gaz, des acides et de la chaleur. L'objectif pour obtenir un ensilage de bonne qualité est d'accélérer la dessiccation de la plante et de réduire le temps en aérobie du fourrage fauché.

Lorsque le fourrage est mis en anaérobiose par un conditionnement spécifique comme une mise en silo, les fermentations aérobies diminuent progressivement jusqu'à ce qu'il n'y ai plus d'oxygène disponible. Les fermentations anaérobies prennent le relai sous 3 voies fermentaires :

- La fermentation homofermentaire concerne les bactéries dégradant les glucides en acides lactiques. Elle est responsable de la forte diminution de pH de l'ensilage.
- La fermentation hétérofermentaire regroupe les bactéries utilisant le même substrat que les bactéries homofermentaires mais produisant de l'acide acétique et de l'éthanol.
- La fermentation butyrique concerne les bactéries produisant de l'acide butyrique. Cette voie fermentaire est néfaste pour l'ensilage, car elle diminue l'acidité du milieu, dégrade les constituants azotés et détériore l'appétence voire la qualité sanitaire du fourrage.

Une fois que le pH est inférieur à 4 (Gallo, 2015), les fermentations sont bloquées par une saturation du milieu. Les différents types bactériens répondent à des cinétiques de développement en fonction du temps (Gouet *et al.*, 1972).

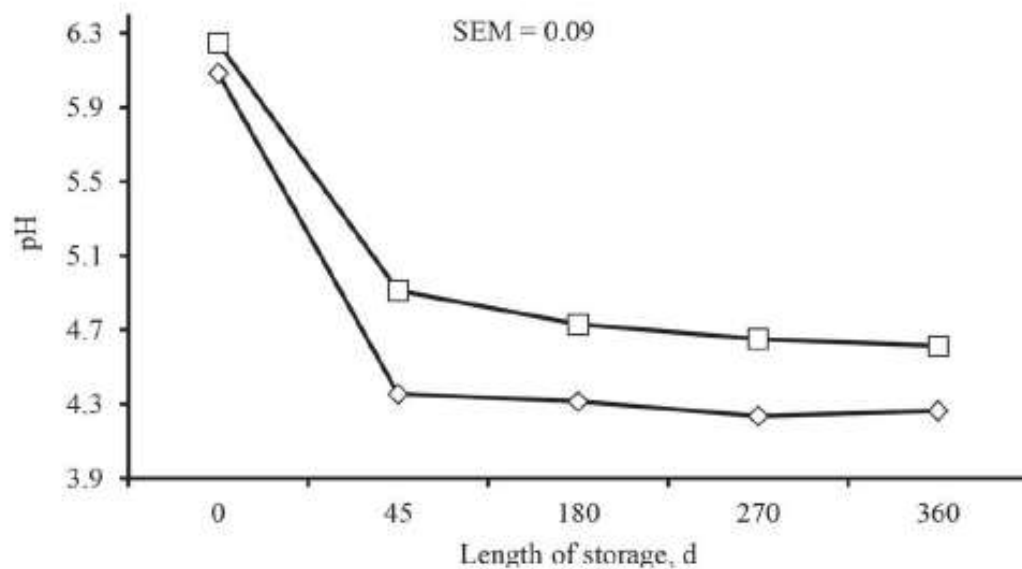
Lorsque l'ensilage est de nouveau exposé à l'oxygène, il subit une nouvelle fermentation. Les levures dégradent les acides en produisant de l'éthanol et des moisissures se développent produisant des mycotoxines. Cette étape se produit en élevage soit en silo sur le front d'attaque, soit à l'auge avant que les animaux ingèrent le fourrage. Cette fermentation est à limiter, car elle dégrade la qualité de l'ensilage. Le temps d'exposition à l'oxygène doit être le plus court possible (Paragon *et al.*, 2004).

| Mois de l'année                | Février         | Mars            | Avril           | May             |
|--------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Moyenne de température (en °C) | -1,0            | 3,9             | 9,9             | 12,4            |
| [Entérobactéries] en UFC/g     | $3 \times 10^3$ | $2 \times 10^4$ | $5 \times 10^4$ | $4 \times 10^4$ |
| [Bactéries lactiques] en UFC/g | Non détecté     | Non détecté     | $2 \times 10^1$ | $3 \times 10^2$ |

Tableau 1 : Comptage de bactéries épiphytes dans le temps sur de l'herbe de prairie permanente (Pahlow et al., 2009)

| Premier stade végétatif | Unité : en g de MS par kg de fourrage vert |                |          |           |
|-------------------------|--|----------------|----------|-----------|
| Stade physiologique     | Fin montaison                              | Début épiaison | Epiaison | Floraison |
| Ray Grass d'Italie      | 164  | 165            | 178      | 275       |

Tableau 2 : Teneur en MS du fourrage en fonction du stade physiologique (INRA, 1978)



Graphique 1 : pH de 2 ensilages de luzerne en fonction du temps en jours : □ fort % de MS ◇ faible % de MS (Santos et Kung, 2016)

Le processus décrit montre la situation idéale de fabrication d'un ensilage où tous les facteurs techniques sont optimaux. Dans d'autres cas, des erreurs ou des conditions de réalisation défavorables peuvent dégrader fortement le fourrage.

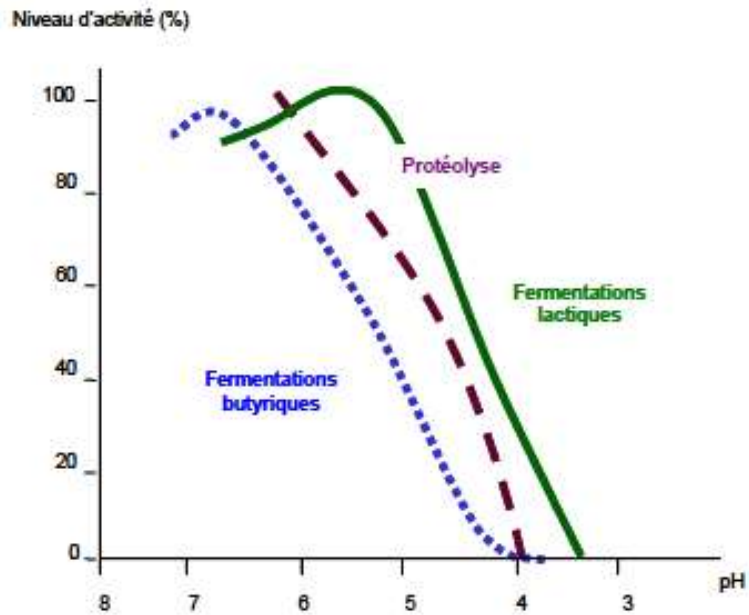
## 2. Différents facteurs impactant la fermentation de l'ensilage

La qualité d'un ensilage se traduit par la manière dont se déroule le processus d'élaboration, mais aussi par la qualité initiale du fourrage vert.

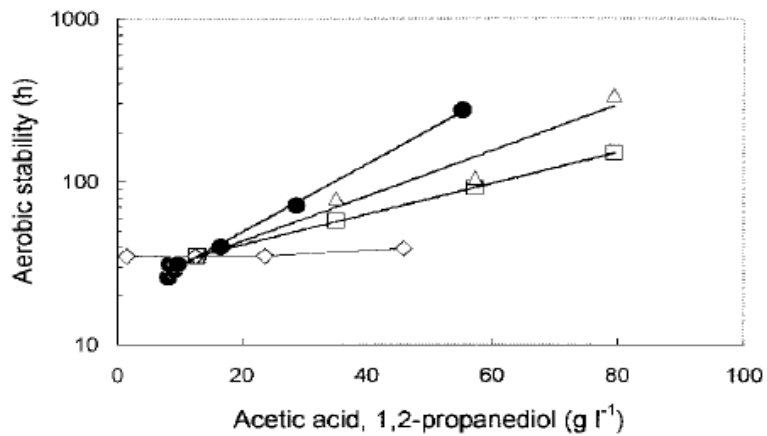
Les fermentations naturelles des ensilages sont dû aux microorganismes présentes naturellement sur les plantes. Cette population est appelée la microflore épiphyte. La quantité de microorganismes et les types de microorganismes sont très variables. Il existe une forte variabilité en fonction de l'espèce de la plante. En regardant la population de bactéries lactiques épiphytes, sa concentration sur de la luzerne,  $10^5$  UFC/g de Matière Fraîche (MF), est inférieure à celle sur de l'herbe de prairie permanente,  $10^6$  UFC/g de MF, elle-même inférieure à celle sur du maïs,  $10^7$  UFC/gMF (Buxton *et al.*, 2003). La population épiphyte varie aussi en fonction de la saison (cf. tableau 1), une augmentation des températures entre février et mai est à mettre en lien avec une augmentation de la concentration en Entérobactéries et en bactéries lactiques sur de l'herbe de prairie permanente (Pahlow, 1992). De nombreux autres facteurs de variabilité existent (Queiroz *et al.*, 2018).

Une plante en fonction de son stade physiologique n'induit pas les mêmes fermentations. Le stade végétatif de la plante est directement en lien avec son taux de Matière Sèche (MS) (cf. Tableau 2). Celui-ci influence le pH de stabilité de l'ensilage, qui est essentiel à la qualité du produit. Lorsque 2 niveaux de matière sèche d'un même fourrage sont comparés, leur pH de stabilité est différent (Santos et Kung, 2016). Le fourrage avec une matière sèche de 33% a un pH de stabilité inférieur au fourrage ayant une matière sèche de 45% (cf. Graphique 1).

Les graminées et les légumineuses induisent des processus de fermentations différents selon leurs caractéristiques. La différence majeure entre une légumineuse et une graminée du point de vue de sa composition, est sa concentration en protéines totales. La légumineuse a une concentration en protéines totales plus élevée amenant un pouvoir tampon plus élevé (MacDonald et Henderson, 1962). Ainsi, le pH de stabilité d'un ensilage de légumineuse est plus élevé qu'un pH de stabilité d'un ensilage de graminée.



Graphique 2 : Niveaux d'activités des types de fermentation en fonction du pH  
(Virtanen, 1949)



Graphique 3 : Corrélation linéaire entre la stabilité en aérobie d'un ensilage et sa concentration en acides acétiques (Danner et al., 2003)



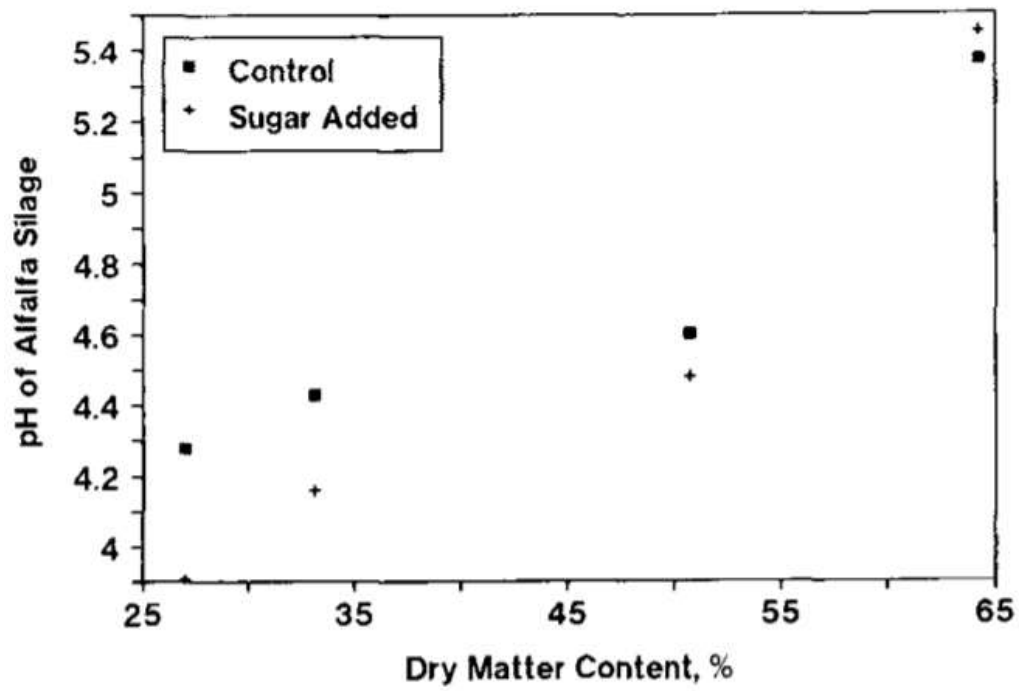
### 3. Les caractéristiques des populations bactériennes bénéfiques

Lors de la fermentation de l'ensilage en anaérobiose, 2 populations sont essentielles à sa bonne réalisation : les bactéries homofermentaires et les bactéries hétérofermentaire.

Les bactéries responsables de la forte baisse de pH de l'ensilage sont les bactéries hétérofermentaires. Cela s'explique par une forte dégradation de glucides simples en acides lactiques qui ont un fort potentiel d'acidification (Lefebvre et Lafrenière, 2015). De plus, l'activité des bactéries homofermentaires, aussi appelées bactéries lactiques, s'accroît avec une baisse de pH allant jusqu'à 5 (cf. Graphique 2). Les bactéries néfastes à la qualité de l'ensilage, comme les bactéries butyriques, ne se développent pas bien à des pH trop bas. Ainsi les bactéries lactiques permettent une forte baisse de pH pour arriver à un pH de stabilité. Avec une baisse de pH, la protéolyse diminue jusqu'à s'arrêter à un pH de 4. L'acidification du milieu permet d'éviter une altération de la qualité trop importante de l'ensilage.

L'activité hétérofermentaire est caractérisé par une production d'acide acétique (Paragon *et al.*, 2004). La fonction majeure de cet acide est de stabiliser l'ensilage lorsqu'il est remis en aérobie, par exemple lors de la distribution de l'ensilage (front d'attaque, auge...) (cf. Graphique 3). Plus la concentration en acides acétiques est forte, plus la stabilité de l'ensilage en aérobie est importante. L'acide acétique inhibe l'activité et le développement des levures et des moisissures (Danner *et al.*, 2003). Une concentration en acides acétiques n'est pas que bénéfique pour l'ensilage, car elle diminue l'appétence de ce dernier. Le pouvoir acidifiant de l'acide acétique est plus faible que celui de l'acide lactique et sa production est fortement consommatrice de glucide simple, car son rendement chimique est plus faible que celui de l'acide lactique (Paragon *et al.*, 2004). La forte présence d'acide acétique est à relativiser. Un ratio concentration en acide lactique sur concentration en acide acétique est utilisé avec un rapport visé de 3 pour 1 (Bagg, 2012).

Afin d'éviter que la concentration en acides acétiques soit trop importante face à celle en acides lactiques, des inocula bactériens peuvent être rajoutés pour favoriser la production d'acide lactique et la baisse du pH.



Graphique 4 : pH après 60 jours de fermentation de 4 ensilages de luzerne à des MS différentes, avec et sans ajout de sucre soluble (Muck et Speckhard, 1984)

## B. Les différents conservateurs

De nombreux produits peuvent être utilisés pour améliorer la conservation de l'ensilage. Chaque produit répond à un besoin spécifique en fonction des conditions de la mise en anaérobiose.

Il a été vu qu'un fourrage avec des MS différentes n'induisent pas une même valeur de pH en fermentation (cf. Graphique 4). Lorsque du sucre soluble est ajouté en début de fermentation, avec un ensilage de luzerne à moins de 55% de MS, le pH à 60 jours est plus faible (Muck, 1988). Seulement pour une MS à 60%, l'ajout de sucre augmente la valeur de pH de l'ensilage. La réponse à un ajout de sucre, n'est pas la même selon les conditions. Dans des situations avec des MS élevées, l'ajout de sucre ne permet pas d'améliorer la baisse de pH. Il est nécessaire de raisonner avec chaque additif selon les conditions de fermentation.

D'après Amyot (2003), plusieurs types de conservateur peuvent être intéressants :

- Les acides abaissent le pH par un apport massif de produit acidifiant :
  - L'acide formique permet de contrôler la fermentation dans les ensilages avec des % de MS inférieur à 25%. Il a un fort pouvoir acidifiant et inhibiteur de fermentation.
  - L'acide propionique est un fort inhibiteur de levures et de moisissures.
- Les enzymes sont utilisées pour dégrader les sucres complexes comme les fibres en sucres simples. Leurs efficacités sont très variables, car de nombreux facteurs comme type de plante, la maturité, le pH peuvent influencer leurs actions.
- Les produits sucrés, vu précédemment, sont une source d'énergie facilement accessible aux microorganismes. La production d'acide lactique est ainsi accélérée. L'objectif est d'obtenir une concentration en sucre soluble équivalente à 12% du % de MS.
- Les inocula bactériens :
  - Les bactéries à dominantes homofermentaires, comme *Lactobacillus plantarum*, accélèrent l'acidification et permettent un pH final plus bas. Seulement une quantité en sucres solubles doit être suffisante pour que l'acidification soit efficace.
  - Les bactéries à dominantes hétérofermentaires, comme *Lactobacillus buchneri*, sont productrices d'inhibiteurs de levures et moisissures amenant à une meilleure stabilité aérobie.

Les acides semblent être plus efficaces et plus utiles dans de mauvaises conditions de fermentation. Par contre les inocula bactériens sont moins coûteux tout en améliorant aussi la conservation des ensilages.

| Appréciation | pH (1) | AGV totaux     | Ac. Acét  | Ac. Buty | Azote ammoniacal (% NT) |         |        | N Soluble   |
|--------------|--------|----------------|-----------|----------|-------------------------|---------|--------|-------------|
|              |        | (mmoles/kg MS) | g / kg MS |          | Maïs                    | Luzerne | Autres | (% N total) |
| Excellent    | <4     | <330           | <20       | 0        | <5                      | <8      | <7     | <50         |
| Bon          | <4,2   | 330 – 660      | 20 -40    | <5       | 5-10                    | 8-12    | 7-10   | 50-60       |
| Médiocre     | <4,4   | 660 – 1000     | 40 -55    | >5       | 10-15                   | 12-15   | 10-15  | 60-65       |
| Mauvais      | <5     | 1000 – 1330    | 55 -75    | >5       | 15-20                   | 16-20   | 15-20  | >65         |
| Très mauvais | >5     | >1330          | >75       | >5       | >20                     | >20     | >20    | >75         |

(1) Valeurs proposées pour des ensilages dont la teneur en MS est  $\leq$  à 35 %. Si la MS est  $>$  35 %, le pH n'est plus un indicateur valide de conservation.

Tableau 3 : barème d'évaluation de la qualité de l'ensilage, INRA 1988

| % acide lactique<br>dans l'acidité totale | % acide acétique<br>dans l'acidité totale | % acide butyrique<br>dans l'acidité totale   |
|---|---|--|
| 0 – 20% = 0 pts ...<br>70 – 100% = 25 pts | 0 – 20% = 25 pts ...<br>60 – 100% = 0 pts | 0 – 0,1% = 50 pts ...<br>60 – 100% = -10 pts |

| Qualité de la<br>conservation   | % N NH <sub>3</sub> /N<br>total | Points obtenus |
|---------------------------------|---------------------------------|----------------|
| Très bonne ...<br>Très mauvaise | 0 – 5% ...<br>40 – 100%         | 60 ...<br>-10  |

| Total points<br>obtenus | Appréciation générale de<br>la réussite |
|-------------------------|---|
| 0 – 20                  | Mauvaise conservation                   |
| 20 – 40                 | Conservation médiocre                   |
| 40 – 60                 | Conservation satisfaisante              |
| 60 – 80                 | Bonne conservation                      |
| 80 – 100                | Très bonne conservation                 |

Tableau 4 : barème d'évaluation de la qualité de l'ensilage, Flieg-Vanbelle 1938



Photo 2 : grain de kéfir

(source: Chambre d'Agriculture des Pays de la Loire)

## C. Les méthodes d'évaluation de la qualité des ensilages

La variabilité de qualité d'un ensilage a amené des chercheurs à développer des techniques d'évaluation de qualité. Deux grilles d'évaluation existent, celle de l'INRA et de Flieg-Vanbelle.

Ces évaluations sont sous forme d'indicateurs à partir des résultats d'analyse de fourrage. Le premier barème est celui de l'INRA, développé en 1988 qui détermine la qualité selon des catégories d'appréciation (cf. Tableau 3). Le second est celui de Flieg-Vanbelle développé à partir de 1938 qui note la qualité de l'ensilage grâce à des points cumulés pour chaque résultat d'analyse afin d'obtenir une appréciation générale (cf. tableau 4). Ces 2 barèmes sont complémentaires, car ils n'interprètent pas les indicateurs totalement de la même manière. Par exemple, le barème INRA intègre l'indicateur pH alors que Flieg-Vanbelle intègre à la place le facteur acide lactique à la place.

Ces barèmes apportent une vision générale sur les ensilages réalisés permettant de comparer la qualité obtenue par rapport à des références. Ainsi les points d'amélioration peuvent être détectés.

## III. Le kéfir et son utilisation pour la conservation de l'ensilage

En recherchant des conservateurs peu coûteux pour l'ensilage, le kéfir semble être un produit adapté à ces besoins. Tout d'abord, une description du kéfir et de son hétérogénéité sera donnée. Ensuite le lien entre kéfir et conservation des fourrages sera expliqué.

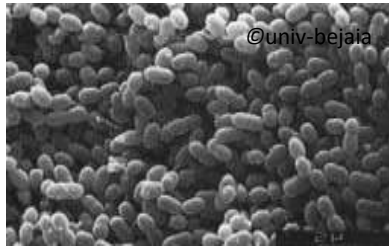
### A. Définition du kéfir

#### 1. Origine et définition réglementaire du kéfir

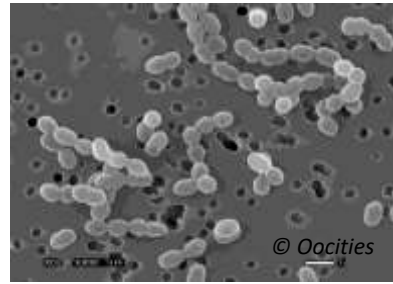
L'origine du kéfir n'est pas totalement établie. Le kéfir proviendrait de 2 zones géographique sous 2 formes différentes. Tout d'abord, c'est un kéfir de lait originaire du Caucase, fortement utilisé par les populations slaves (Zourari *et al.*, 1988) et le deuxième est un kéfir de fruits (ou de sucre) d'origine d'Amérique du sud (Pidoux, 1989). Ces 2 kéfirs ont pour origine un grain de kéfir (cf. Photo 1). Celui-ci est composé essentiellement d'un polysaccharide microbien, présentent une structure complexe.



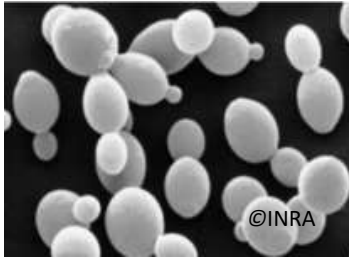
Lactobacilles  
( $1,4 \cdot 10^8$  UFC/g)



Streptocoques  
( $3,9 \cdot 10^4$  UFC/g)



Leuconostocs  
( $1,5 \cdot 10^5$  UFC/g)



Levures  
( $1,1 \cdot 10^7$  UFC/g)

**Composition type d'un kéfir à base lait**  
(grands groupes de microorganismes présents)

**Bactéries typiques :**

- Lactobacillus kefiranofaciens
- L. kefir
- L. parakefiri

(Espèces variables selon kéfir)



Bactéries acétiques  
( $4,0 \cdot 10^7$  UFC/g)

Schéma 4 : Composition type d'un kéfir de lait (Ninane et al., 2009)

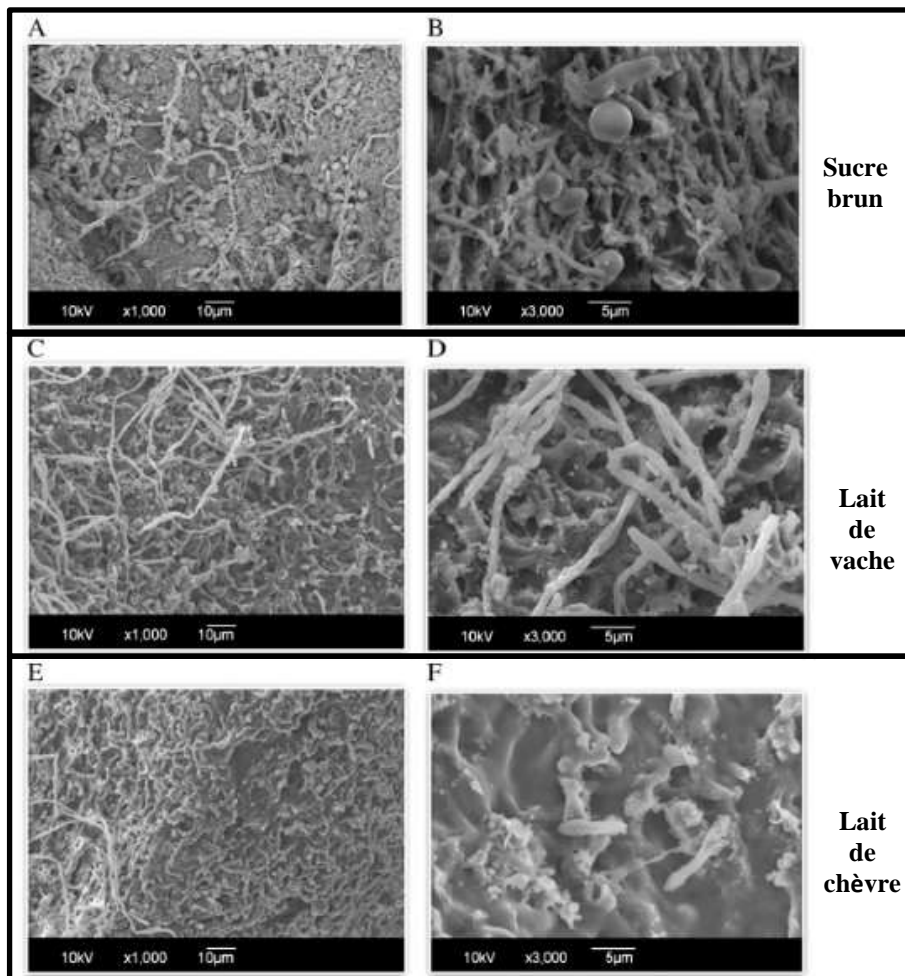


Photo 2 : Vue au microscope électronique de grains de kéfir dans différents substrats (Hsieh et al., 2012)

C'est donc une masse gélatineuse, irrégulière, de tailles variables, insoluble dans l'eau et dans la plupart des solvants. Le rôle joué par les micro-organismes, dans leur formation et leur localisation de ces derniers dans le grain, est discuté (Zourari *et al.*, 1988). Les causes de formation de novo d'un grain de kéfir ne semble pas encore établies (Ninane *et al.*, 2009).

D'après la définition du CODEX STAN 243-2003 (cf. Annexe 2) : c'est un levain préparé à partir de grain de kéfir, *Lactobacillus kefir*, espèces des genres *Leuconostocs*, *Lactococcus* et *Acetobacter*, proliférant dans une même relation étroite. Le kéfir est donc un produit liquide composé de bactéries avec une composition normée selon la même réglementation : la concentration en microorganisme minimale est de  $10^7$  UFC/g et la concentration en levures minimale est de  $10^4$  UFC/g. Comme l'a évalué Ninane *et al.* (2009), la population d'un kéfir est très diversifiée et très riche (cf. Schéma 4). Le cas présenté est un kéfir de lait, c'est-à-dire qu'il ne se développe que dans du lait.

D'après ces 2 origines distinctes du kéfir, 2 grandes familles de kéfir sont établies. Il existe le kéfir de lait, vu précédemment, et le kéfir de sucre proliférant dans l'eau avec un ajout de sucre et potentiellement d'autres produits comme des fruits.

## 2. Variabilité de la structure et de la composition du kéfir

De nombreuses recherches tentent de déterminer les facteurs qui influencent la variabilité de structures et de composition du kéfir (Garrote *et al.*, 1997 ; Koyu et Demirel, 2018). Tous les facteurs ne sont pas encore étudiés.

Le premier facteur le plus évident est le substrat. Il influence la flore microbienne du kéfir comme la montrer Hsieh *et al.* (2012). Il compare la composition et la structure des grains de kéfir dans 3 milieux différents : eau et sucre, lait de vache et lait de chèvre. Lorsque le substrat est à base de sucre, de nombreuses levures sont présentes à la surface du grain (cf. Photo 2). Les substrats à base de lait induisent des grains de kéfir plus petit avec plus de bactéries et d'exopolysaccharides sur leurs surfaces. Les grains de kéfir en fermentation avec du lait de vache ont plus de Pseudomycélium que les grains en fermentation avec du lait de chèvre (cf. Tableau 5, page suivante). Hecer *et al.* (2018) montre aussi que les conditions de fermentation influencent aussi la flore du kéfir. Des *Saccharomyces cerevisiae* et des bactéries *Kocuria* étaient détectées pour des fermentations à 4°C alors qu'elles n'étaient pas détectées pour des fermentations entre 20 et 30°C.



| Strains                                 | % (Identified number/total isolates) |              |              |
|---|--------------------------------------|--------------|--------------|
|   | Brown sugar                          | Cow's milk   | Goat's milk  |
| MRS                                     |                                      |              |              |
| LAB counts (log cfu/g)                  | 7.26 ± 0.03                          | 8.10 ± 0.01  | 9.19 ± 0.02  |
| <i>Leuconostoc mesenteroides</i>        | 62 (73/118)                          | 6 (7/120)    | 5 (6/112)    |
| <i>Lactobacillus mali</i>               | 14 (17/118)                          | -            | -            |
| <i>Lactobacillus hordeï</i>             | 24 (28/118)                          | -            | -            |
| <i>Enterococcus faecalis</i>            | -                                    | 3 (4/120)    | 2 (2/112)    |
| <i>Lactococcus lactis</i>               | -                                    | 88 (105/120) | 92 (103/112) |
| <i>Bifidobacterium psychraerophilum</i> | -                                    | 3 (4/120)    | 1 (1/112)    |
| PDA (log cfu/g)                         |                                      |              |              |
| Yeast counts                            | 5.84 ± 0.07                          | 5.12 ± 0.07  | 5.24 ± 0.06  |
| <i>Zygosaccharomyces fermentati</i>     | 7 (9/132)                            | 4 (5/120)    | 2 (2/120)    |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i>         | 85 (112/132)                         | 67 (80/120)  | 66 (79/120)  |
| <i>Dekkera bruxellensis</i>             | 8 (11/132)                           | 14 (17/120)  | 2 (2/120)    |
| <i>Pichia fermentans</i>                | -                                    | 15 (18/120)  | 30 (37/120)  |

Tableau 5 : Effet des fermentations sur différents substrats de grains kéfir (Hsieh et al., 2012)



Photo 2 : produit Défi'flor® (source: Solu'Nature)



Les conditions de fermentation comme le type de substrat ou la température sont des facteurs induisant une forte variabilité de la structure des grains de kéfir et de la composition du kéfir.

### 3. Les différentes formes de kéfir

La forme d'origine du kéfir est le grain de kéfir. Il existe 2 autres produits aussi appelés kéfir : le produit obtenu après fermentation des grains et les kéfirs commerciaux.

D'après la définition du CODEX STAN 243-2003, le produit obtenu après fermentation des grains de kéfir est aussi un kéfir. Sa composition n'est pas définie, car la description des microorganismes, contenus dans le grain et en suspension dans la phase liquide n'est pas assez exhaustive. La commercialisation de ce produit n'est pas possible.

Ainsi, la standardisation du kéfir est nécessaire afin de connaître précisément sa composition. Des kéfirs commerciaux avec une composition établie existent, comme le kéfir Défi'flor® vendu par Solunature® (cf. photo 2). Il contient 18 souches de bactéries et de levures définies, qui ont suivi une phase de fermentation. La composition de ce produit à l'achat est définie, seulement, une fois mis en fermentation le kéfir va s'éloigner de sa composition initiale en s'adaptant à son nouveau milieu de développement. Il existe donc une diversité de kéfir, comme il existe une diversité d'environnement de développements possibles.

Pour le kéfir servant d'inoculum pour l'ensilage, seul le kéfir à base d'eau et de sucre est utilisé. Des agricultures ont essayé l'inoculation avec du kéfir de lait, seulement l'ensilage serait devenu inconsommable par les ruminants. Mais aucune recherche n'a été effectuée pour objectiver ces observations.

## B. Kéfir et conservation de l'ensilage

### 1. Le kéfir et ses potentiels effets sur l'ensilage

Le kéfir est un assemblage de Bactéries et de levures vivant en symbiose. Ainsi il est possible de segmenter le kéfir en 2 sous-produits : un inoculum bactérien et un inoculum de levures.

Concernant l'inoculum de levures, cette pratique ne se retrouve pas dans la bibliographie, car l'objectif d'un ensilage est de favoriser la fermentation bactérienne lactique pour inhiber ou tuer les levures et les moisissures présentes pour éviter de dégrader trop fortement la matière (Paragon *et al.*, 2004).

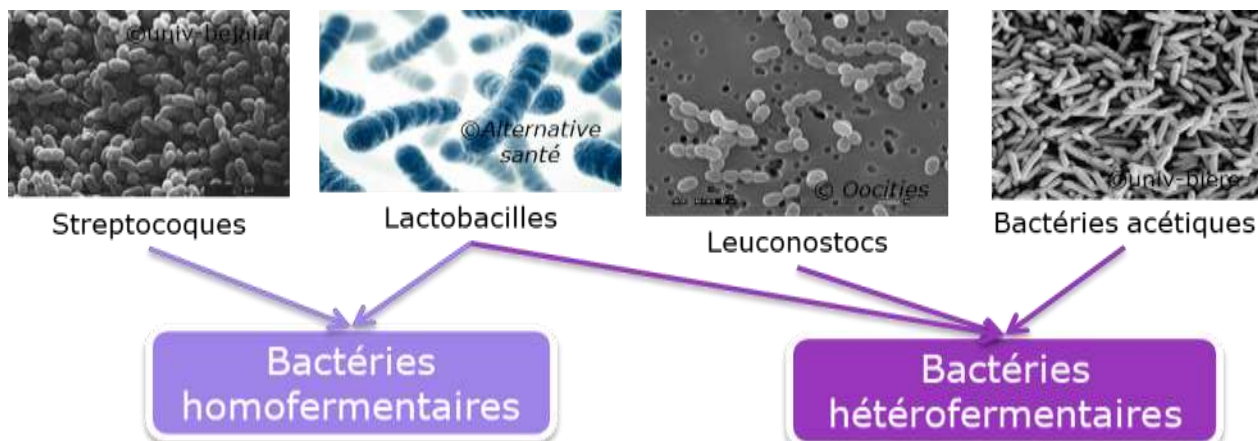


Schéma 5 : Composition d'un kéfir selon les groupes de bactéries utiles à l'ensilage (Ninane et al., 2009)

| Paramètres         | Au global           | Homofermentaire | Hétérofermentaire |
|--------------------|---------------------|-----------------|-------------------|
| pH                 | +++<br>(3,82->3,86) | -               | +++               |
| MS                 | -                   | ∅               | ∅                 |
| Perte MS           | ∅                   | ∅               | --                |
| NDF                | ∅                   | ∅               | ∅                 |
| ADF                | ---                 | ∅               | ∅                 |
| NH <sub>3</sub> -N | ---                 | ---             | ∅                 |
| MAT                | ∅                   | ∅               | ∅                 |
| WSC                | ---                 | --              | ---               |
| Ethanol            | +                   | ++              | +++               |
| Lactate            | ∅                   | ++              | ---               |
| Acetate            | +++                 | -               | +++               |
| Propionate         | +++                 | ∅               | +++               |
| Butyrate           | ∅                   | ∅               | -                 |
| Bact. lactiques    | +++                 | +++             | +++               |
| Levures            | ---                 | ++              | ---               |
| Moisissures        | ---                 | ---             | ---               |
| Stabilité aérobie  | +++                 | ∅               | +++               |

**Méta-analyse sur  
276  
expérimentations  
pour des inocula  
homo- et  
hétérofermentaire  
(ensilage de maïs)**

| Symbole | Significativité |
|---------|-----------------|
| ∅       | >10%            |
| +       | <10%            |
| ++      | < 5%            |
| +++     | <0,1%           |

Tableau 6 : Résultats méta-analyse de types d'inoculum sur de l'ensilage de maïs (Blajman,

### Expérimentation : effet d'inocula bactérien (ensilage d'herbe)

| Bactéries homofermentaires inoculées   | Lactobacillus plantarum   | Lactobacillus fermentum | Enterococcus faecium |
|--|---|-------------------------|----------------------|
| Effet significatif sur la conservation | ↓pH<br>↑[acide lactique] et [acide acétique]<br>↑%MS<br>↓NDF et ADF |                         |                      |

Tableau 7 : Résultats expérimentation inoculum bactéries homofermentaires (Jalc et al., 2009)

L'ensilage avec une fermentation bactérienne bénéfique n'est pas un milieu favorable au développement de levures. Ainsi l'apport de levures dans l'ensilage ne semblerait pas induire une concentration en levures importante pouvant impacter la conservation et la composition de l'ensilage.

Le reste de la recherche bibliographique portera sur la partie inoculum bactérien. Dans un kéfir les espèces et les familles de bactéries sont très diversifiées. En reprenant les grandes familles de bactéries contenues dans le kéfir (cf. Schéma 5), elles peuvent être classées selon les 2 grands groupes utilisés pour caractériser la fermentation de l'ensilage :

- Les bactéries homofermentaires : les Streptocoques et une partie des Lactobacilles (exemple : *Lactobacillus plantarum*, *L. kefirii*...)
- Les bactéries hétérofermentaires : les Leuconostocs, les bactéries acétiques et une partie des lactobacilles (exemple : *Lactobacillus buchneri*, *L. brevis*...)

L'inoculation par du kéfir peut alors être découpée selon les 2 grandes familles de bactéries responsables de la fermentation et de la qualité de l'ensilage.

## 2. Les différents inocula de bactéries améliorant la qualité des ensilages

De nombreuses expérimentations ont essayé de montrer les effets des inocula bactériens sur la composition et la fermentation de l'ensilage, comme le montre une grande méta-analyse de 276 expérimentations sur l'inoculation d'ensilage de maïs comparant et associant les 2 groupes bactériens, homofermentaires et hétérofermentaire (Blajman *et al.*, 2018). De nombreux effets sont visibles sur plusieurs variables de conservation du fourrage (cf. Tableau 6). Il est intéressant de remarquer que les effets d'inoculum sur les 2 grandes groupes bactériens, ne sont pas les mêmes que lorsqu'ils sont pris séparément. Ces résultats ne seront pas plus détaillés ici, car l'étude bibliographique se concentre en priorité sur l'ensilage d'herbe qui sera utilisé pour l'expérimentation.

Lors de recherche sur de l'ensilage d'herbe, Jalc *et al.* (2009) a testé 3 souches bactériennes homofermentaires : *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum* et *Enterococcus faecium* (cf. Tableau 7). Les résultats ont permis de montrer qu'il n'y a pas de différence d'effet sur les variables étudiées entre ces 3 espèces, mais que l'effet inoculum favorise l'activité fermentaire à travers la production d'acide permettant une diminution du pH. Cet accroissement d'activité bactérienne a engendré une baisse des valeurs alimentaires du fourrage (NDF et ADF).

**Méta-analyse sur 20-30 expérimentations d'inoculum  
Lactobacillus buchneri (ensilage d'herbe)**

| <b>Bactérie hétérofermentaire<br/>inoculée</b>    | Lactobacillus buchneri<br>(à différentes concentrations)   |
|---|--|
| <b>Effet significatif<br/>sur la conservation</b> | <p align="center">           ↑pH<br/>           ↓[acide lactique]<br/>           ↑[acide acétique] et [acide propionique]<br/>           ↑[éthanol] et stabilité aérobie<br/>           ↓WSC et [levures]         </p> |

*Tableau 8 : Résultats méta-analyse inoculum bact. hétérofermentaires (Kleinschmit et Kung, 2006)*

Concernant les bactéries hétérofermentaires, une méta-analyse regroupe entre 20 à 30 expérimentations menées sur de l'ensilage d'herbe avec l'ajout de *Lactobacillus buchneri* (Kleinschmit et Kung, 2006). Cette étude (cf. Tableau 8) permet d'observer un accroissement d'activités hétérofermentaires par une production d'acide acétique et d'éthanol. Puis une consommation d'acide lactique est observée, ce qui engendre un pH plus élevé. Tout comme pour les inocula de bactéries homofermentaires, leur activité amène une baisse de valeur alimentaire, expliqué par une consommation de sucre (WSC). Enfin les concentrations de *L. buchneri* inoculées allaient de moins de  $10^5$  UFC/g MF à plus de  $10^5$  UFC/g MF sans que celles-ci modifient les effets de composition et de fermentation de l'ensilage d'herbe.

Le choix entre l'ensilage de maïs et l'ensilage d'herbe pour l'expérimentation se justifie par le fait que des effets liés aux d'inocula bactériens soient plus fréquemment observables sur la composition et la fermentation de l'ensilage d'herbe par rapport à ceux de l'ensilage de maïs. Par exemple, pour des ensilages d'herbe inoculés avec des bactéries homofermentaires, des variations s'opèrent sur le % de MS, la concentration en acides acétiques, la NDF et l'ADF (Jalc *et al.*, 2009). Alors que cela n'est pas le cas pour des ensilages de maïs inoculés (Blajman *et al.*, 2018). L'ensilage d'herbe a été considéré comme plus instable avec une qualité plus variable.

### 3. Le kéfir, un inoculum bactérien pour l'ensilage

La pratique d'inoculation de kéfir dans l'ensilage n'existe pas dans les écrits scientifiques. En supposant que le kéfir soit un inoculum bactérien améliorant la qualité de l'ensilage, une estimation à partir des données bibliographiques est donc effectuée.

Bolsen (1996) indique une concentration en bactéries issues de l'inoculum de  $10^5$  UFC/g MF d'ensilage pour obtenir une amélioration de l'ensilage par cet inoculum. D'après Miguel *et al.* (2011) un kéfir sucre contient en moyenne  $10^8$  UFC/g de bactéries. En estimant une incorporation de 100L de kéfir à  $10^8$  UFC/g pour 60t MF (recommandation du Dr Gilles Grosmond lors de ses formations), la dilution finale donne une valeur de  $1,6 \cdot 10^5$  UFC/g de MF de fourrage. L'estimation de la concentration en bactéries apportée grâce au kéfir est proche de la concentration recommandée par Bolsen (1996) et Amyot (2003).

Le kéfir étant composé de beaucoup de bactéries, il peut être considéré et utilisé comme un inoculum bactérien. Une amélioration de la qualité de l'ensilage par une inoculation de kéfir semble possible.

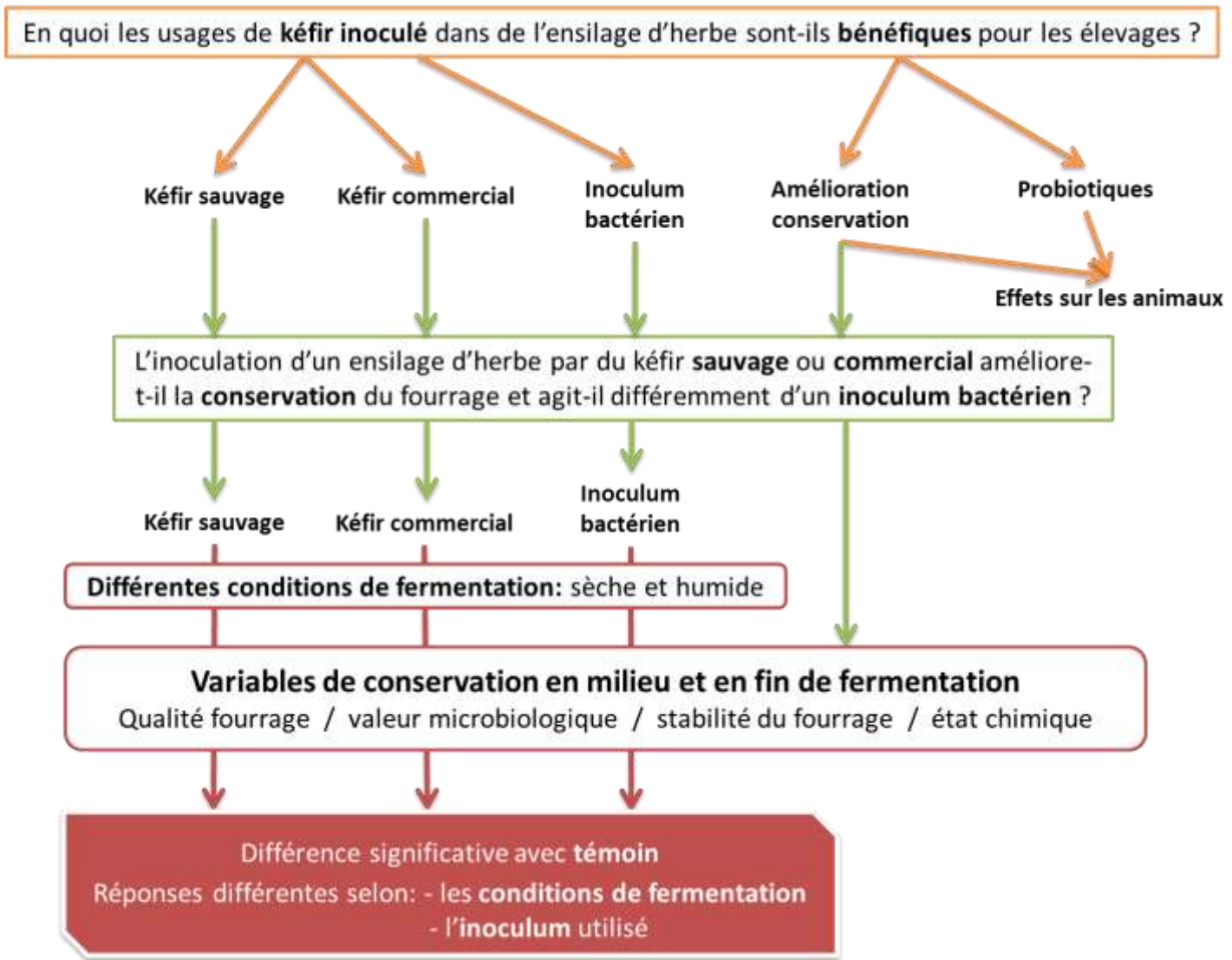


Schéma 6 : Schéma de la démarche de la problématique aux résultats attendus

## IV. Problématique

Les microorganismes jouent un rôle central dans le processus d'élaboration de l'ensilage. Les bactéries homofermentaires sont essentielles pour la fermentation et la conservation de l'ensilage. Les bactéries hétérofermentaires permettent une stabilisation aérobie de l'ensilage, mais leurs activités ne doivent pas être supérieures aux homofermentaires. De nombreux facteurs peuvent être responsables d'une forte variabilité de l'ensilage. Ainsi, l'utilisation de conservateur peut être utile pour maintenir sa qualité. Le kéfir peut s'apparenter à un inoculum bactérien. Celui-ci semble pouvoir être bénéfique à la composition, à la fermentation et à la conservation de l'ensilage grâce à sa population de bactéries diversifiées.

Afin de comprendre le mécanisme et d'observer l'action d'un inoculum de kéfir dans de l'ensilage, la chambre d'agriculture s'est tournée vers l'expérimentation de différents types d'inoculum dans de l'ensilage d'herbe. Elle cherche à savoir si les usages de kéfir inoculé dans de l'ensilage d'herbe sont bénéfiques pour les élevages ? Seulement cette question ne pose pas le cadre de l'expérimentation, car elle ne va pas regarder tous les effets bénéfiques possibles des inocula de kéfir dans l'ensilage sur les élevages. Les effets sur les animaux ne sont pas étudiés, l'expérimentation ne regarde que les effets des inocula sur la conservation de l'ensilage d'herbe. Il existe 2 types de kéfir différents, le premier est un kéfir dit « sauvage », car c'est un kéfir autoproduit par l'exploitant. Sa composition est alors indéterminée. Des kéfirs commerciaux existent aussi, où leur composition est déterminée dans des proportions connues. Un inoculum bactérien commercial a été rajouté pour permettre une comparaison avec un produit standard conçu pour améliorer la conservation du fourrage. Ceci permettra d'ajuster les interprétations de l'effet kéfir sur la conservation. La question peut être reformulée de cette façon : L'inoculation d'un ensilage d'herbe par du kéfir sauvage ou commercial améliore-t-il la conservation du fourrage et agit-il différemment qu'un inoculum bactérien ? (cf. Schéma 6)

Il est possible de former des hypothèses sur les résultats espérés. Tout d'abord une meilleure fermentation est permise par les inocula grâce à une plus rapide et plus forte acidification de l'ensilage d'herbe. Ensuite, les inocula amènent une meilleure conservation de la qualité de l'ensilage. Enfin, grâce aux inocula, la stabilité aérobie de l'ensilage est meilleure.

L'objectif est double : observer une différence entre les ensilages inoculés et les ensilages non inoculés, et d'observer peu de différence entre les différentes sortes inocula. Ceci permettrait par la suite de les distinguer par leurs coûts. C'est autour de ces hypothèses que l'expérimentation a pu être réfléchi et mise en place.

| Facteur matière sèche | Répétitions   | Facteur Inoculum  |                       |                  |                   | Type d'analyse        |
|-----------------------|---------------|-------------------|-----------------------|------------------|-------------------|-----------------------|
|                       |               | Témoin (eau seul) | Kéfir sauvage (grain) | Kéfir Défi'flor® | Inoculum Pioneer® |                       |
| Ensilage à 25 % MS    | 3 répétitions |                   |                       |                  |                   | Analyse à 8 jours     |
|                       |               |                   |                       |                  |                   |                       |
|                       |               |                   |                       |                  |                   |                       |
|                       | 3 répétitions |                   |                       |                  |                   | Analyse à 10 semaines |
|                       |               |                   |                       |                  |                   |                       |
|                       |               |                   |                       |                  |                   |                       |
| Ensilage à 40 % MS    | 3 répétitions |                   |                       |                  |                   | Analyse à 8 jours     |
|                       |               |                   |                       |                  |                   |                       |
|                       |               |                   |                       |                  |                   |                       |
|                       | 3 répétitions |                   |                       |                  |                   | Analyse à 10 semaines |
|                       |               |                   |                       |                  |                   |                       |
|                       |               |                   |                       |                  |                   |                       |

Tableau 9 : plan expérimental de l'essai ensilage

### Itinéraire technique (parcelle « les Epinois »)

|          |            |          |          |                |          |          |
|----------|------------|----------|----------|----------------|----------|----------|
| ensilage | déchaumage | semis    | roulage  | fertilisation  | fauche   | ensilage |
| 24/08/18 | 29/08/18   | 30/08/18 | 31/08/18 | (33%N à 115kg) | 17/04/19 | 19/04/19 |
|          |            |          |          | 25/02/19       |          |          |

Schéma 7 : Itinéraire technique de la parcelle servant à l'expérimentation



## V. Matériel et méthodes

L'objectif de cette expérimentation est d'étudier 3 facteurs : celui du type d'inoculum utilisé (4 modalités), celui du taux de matière sèche de l'ensilage d'herbe avant fermentation (2 modalités) et celui du temps de fermentation (2 modalités).

### A. Le dispositif expérimental mis en place

#### 1. Le plan expérimental

Le facteur inoculum se découpe 4 modalités : un kéfir commercial Défi'flor®, un kéfir « sauvage » à base de grain, un inoculum bactérien Pionner® et un témoin (cf. Tableau 9). Afin de garantir une loi de réponse avec un spectre plus large sur des types d'ensilage d'herbe possibles, 2 conditions de fermentation sont testées sur 2 taux de matière sèche de l'ensilage : un ensilage à 25% de MS et un ensilage à 40% de MS. Le dernier facteur étudié est le temps de fermentation avec 2 modalités : un ensilage après 8 jours de fermentation, et un ensilage après 10 semaines de fermentation. L'intérêt de ces 2 analyses est d'observer l'ensilage à 2 moments différents : à 8 jours en fin de fermentation et à 10 semaines lorsque l'ensilage est stabilisé pour observer sa capacité de conservation. 3 répétitions ont été effectuées pour augmenter la précision des résultats. Enfin les variables étudiées sont les résultats d'analyse faites en laboratoire où la qualité du fourrage, sa valeur microbiologique et l'état chimique seront étudiés.

#### 2. Le fourrage expérimental

Les caractéristiques de la culture avant la fauche, ainsi que le mode opératoire sont importants à décrire, car ils sont source de variabilité (cf. II.A.2.).

Concernant l'ensilage utilisé pour l'expérimentation, les échantillons ont été collectés sur une parcelle de prairie temporaire implantée en Ray Grass italien, Trèfle incarnat et diverses légumineuses (cf. Annexe 3). Le précédent en 2018 était du maïs ensilage (cf. Schéma 7) libérant la parcelle à partir du 24 août. L'implantation de la nouvelle culture s'est faite rapidement après, permettant à la prairie de se développer pendant 230 jours avant la première fauche. La végétation au moment de la fauche, le 17 avril 2019, était au stade 'épi à 10 cm' (avant le stade 'épiaison'). La fauche a été réalisée à l'aide d'une faucheuse à plat pour l'ensemble de la parcelle.

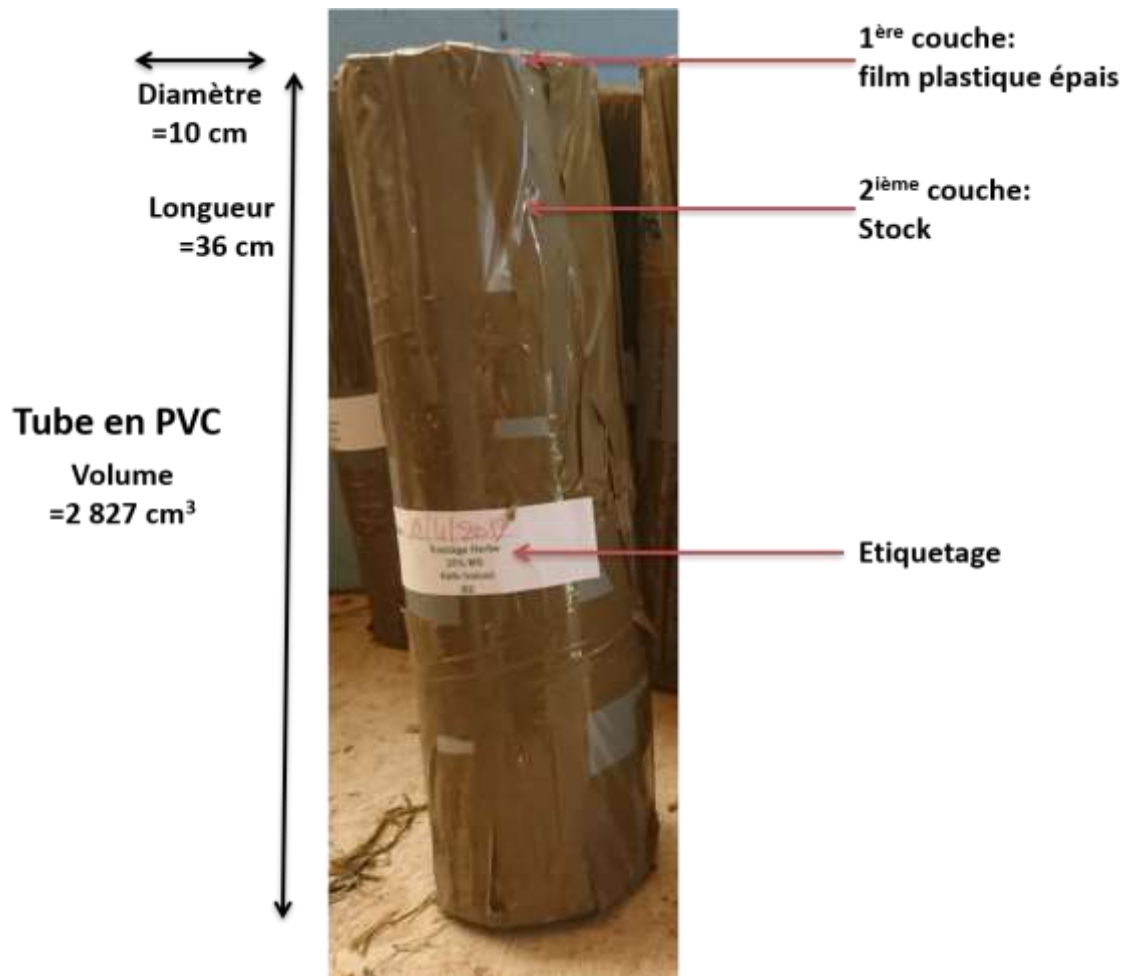


Schéma 8 : Mini-silo, méthode en tube PVC adaptée

Afin d'obtenir un échantillonnage le plus homogène possible un seul andain de fauche a été pris pour l'essai dans une zone qui semblait être la plus homogène possible. L'un des objectifs de l'essai était de tester 2 modalités de matière sèche de fourrage, une à 25% de MS et une autre à 40% de MS. Ainsi l'herbe coupé sur l'andain sélectionné a été étalée et homogénéisée à la main à l'aide d'une fourche pour permettre un séchage le plus homogène possible. Un relevé de matière sèche par la méthode micro-ondes (cf. Annexes 4) a été effectué plusieurs fois par jour pour évaluer son évolution et collecter les échantillons au moment où le fourrage était à 25%MS et à 40%MS.

### 3. La fermentation en mini-silo

Une fois la bonne teneur en matière sèche obtenue les échantillons sont collectés, le 18 avril pour la modalité 25%MS et le 19 avril pour la modalité 40%MS. Ils sont ensuite broyés à l'aide d'une tondeuse, un échantillon en vert est collecté (un par modalité de matière sèche) qui servira à la description de l'ensilage avant le début de la fermentation. Le reste de l'herbe collecté est placé dans 4 bassines, une par modalité d'inoculum. 10kg de fourrage sont placés dans chacune d'elles et l'inoculum est incorporé. Le tout est homogénéisé et placé dans des mini-silos, conçus par l'entreprise Pioneer® et adaptés par la ferme expérimentale (cf. Schéma 8). Les 4 inocula testés pour l'expérimentation sont :

- Un inoculum bactérien commercial Pioneer® (cf. Annexe 5). Sa composition exacte n'est pas connue, car c'est un échantillon que l'entreprise Pioneer a fourni pour l'essai. La dilution préconisée par l'entreprise est de 1g pour 1t de Matière Fraîche (MF).
- Un kéfir commercial Défi'flor® (cf. Annexe 6). Ce kéfir peut être utilisé de multiples façons par exemple comme complément alimentaire ou en inoculum d'ensilage. La dilution préconisée par l'entreprise est de 3,3mL pour 1 t MF.
- Un kéfir sauvage autoproduit à partir de grain de kéfir cultivé chez un agriculteur. La méthode appliquée à la multiplication de ce kéfir pour l'essai était de mettre 100g de grain de kéfir dans 1L d'eau non chlorée ou d'eau tirée de la veille (pour que le chlore s'évapore) avec 40g de sucre). Le tout est laissé fermenté pendant 2 jours dans une pièce avoisinant les 20°C. La recommandation est d'incorporer 1,7L dans 1 t MF (à l'origine la recommandation pour les agriculteurs utilisateurs est de 100L de kéfir pour 60 t MF).
- Un témoin. De l'eau est ajouté pour éviter un écart trop important de MS afin de limiter les biais. L'ajout d'eau s'est fait à 1L d'eau pour 1tMF.

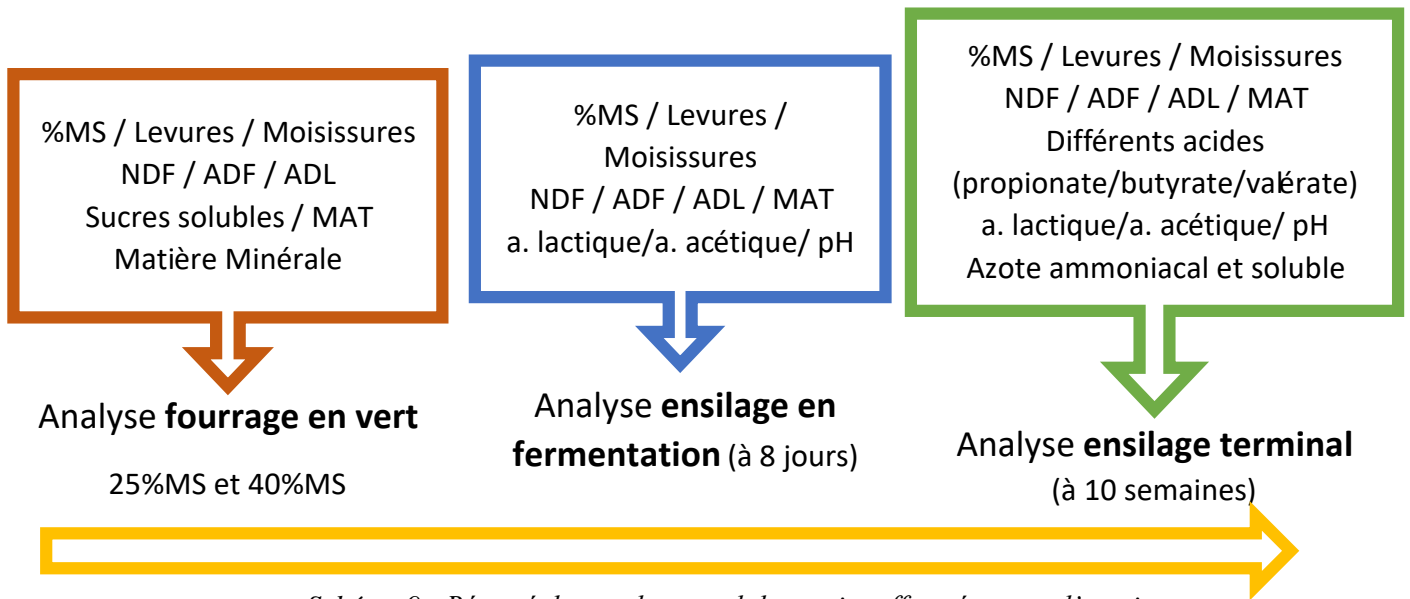


Schéma 9 : Résumé des analyses en laboratoire effectuées pour l'essai

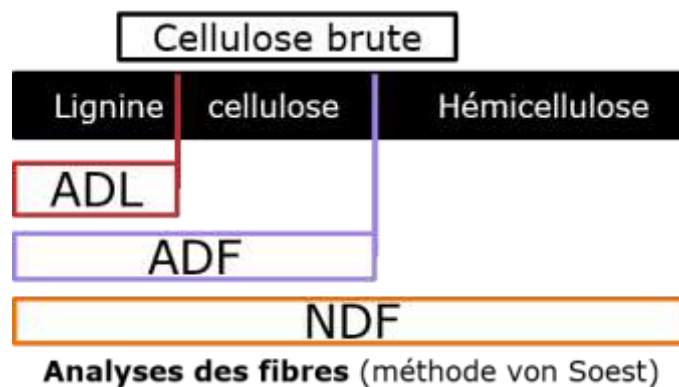


Schéma 10 : Les constituants pariétaux selon Van Soest

Toutes les recommandations d'incorporation ont été faites par rapport à 1L d'eau (sauf pour le kéfir sauvage) : 1g de pioneer® dans 1L d'eau et 3,3ml de défi'flor® dans 1L d'eau. Ainsi 10mL de 'solution pioneer', 'solution défi'flor' et 'eau seul' ont été ajoutées dans leurs bassines respectives contenant 10kg de MF. Concernant le kéfir sauvage, 17mL du produit fermenté par les grains de kéfir sont incorporés dans 10kg MF.

Pour chaque modalité d'inoculum, 6 répétitions ont été effectuées. 3 échantillons vont servir pour une analyse à 8 jours de fermentation et les 3 autres pour une analyse à 10 semaines de fermentation. Une fois les mini-silos ouverts, le contenu du mini-silo est homogénéisé, un échantillon est alors collecté. Tous les échantillons ont été stockés au congélateur en attendant que tous les mini-silos soient ouverts et qu'ils soient emmenés au laboratoire d'analyse.

## B. Les analyses fourragères effectuées

Lors de l'expérimentation, 3 analyses ont été effectuées à 3 moments différents, la première avant le début de la fermentation, la deuxième à 8 jours en fin de fermentation et à 10 semaines de fermentation après la stabilisation de l'ensilage (cf. Schéma 9).

### 1. Analyse de l'ensilage avant fermentation

L'analyse du fourrage avant le début de la fermentation a pour objectif de caractériser le fourrage utilisé. Il regroupe tout d'abord une analyse de la valeur fourragère, c'est-à-dire l'analyse des constituants pariétaux selon Van Soest (NDF/ADL/ADF) (cf. Schéma 10), une analyse de la MAT (matière azotée totale) ainsi que la matière sèche (80°C pendant 48 heures). Ces premières analyses permettent d'évaluer la qualité de l'ensilage. Ensuite une analyse des valeurs microbiologiques a permis d'étudier la concentration en levures et moisissures initiales du fourrage.

Une analyse sur la concentration en sucres solubles totaux a été faite, car ces sucres solubles sont la première source d'énergie des bactéries permettant un abaissement du pH rapide par une production d'acides. Enfin comme pour beaucoup d'analyse fourrage, la concentration en matière minérale est mesurée. Cela permet de mesurer la présence de terre dans le fourrage pouvant être néfaste lors de la fermentation, et de comparer des fourrages de différentes origines entre eux. La densité des mini-silos a été mesurée à partir du poids en MF de 2 échantillons par modalités de matière sèche pris au hasard. Le calcul sera :  $\frac{\text{poidsMF} \times \% \text{MSmesuré}}{\text{volume mini-silo}}$ . Le volume du mini-silo est de 2,8L (cf. Schéma 8, page 16).

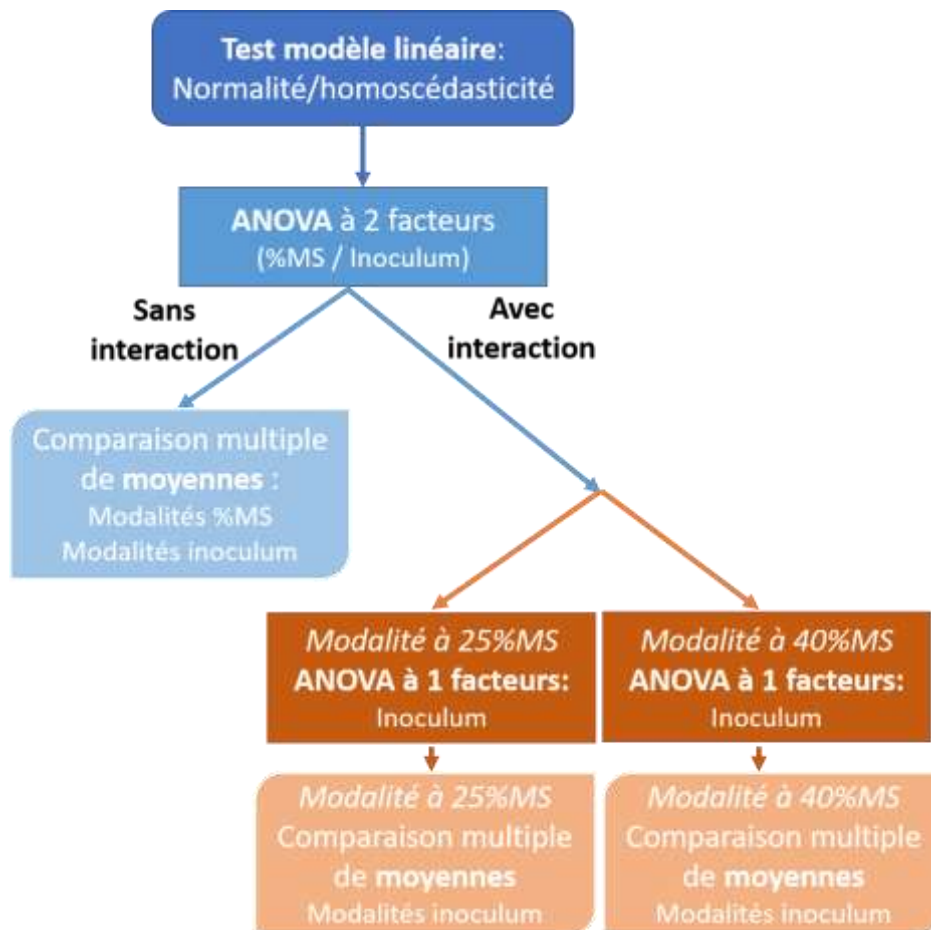


Schéma 11 : méthode d'analyse statistiques utilisée

## 2. L'analyse de l'ensilage en fin de fermentation

L'analyse du fourrage en fin de fermentation regroupe, comme pour l'analyse en vert, les analyses sur la qualité du fourrage (NDF/ADF/ADL/MAT/MS) et la valeur microbiologique ([levures]/[moisissures]).

De nouvelles analyses sont effectuées sur l'état chimique de l'ensilage avec la concentration en acide lactique et en acide acétique permettant d'évaluer l'activité des bactéries homofermentaires et hétérofermentaires. Le pH est aussi mesuré pour observer les éventuels effets tampon du fourrage.

## 3. L'analyse de l'ensilage en fin de fermentation

La dernière analyse sur l'ensilage en fin de stabilisation reprend les mêmes analyses que pour le fourrage en fin de fermentation et la complète avec la caractérisation des différents acides présents, ainsi qu'avec les analyses sur la caractérisation de la MAT. Des analyses sur la concentration en acides propioniques produits par les bactéries hétérofermentaires, et la concentration en acides butyrates et valérates produits par des bactéries pouvant être pathogènes, ont été analysées. L'azote soluble et ammoniacal résultant de la dégradation de l'azote protéique par les microorganismes. Un calcul supplémentaire sera effectué sur le ratio de concentration en acides lactiques sur la concentration en acides acétiques (Bagg, 2012).

## C. Les méthodes d'analyses des résultats

La première phase d'analyse s'est d'abord tournée vers l'analyse de l'ensilage à t0 afin de caractériser le futur ensilage. Les modalités 25% de MS et 40% de MS vont être comparées par rapport à leurs résultats d'analyses fourragères.

La deuxième série d'analyse se fait sur les échantillons issus de l'ensilage en fin de fermentation (à 8 jours) et de l'ensilage stabilisé (à 10 semaines). Les analyses statistiques sont les mêmes pour ces 2 groupes et se composent principalement, pour chaque variable étudiée, des tests de validation pour l'utilisation d'un modèle linéaire (normalité et homoscedasticité) puis d'une ANOVA et d'une comparaison multiple de moyennes. Ces différentes analyses ont été effectuées via l'outil statistique Rstudio. La méthode suivie pour l'analyse des résultats suit un même schéma (cf. Schéma 11).

Tout d'abord, des tests sur les hypothèses du modèle linéaire sont effectués par la normalité et de l'homoscedasticité des résidus.





Dans les situations où les hypothèses ne sont pas validées, une transformation de la variable ou la suppression d'une valeur aberrante selon la distance de Cook seront testées.

Ensuite un modèle d'ANOVA à 2 facteurs (%MS et inoculum) est mis en place pour tester l'interaction entre les 2 facteurs : S'il n'y a pas d'interaction entre les 2 facteurs, une analyse de comparaison multiple de moyennes est effectuée. Sinon une interaction existe, les données sont alors coupées en 2 : un échantillon pour les ensilages à 25% de MS et un échantillon pour les ensilages à 40% de MS. Une ANOVA à un seul facteur est ensuite effectuée, si le résultat sort significatif, une comparaison de moyenne peut donc être mis en place. En conclusion, plusieurs résultats par variable peuvent alors être obtenus :

- La variable ne peut pas expliquer les facteurs étudiés.
- Il existe 2 lois de réponse du facteur inoculum sur les 2 modalités %MS.
- Une même loi de réponse du facteur inoculum existe pour les 2 modalités %MS.

La dernière phase d'analyse comprendra 2 analyses : une sur la comparaison entre l'ensilage à 8 jours et l'ensilage à 10 semaines de fermentation et l'autre sur l'évaluation de l'ensilage grâce à des barèmes de référence.

La comparaison entre les valeurs obtenues sur l'ensilage en fin de fermentation (à 8 jours) et sur l'ensilage stabilisé (10 semaines) a permis d'observer si une variation significative pour chaque variable existait. Le test utilisé est tout d'abord un test de Fisher d'égalité des variances puis d'un test de Student de comparaison de moyenne pour des valeurs appariées, car l'échantillon d'herbe utilisé pour les 2 modalités à 8 jours et à 10 semaines, est le même. Ces résultats permettront de caractériser les variables influençant la période de stabilisation entre 8 jours et 10 semaines.

Afin de pouvoir évaluer le plus justement possible les ensilages obtenus et de les comparer avec les résultats en élevage, les valeurs obtenues pour chaque groupe d'inoculum et de %MS, vont être soumises à des barèmes d'évaluation d'ensilage de référence INRA et Flieg-Vanbelle (cf. Tableau 4 et 5, Page 9).

La démarche est maintenant posée, les données sont issues des résultats d'analyse du laboratoire INOVALYS à Nantes. Elles proviennent d'un fichier Excel édité par le laboratoire, elles ont été ensuite mises en forme sur Excel et R pour pouvoir les analyser.

| Valeurs (en g/kgMS)                              | Fourrage expérimental 25%MS        | Fourrage expérimental 40%MS        |
|--|------------------------------------|------------------------------------|
| Moyenne <b>Matière sèche</b> (en %)              | <b>28,5</b>                        | <b>43,4</b>                        |
| Moyenne <b>NDF</b> (en g/kg)                     | <b>314,2</b>                       | <b>294,8</b>                       |
| Moyenne <b>ADF</b> (en g/kg)                     | <b>230,2</b>                       | <b>215,2</b>                       |
| Moyenne <b>ADL</b> (en g/kg)                     | <b>9,6</b>                         | <b>8,9</b>                         |
| Moyenne <b>MAT</b> (en g/kg)                     | <b>108,3</b>                       | <b>105,3</b>                       |
| Moyenne [ <b>matière minérale</b> ] (en g/kg)    | <b>83</b>                          | <b>81,8</b>                        |
| Moyenne [ <b>Sucres solubles</b> ] (en g/kg)     | <b>271</b>                         | <b>268</b>                         |
| Moyenne [ <b>Levures</b> ] en UFC/g              | <b><math>3,6 \cdot 10^5</math></b> | <b><math>3,6 \cdot 10^5</math></b> |
| Moyenne [ <b>moisissures</b> ] en UFC/g          | <b><math>4,0 \cdot 10^2</math></b> | <b><math>4,0 \cdot 10^2</math></b> |
| Densité des mini-silos (en kgMS/m <sup>3</sup> ) | <b>150</b>                         | <b>180</b>                         |

Tableau 10 : analyse des 2 ensilages 25%MS et 40%MS à t<sub>0</sub>, avant fermentation

## VI. Résultats

Pour l'ensemble des analyses statistiques, un risque  $\alpha$  de 5% sera utilisé pour valider les hypothèses choisies.

### A. Ensilage à t0, avant fermentation en mini-silo

Les résultats des analyses du laboratoire pour l'ensilage t0 sont sur le tableau 10. L'objectif de l'expérimentation était d'obtenir 2 types d'ensilages, un plus humide à 25% de MS et l'autre plus sec à 40% de MS. L'ensilage à t0 avec la modalité 25% de MS a un pourcentage de matière sèche de 28,5% et pour l'ensilage à t0 avec la modalité 40% de MS, un pourcentage de matière sèche de 43,4%MS. Lors de l'expérimentation le fourrage récolté était légèrement plus sec.

La concentration en constituants pariétaux (NDF, ADF et ADL) est plus importante dans l'ensilage t0 à 25% de MS que l'ensilage t0 à 40% de MS. La valeur en MAT de 108,3g/kg de l'ensilage t0 à 25% de MS est supérieure à celle de l'ensilage t0 à 40% de MS, 105,3g/kg. La concentration en matières minérales de l'ensilage t0 à 25% de MS est de 83g/kg, elle est supérieure à celle de l'ensilage t0 à 40% MS qui est de 81,8 g/kg. Concernant la concentration en sucres solubles, sa valeur de 271 g/kg pour l'ensilage t0 à 25% de MS est supérieure à la valeur de 268 g/kg pour l'ensilage à 40% de MS.

La concentration en levures et en moisissures sont les mêmes pour l'ensilage à 25 % de MS et à 40% de MS, avec  $3,6.10^5$  UFC de Levures/g et  $4,0.10^2$  UFC de Moisissures/g.

La densité de l'ensilage dans les mini-silos sont pour la modalité 25 %MS de  $150\text{kgMS/m}^3$  et de  $180\text{ kgMS/m}^3$  pour la modalité 40% de MS.

Les 2 ensilages, 25% de MS et 40% de MS, ont bien une matière sèche différente proche de l'objectif, avec des valeurs fourragères différentes et supérieures pour l'ensilage t0 à 25% de MS. La concentration en matières minérales et en sucres solubles sont un peu différentes. Les analyses du laboratoire n'ont pas montré de différence de concentration en levures et moisissures. Enfin les densités sont différentes, elles sont supérieures pour l'ensilage t0 à 40% de MS.

| modalités MS               | 25 % MS |           |         |         | 40 % MS |           |         |         | ANOVA à 2 facteurs            |
|----------------------------|---------|-----------|---------|---------|---------|-----------|---------|---------|-------------------------------|
| modalités inoculum         | Pionner | Défi'flor | Sauvage | Témoin  | Pionner | Défi'flor | Sauvage | Témoin  | p-value de l'interaction      |
| NDF en g/kg                | 421 b   | 419 ab    | 395 ab  | 366 a   | 415 b   | 345 a     | 401 ab  | 394 ab  | 0,006*                        |
| ADF en g/kg                | 277     | 287       | 284     | 261     | 274     | 241       | 247     | 244     | normalité non vérifiée        |
| ADL en g/kg                | 23      | 24        | 23      | 14      | 20 b    | 11 a      | 20 b    | 17 ab   | 0,003*                        |
| MAT en g/kg                | 112     | 112       | 118     | 114     | 115     | 117       | 114     | 111     | <b>0,314</b>                  |
| MS mesurée en %            | 24,3    | 24,9      | 24,2    | 25,3    | 42,8 a  | 42,6 a    | 41 a    | 41,1 a  | 0,013*                        |
| [acide acétique] en g/kg   | 20,2    | 20,3      | 19,5    | 19,2    | 13 ab   | 12,5 a    | 15 ab   | 15,3 b  | 0,008*                        |
| [acide lactique]** en g/kg | 71,3 a  | 71,9 ab   | 73,8 b  | 72,5 ab | 37,9 a  | 37,8 ab   | 43,5 b  | 41,4 ab | <b>0,311</b>                  |
| pH                         | 4,28 ab | 4,31 b    | 4,32 b  | 4,26 a  | 4,76    | 4,7       | 4,65    | 4,66    | 0,030*                        |
| [moisissure] en UFC/g      | 0       | 0         | 0       | 33      | 0       | 0         | 0       | 0       | homoscédasticité non vérifiée |
| [levure] en UFC/mg         | 2,8     | 2,7       | 1       | 6,6     | 333,3   | 194,7     | 403,3   | 230     | <b>0,165</b>                  |
| [lev+moisi] en UFC/mg      | 2,8     | 2,7       | 1       | 6,6     | 333,3   | 194,7     | 403,3   | 230     | <b>0,165</b>                  |

\*p-value > 5%      \*\*une valeur aberrante supprimée

Tableau 11 : résultats des comparaisons de moyennes pour l'ensilage à 8 jours de fermentation

## B. Ensilage à 8 jours de fermentation

Les premiers résultats analysés sont ceux de l'ensilage en fin de fermentation à 8 jours (cf. Tableau 11). Comme expliqué précédemment, une ANOVA à 2 facteurs sera effectuée, si une interaction existe entre les 2 facteurs, une séparation des données en fonction du facteur matière sèche (un groupe à 25%MS et l'autre à 40%MS) sera faite.

Lorsque l'interaction entre les 2 facteurs, % de MS de l'ensilage et inoculum, n'est pas significative, le facteur l'inoculum agit indépendamment du facteur % de MS. Les résultats montrent des interactions non significatives pour la variable MAT, concentration en acides lactiques, concentration en levures et en levures+moisissures. Puis seul la variable concentration en acides lactiques a un effet significatif sur le facteur inoculum. Dans les 2 situations de MS de l'ensilage, le Pionnier a une concentration en acides lactiques la plus élevée alors que le kéfir sauvage a la concentration la plus faible.

Concernant les variables avec une interaction, l'effet inoculum pour l'ensilage à 25% de MS concerne la variable NDF et pH. La NDF est la plus élevée pour l'inoculum Pionnier avec 421 g/kg et est la plus faible pour le témoin avec 366 g/kg. Pour la variable pH, les inocula Défi'flor et kéfir sauvage ont des moyennes de pH les plus élevées avec respectivement 4,31 et 4,32 en valeur pH. Le témoin a la moyenne de pH la plus basse, avec une valeur de 4,26. Les variables ADF, ADL, %MS mesuré et la concentration en acides lactiques ne sont pas impactés par l'effet kéfir avec un ensilage à 25% de MS.

L'effet inoculum pour l'ensilage à 40% de MS est ressorti significatif pour les variables ADL, % de MS mesuré et la concentration en acides lactiques. L'ADL à 11 g/kg avec l'inoculum Défi'flor est la plus faible. L'ensilage avec du Pionnier et du kéfir sauvage ont la moyenne en ADL la plus élevée avec 20 g/kg. La variable % de MS a un effet inoculum significatif, seulement aucune différence de moyennes est observée. Pour la variable concentration en acides acétiques, l'ensilage avec du kéfir Défi'flor a la concentration la faible avec 12,5 g/kg et le témoin a la moyenne la plus élevée avec 15,3 g/kg. Concernant les variables ADF et pH, l'effet inoculum n'est pas ressorti significatif lorsque l'ensilage est à 40% de MS.

Certaines variables n'ont pas pu être analysées. Pour l'ADF, la normalité des résidus n'a pas été vérifiée et pour la concentration en moisissures, l'homoscédasticité n'a pas été non plus vérifiée. Les graphiques pour chaque variable en fonction du facteur % de MS et inoculum sont disponibles en Annexe 7.

| modalités MS                    | à 25 % MS |           |         |        | à 40 % MS |           |         |         | ANOVA à 2 facteurs       |
|---------------------------------|-----------|-----------|---------|--------|-----------|-----------|---------|---------|--------------------------|
| modalités inoculum              | Pionner   | Défi'flor | Sauvage | Témoin | Pionner   | Défi'flor | Sauvage | Témoin  | p-value de l'interaction |
| NDF en g/kg**                   | 471 ab    | 457 ab    | 450 a   | 474 b  | 416 a     | 431 a     | 465 b   | 459 b   | 0,002*                   |
| ADF en g/kg**                   | 322 a     | 316 a     | 317 a   | 329 a  | 294       | 290       | 287     | 282     | 0,034*                   |
| ADL en g/kg                     | 15        | 13        | 11      | 14     | 21        | 22        | 23      | 21      | <b>0,064</b>             |
| MAT en g/kg                     | 121       | 115       | 129     | 130    | 126       | 125       | 127     | 128     | <b>0,393</b>             |
| MS mesurée** en %               | 21,6 a    | 23,6 b    | 21,8 a  | 21,5 a | 40,1      | 38,6      | 38,7    | 38,2    | 0,029*                   |
| [acide acétique] en g/kg        | 41,7 b    | 30,3 a    | 34,1 a  | 33,1 a | 27,2 b    | 23,6 a    | 20,2 a  | 19,8 a  | <b>0,074</b>             |
| [acide lactique] en g/kg        | 81        | 83,3      | 82,7    | 85,8   | 58,3 b    | 47 a      | 50,7 a  | 51,7 ab | 0,011*                   |
| Ratio [a.lactique]/[a.acétique] | 2 a       | 2,8 b     | 2,5 ab  | 2,6 ab | 2,1       | 2         | 2,5     | 2,7     | 0,037*                   |
| pH                              | 4,22      | 4,24      | 4,24    | 4,27   | 4,3 a     | 4,43 b    | 4,46 b  | 4,4,6 b | 0,003*                   |
| [acide propionique] en g/kg     | 0,35      | 0,33      | 0,35    | 0,35   | 0,18      | 0,19      | 0,18    | 0,19    | <b>0,061</b>             |
| [azote soluble] en g/kg         | 11        | 10,2      | 9,4     | 9,4    | 8,6       | 8,1       | 8,6     | 8,7     | 0,045*                   |
| [azote ammoniacal] en g/kg      | 1,1       | 1         | 1       | 1,1    | 0,9       | 0,8       | 0,9     | 0,8     | <b>0,193</b>             |
| [acide n-valérate] en g/kg      | 0,18      | 0,17      | 0,18    | 0,18   | 0,09      | 0,09      | 0,09    | 0,09    | normalité non vérifiée   |
| [acide n-butyrate] en g/kg      | 0,18      | 0,17      | 0,18    | 0,18   | 0,09      | 0,09      | 0,09    | 0,09    | <b>0,343</b>             |
| [acide iso-butyrate] en g/kg    | 0,18      | 0,16      | 0,18    | 0,18   | 0,09      | 0,09      | 0,09    | 0,09    | normalité non vérifiée   |
| [acide iso-valérate] en g/kg    | 0,18      | 0,17      | 0,18    | 0,18   | 0,09      | 0,09      | 0,09    | 0,09    | <b>0,172</b>             |
| [moisissure] en UFC/g           | 100       | 0         | 67      | 67     | 33        | 0         | 303     | 33      | normalité non vérifiée   |
| [levure] en UFC/mg              | 0         | 2,7       | 0,1     | 0,1    | 24        | 59,2      | 141,8   | 25,5    | normalité non vérifiée   |
| [lev+moisi] en UFC/mg           | 0,1       | 2,7       | 0,1     | 0,2    | 24        | 59,2      | 141,8   | 25,8    | normalité non vérifiée   |

\*p-value > 5%      \*\*une valeur aberrante supprimée

Tableau 12 : résultats des comparaisons de moyennes pour l'ensilage à 10 semaines de fermentation

## C. Ensilage à 10 semaines de fermentation

Après avoir expliqué l'analyse de l'ensilage en fin de fermentation (à 8 jours), l'ensilage terminal prêt à être distribué aux animaux (à 10 semaines), va être étudié. De nombreuses variables ont été étudiées pour évaluer plus précisément la conservation du fourrage. Tout comme l'analyse à 8 jours de fermentation, les résultats d'analyses ont été placés dans un tableau (cf. Tableau 12).

En reprenant le même schéma de description que l'analyse de l'ensilage à 8 jours, les variables sans interaction entre le facteur % de MS et inoculum sont l'ADL, la MAT, la concentration en acides acétiques, en acides propioniques, en ammonium, en acides n-butyrate et en acides iso-valérate. Ensuite, seul la variable concentration en acides acétiques a un effet significatif sur le facteur inoculum. Quel que soit le % de MS étudié, le Pionner a la concentration la plus élevée en acides acétiques.

Concernant les variables avec une interaction entre les 2 facteurs, dans la situation avec un ensilage à 25% de MS :

La NDF du témoin, ayant 474g/kg de moyenne, est la plus élevée. La NDF moyenne du kéfir sauvage de 450g/kg est la plus faible. L'ADF a un effet significatif sans avoir des moyennes différentes entre les types d'inocula. L'inoculum Défi'flor sur la variable % de MS mesuré a la valeur la plus élevée avec 23,6% de MS. Le ratio de concentration en acides lactiques sur acides acétiques est la plus faible avec une valeur de 2 pour l'inoculum Pionner. Ce ratio est le plus fort avec une valeur de 2,8 pour l'inoculum Défi'flor.

Lorsque que l'ensilage est à 40% de MS :

La NDF est plus élevée pour les ensilages témoin et inoculé avec du kéfir sauvage par rapport aux ensilages inoculés avec du Pionner et du Défi'flor. La concentration en acides lactiques est plus élevée pour ensilage Pionner avec 58,3g/kg et les ensilages Défi'flor et kéfir sauvage ont les valeurs moyennes les plus faibles, respectivement 47g/kg et 50,7g/kg. Enfin, la valeur moyenne du pH de l'ensilage inoculé avec du Pionner ayant 4,3 de pH est la plus faible.

La concentration en azotes solubles n'a pas montré d'effet par le facteur inoculum que ce soit pour l'ensilage à 25% de MS et à 40% de MS. Les variables n'ayant pas pu être analysées à cause du test de normalité non vérifié sont la concentration en acides n-valérate, en acides iso-butyrate, en moisissures, en levures et en levures+moisissures. Les graphiques représentant les variables étudiées en fonction du facteur % de MS et inoculum sont en Annexe 8.

| Comparaison entre ensilage<br>à 8 jours et à 10 semaines |                     | Variables   |
|--|---------------------|---|
| Variation<br><b>significative</b>                        | <b>Augmentation</b> | NDF / ADF / MAT<br>[acide lactique]<br>[acide acétique] |
|  | <b>Diminution</b>   | pH<br>%MS mesurée<br>[Levure]                           |
| Variation <b>non significative</b>                       |                     | ADL<br>[Moisissure]                                     |

Tableau 13 : Variation des variables entre l'ensilage à 8 jours et à 10 semaines

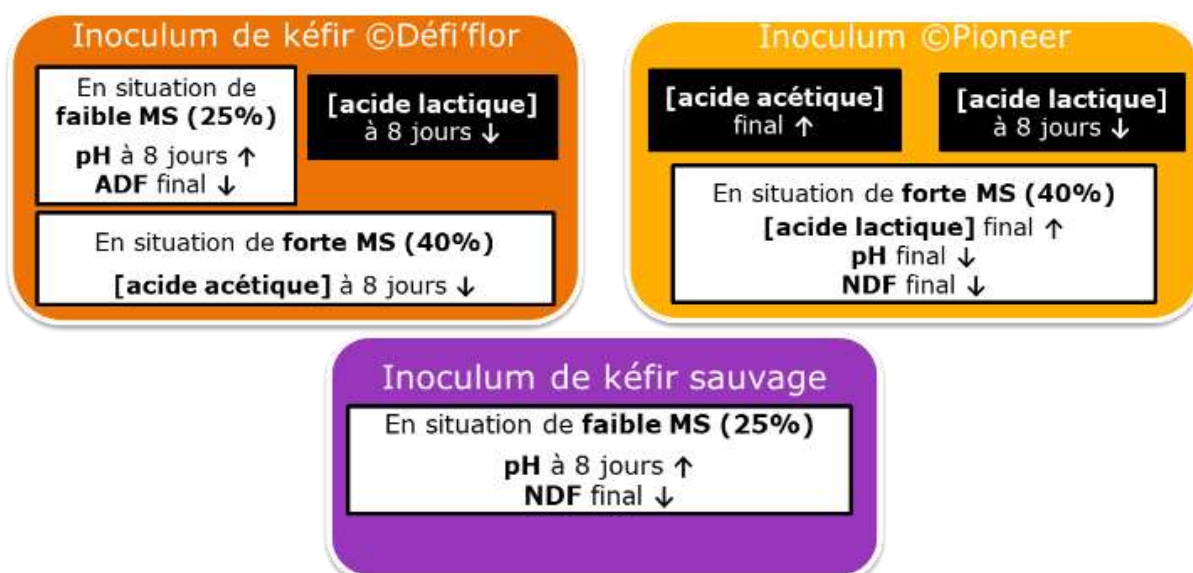


Schéma 12 : Synthèses des résultats d'analyse



## D. Croisement des résultats et évaluation de la qualité

### 1. L'évolution de l'ensilage entre 8 jours et 10 semaines de fermentation

La comparaison entre les variables pour les ensilages à 8 jours et à 10 semaines est résumée dans le Tableau 13. La majorité des variables montrent une variation significative ce qui veut dire qu'il y a une augmentation ou une diminution de la valeur entre les 2 analyses. La NDF, l'ADF et la MAT, ainsi que la concentration en acides acétiques et en acides lactiques augmentent avec le temps. Tandis que le pH et la concentration en levures et le % de MS mesuré diminuent avec le temps.

Seuls l'ADL et la concentration en moisissures ne montrent pas d'évolution entre les 2 analyses. L'ADL correspond à la lignine et les bactéries fermentaires ne consomment pas de lignine. Ensuite la concentration en moisissures ne fluctue pas, car le milieu est en anaérobiose, ce qui empêche le développement de champignons.

### 2. Croisement des résultats d'analyse

Une synthèse des résultats est placée dans le schéma 12, Elle place les 3 types d'inocula avec leurs effets significatifs sur les différentes variables (cf. Schéma 12).

Tout d'abord, l'inoculum de kéfir Défi'flor a une concentration plus faible en acides lactiques à 8 jours, un pH à 8 jours plus élevé à 25% de MS et une concentration en acides acétiques plus faible à 8 jours. Tous ces éléments indiquent que le kéfir Défi'flor ralentit la production d'acide et donc la diminution du pH. Puis sa valeur en ADF finale (à 10 semaines) est plus faible que les autres inocula, ceci peut se traduire par une plus forte consommation de cellulose de l'ensilage par les micro-organismes présents.

Ensuite, l'inoculum Pioneer montre une concentration en acides acétiques finale plus élevée. L'inoculum Pioneer doit alors apporter une meilleure stabilité lors de la mise en aérobiose de l'ensilage. Dans le cas de l'ensilage à 40% de MS une concentration en acides lactiques finale plus élevée est observée suivie d'un pH final plus faible. Ainsi l'inoculum Pioneer améliore l'acidification de l'ensilage par une production plus importante d'acides lactiques. Tout comme le Défi'flor, sa concentration en acides lactiques à 8 jours est plus faible, causée par une baisse d'activité homofermentaire. Puis en situation à 40% de MS, sa valeur en NDF est plus faible, expliquée par une consommation plus élevée en hémicellulose du fourrage par les micro-organismes présents.

| Moyenne échantillon    | appréciation  |
|------------------------|---------------|
| 25% MS - TEMOIN        | Excellent     |
| 25% MS - KEFIR SAUVAGE | Excellent     |
| 25% MS - KEFIR DEFI    | Bon           |
| 25% MS - PIONNER       | Bon/Excellent |
| 40% MS - TEMOIN        | Excellent     |
| 40% MS - KEFIR SAUVAGE | Excellent     |
| 40% MS - KEFIR DEFI    | Excellent     |
| 40% MS - PIONNER       | Excellent     |

Tableau 14 : évaluation de l'ensilage expérimental selon le barème INRA

| Catégorie échantillon  | score moyen | appréciation            |
|------------------------|-------------|-------------------------|
| 25% MS TEMOIN          | 94,3        | très bonne conservation |
| 25% MS - KEFIR SAUVAGE | 94,1        | très bonne conservation |
| 25% MS - KEFIR DEFI    | 92,9        | très bonne conservation |
| 25% MS - PIONNER       | 91,5        | très bonne conservation |
| 40% MS - TEMOIN        | 95,3        | très bonne conservation |
| 40% MS - KEFIR SAUVAGE | 95,2        | très bonne conservation |
| 40% MS - KEFIR DEFI    | 93,7        | très bonne conservation |
| 40% MS - PIONNER       | 95,3        | très bonne conservation |

Tableau 15 : évaluation de l'ensilage expérimental selon le barème Flieg-Vanbelle

Enfin, l'inoculum de kéfir sauvage ne montre que des différences pour les fourrages à 25% de MS. L'inoculum de kéfir n'apporte pas d'effet d'amélioration de la conservation du fourrage dans le cas d'un fourrage plus humide (à 25% de MS). Le pH à 8 jours est plus élevé, montrant un ralentissement de l'acidification. Une diminution en NDF finale s'opère pouvant s'expliquer par une consommation d'hémicellulose du fourrage par les micro-organismes présents.

Dans l'ensemble beaucoup de variables n'ont pas d'effets significatifs.

### 3. Evaluation de la qualité de l'ensilage

Ces analyses fournissent peu d'éléments très discriminants. Pour continuer la compréhension des résultats, une évaluation des analyses des fourrages est faite.

Tout d'abord l'évaluation par le barème INRA (cf. Tableau 14) montre une faible discrimination entre les inocula. Sachant que la catégorisation n'est pas précise et que le paramètre pH ne peut être pris en compte pour des fourrages avec des MS élevées ( $MS < 35\%$ ), ce barème est alors peu discriminant. Cependant, on peut conclure que d'après le barème INRA l'ensilage a une appréciation moyenne entre « bon » et « excellent » sachant que l'ensilage témoin est « excellent ».

Pour le barème d'évaluation de Flieg-Vanbelle (cf. Tableau 15), la discrimination est là aussi très faible avec une appréciation en permanence de « très bonne conservation ». De plus l'ensilage témoin a toujours le score le plus élevé. L'ensilage témoin est alors de très bonne qualité, les inocula n'améliorent pas le score obtenu, voire le diminuent légèrement. Ces évaluations déprécient la qualité de l'ensilage obtenu par l'inoculum Pionner par la forte concentration en acides acétiques de l'ensilage final.

| <b>Variables</b>                                      | <b>Type d'ensilage</b> | <b>Résultat</b> | <b>Recommandation</b> | <b>Référence</b> |
|---|------------------------|-----------------|-----------------------|------------------|
| <b>Concentration en sucres solubles (en g/kg)</b>     | 25% de MS              | 271             | 421                   | Amyot, 2003      |
|   | 40% de MS              | 268             | 271                   |                  |
| <b>Concentration en matière minérale (en %)</b>       | 25% de MS              | 8,1%            | <10%                  | Winslow, 2013    |
|   | 40% de MS              | 8,2%            |                       |                  |
| <b>Densité des 'mini-silos' (en kg/m<sup>3</sup>)</b> | 25% de MS              | 150             | 180                   | IDELE, 2018      |
|   | 40% de MS              | 180             | 230                   |                  |

*Tableau 16 : Comparaison résultats de l'ensilage t0 et valeurs de référence*

## VII. Discussion

Les résultats ne permettent pas d'obtenir des ensilages bien différents entre l'ensilage témoin et les ensilages inoculés. Leurs effets sont très hétérogènes. D'un côté, l'inocula Pioneer montre des effets bénéfiques sur la fermentation, la conservation et la stabilité aérobie. De l'autre côté, le kéfir sauvage ne montre que quelques effets non bénéfiques pour l'ensilage.

### A. Un ensilage d'herbe bien spécifique

#### 1. Un ensilage t0 de bonne qualité

Les résultats obtenus sont très liés aux contextes et à l'origine de l'ensilage d'herbe utilisé, ces éléments permettent d'obtenir une fermentation garantissant la qualité de l'ensilage. Des précisions sur la concentration en sucres solubles, en matière minérale et la densité des 'mini-silos' vont être apportées.

La concentration en sucres solubles est un élément qui doit s'analyser avec la teneur en matière sèche sur fourrage. Car d'après Amyot (2003), la concentration en sucre soluble doit être de 12% du % de matière sèche. Ainsi pour l'ensilage utilisé pour la modalité 25%MS, l'objectif de concentration en sucres solubles doit être de 421g/kgMS, alors que la concentration mesurée est de 271g/kg de MS (cf. Tableau 16). Ceci représente 9,5% du %MS (au lieu des 12% recommandés). Cette concentration semble insuffisante. Concernant la modalité à 40% de MS, l'objectif est de 276g/kgMS et la concentration mesurée est de 268g/kgMS, ainsi le taux de sucre soluble du fourrage pour la modalité à 40%MS est suffisant d'après Amyot (2003).

La question de la bonne concentration en sucre a déjà été abordée, mais au vue des résultats statistiques, il est possible de faire un lien entre la faible concentration en sucre soluble du fourrage à 25% de MS et l'impact plutôt négatif des inocula. Car pour les résultats sur le fourrage à 25% de MS, les quelques effets obtenus sont une baisse de NDF final par rapport au témoin, un pH final plus élevé, et un pH à 8 jours plus élevé. Seul l'inoculum Pioneer a une réponse intéressante sur la concentration en acides acétiques pour les 2 modalités de MS.

Amyot (2003) recommande de « limiter l'utilisation des inocula bactériens aux ensilages de graminées dont la teneur en matière sèche est supérieure à 25% (à moins que la teneur en sucres solubles soit >12% du % de matière sèche) ». Comme nous sommes faible en sucres solubles, 9,5% du % de MS, avec une MS proche de 25%, 28,5% mesurée, l'impact d'un inoculum risque d'être négatif.

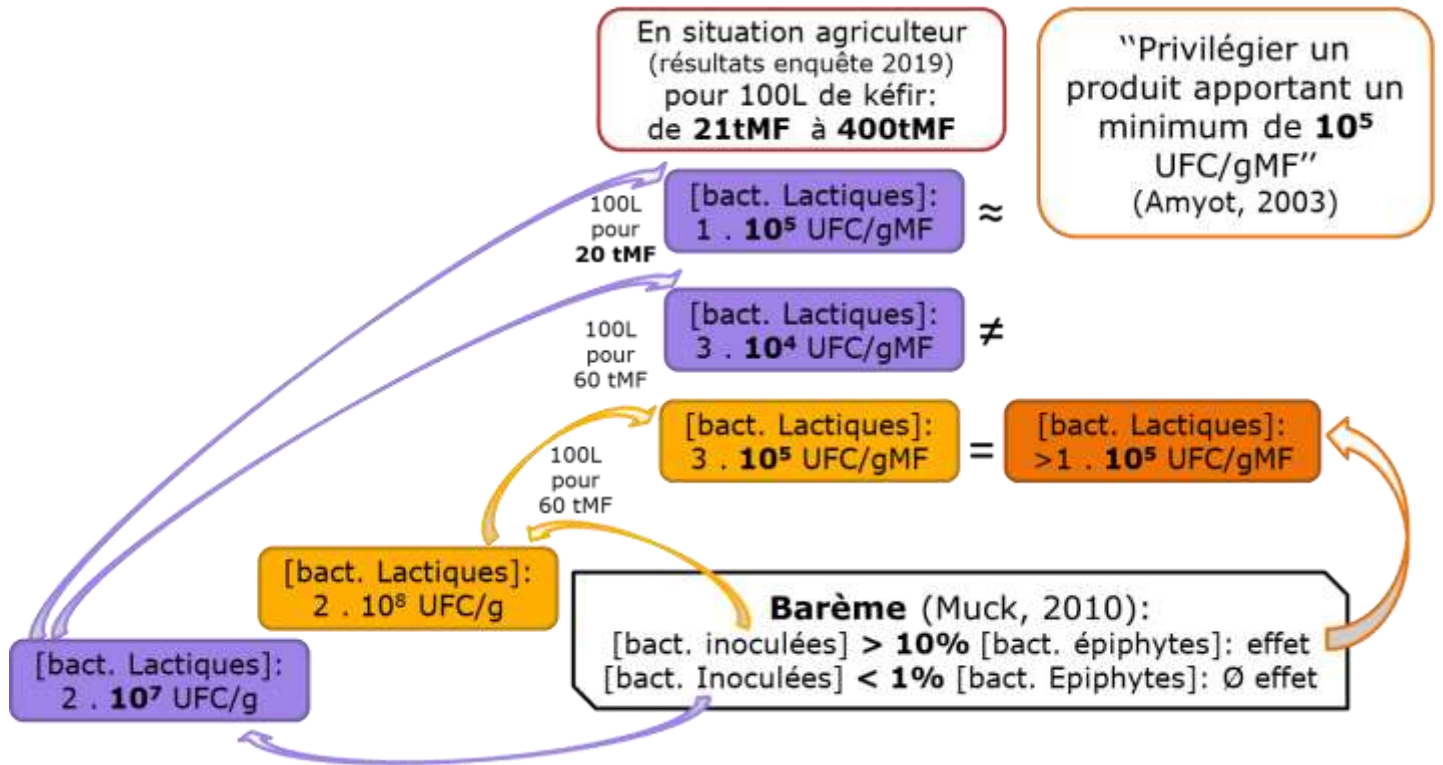


Schéma 13 : estimation des apports de kéfir sauvage face aux recommandations

Cela peut s'expliquer par le fait que les bactéries inoculées rentrent en compétition avec les bactéries épiphytes pour la ressource en énergie. Comme le milieu est favorable avec une forte quantité d'eau, mais avec une présence faible de sucres solubles disponibles, la nouvelle flore mettra du temps à se développer. Cela s'est traduit par des pH à 8 jours élevés ou des concentrations en acides lactiques faibles.

La densité de l'ensilage peut aussi être comparée à des valeurs de référence. D'après des données de l'IDELE, à un taux de matière sèche de 25% il faut arriver à  $180\text{kg/m}^3$  alors que la densité mesurée est de  $150\text{kg/m}^3$ . Il y a une légère différence entre les 2, mais elle ne semble pas problématique. Seulement pour l'ensilage à 40% de MS, la densité devrait être de  $230\text{kg/m}^3$ , alors que les mesures montrent une densité de  $180\text{kg/m}^3$ . Cela s'explique par le fait que le tassage de l'ensilage a été fait à la main, les personnes ont été limitées par leurs propres forces. La densité du mini-silo trop faible pour la modalité 40% de MS a dû impacter les résultats. Le milieu n'étant probablement pas assez favorable pour un développement optimal des inocula bactériens.

Enfin la concentration en matière minérale contenue dans le fourrage en vert a été de  $82,4\text{g/kg}$  de MS (les 2 modalités à  $81,8$  et  $83\text{g/kgMS}$ ) et d'après Winslow (2013) le taux de matière minérale doit être inférieur à 10%. Dans le cas contraire ( $[\text{matière minérale}] > 10\%$ ) une trop forte quantité de terre est présente dans l'ensilage pouvant endommager sa qualité. L'ensilage obtenu ne montre pas de présence trop importante de terre.

## 2. Un kéfir sauvage non optimal

Peu de résultats significatifs ont été observés pour l'inoculum de kéfir sauvage. De plus les 2 effets significatifs ne donnent pas des effets probants pour la conservation de l'ensilage : un ralentissement de la baisse du pH et une perte en NDF final. Comme la souche d'origine est inconnue, on ne peut pas juger des effets de cet inoculum sur sa concentration en bactéries lactiques. Les études menées sur des exploitations agricoles montrent que l'utilisation de ce type d'inoculum ne suit pas les recommandations et celles-ci ne sont pas non plus calibrées en fonction de la qualité des kéfirs (cf. Schéma 13).

D'après Muck (2010) et Amyot (2003), il faut apporter au minimum  $10^5$  UFC/gMF. Les recommandations faites par le Dr Gilles Grosmond et relayées par la chambre d'agriculture sont de 100L de kéfir pour 60 tMF. Avec un kéfir très concentré de  $2.10^8$  UFC/g (Ninane, 2009), les recommandations sont suivies.





Seulement le kéfir utilisé pour l'expérimentation est issu d'un kéfir utilisé en élevage et il a suivi le même processus de fermentation que les recommandations de la chambre d'agriculture. D'après des analyses de kéfir faites par la chambre d'agriculture de 2019, la moyenne de la concentration en bactéries lactiques des kéfirs destinés à l'ensilage étaient de moins de  $10^7$  UFC/g. En suivant le même raisonnement théorique avec la dilution de 100L pour 60tMF, la concentration finale est alors trop faible. Ce schéma (cf. Schéma 13, page précédente) était destiné à des agriculteurs pour les faire réfléchir sur l'intérêt de piloter la dilution pour régler les problèmes de concentration en bactéries lactiques du kéfir.

Il aurait fallu analyser un échantillon de kéfir afin de déterminer si la concentration en bactéries initiales était suffisante pour observer de potentiels effets. Ceci aurait pu être fait aussi pour les 2 autres inocula commerciaux afin de vérifier si les produits sont bien conformes à ce qui est annoncé et permettre d'ajuster l'interprétation en fonction de la concentration en bactéries lactiques. Une autre option aurait été d'avoir plusieurs modalités de kéfir sauvage en fonction de la concentration en bactéries lactiques.

## B. Une interprétation des résultats à nuancer

### 1. Ensilage final, interprétation du ratio [acide lactique] sur [acide acétique]

Les résultats qui peuvent sembler être bénéfiques sur la conservation de l'ensilage avec de l'inoculum Pioneer sont : une concentration en acides acétiques la plus élevée, pour l'ensilage à 40% de MS, une concentration en acides lactiques la plus forte et une valeur de pH la plus faible.

Tout d'abord la concentration en acides acétiques est à la fois bénéfique pour améliorer la stabilité du fourrage en aérobie, mais néfaste pour l'appétence. Ainsi, il est important de prendre la concentration en acides acétiques par rapport à la concentration en acides lactiques pour l'équilibre du fourrage. Le ratio utilisé est celui de [acide lactique] sur [acide acétique] où il est recommandé d'approcher la valeur de 3 (Bagg, 2012).

Pour rappel, l'ensilage à 25% de MS a donné un effet significatif sur cette variable. Le kéfir Défi'flor donne le ratio le plus élevé avec 2,8 et l'inoculum Pioneer le ratio le plus bas avec de 2,0 (cf. Tableau 12, page 22). Ce dernier donne donc un ratio assez faible, le fourrage ainsi produit n'est pas optimal et risque de perdre en appétence par rapport à l'ensilage inoculé avec le Défi'flor. Le témoin donne un ratio à 2,6 qui est légèrement plus faible que la recommandation.

Tableau de résultats de la composition et des paramètres de fermentation sur de l'ensilage d'herbe conservé avec différents inocula bactériens après 105 jours de fermentation

|                         | Control | <i>E. faecium</i><br>CCM 4231 | <i>L. fermentum</i><br>LF 2 | <i>L. plantarum</i><br>CCM 4000 | Pooled S.E.M. |
|-------------------------|---------|-------------------------------|-----------------------------|---------------------------------|---------------|
| DM (g/kg)               | 222.8   | 241.5***                      | 229.0*                      | 246.6***                        | 1.8           |
| Ash (g/kg DM)           | 78.1    | 77.7                          | 78.0                        | 75.9                            | 1.1           |
| Crude protein (g/kg DM) | 126.4   | 141.5                         | 146.6                       | 139.9                           | 7.6           |
| Crude fibre (g/kg DM)   | 409.5   | 365.8*                        | 368.8*                      | 348.3**                         | 9.1           |
| NDF                     | 698.4   | 686.8                         | 691.3                       | 664.4**                         | 5.1           |
| ADF                     | 407.5   | 392.2**                       | 385.3**                     | 380.5**                         | 3.2           |
| Fat                     | 24.9    | 27.3                          | 23.7                        | 24.5*                           | 0.3           |
| IVDMD (%)               | 66.4    | 59.9**                        | 60.4**                      | 69.5*                           | 1.0           |
| pH                      | 5.26    | 4.49***                       | 4.26***                     | 4.35***                         | 0.1           |
| Lactic acid (g/kg DM)   | 29.6    | 60.4***                       | 84.9***                     | 94.1***                         | 0.1           |
| Acetate                 | 3.14    | 1.65***                       | 6.98***                     | 6.89***                         | 0.02          |
| Propionate              | –       | 3.72                          | 4.80                        | 7.70                            | 0.02          |
| Ammonia N (g/kg N)      | 77.3    | 92.0***                       | 78.9                        | 55.5***                         | 0.5           |

DM – dry matter; IVDMD – *in vitro* dry matter degradability; NDF – neutral detergent fibre; ADF – acid detergent fibre; *E. faecium* – *Enterococcus faecium*; *L. fermentum* – *Lactobacillus fermentum*; *L. plantarum* – *Lactobacillus plantarum*  
\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$  differences from the control

Tableau 17 : Résultats expérimentation inoculation dans de l'ensilage d'herbe (source : Jalc, 2009)

Concernant l'ensilage à 40% de MS, le témoin reste proche de la recommandation avec une valeur de 2,7. L'inoculum bactérien Pioneer est toujours assez bas avec un ratio de 2,1 même si la concentration en acides lactiques est significativement supérieure à celle du témoin. Cependant à ce niveau de MS, le kéfir Défi'flor donne un ratio bas avec 2,0. Seulement l'ANOVA n'est pas ressortie significative.

En conclusion, l'inoculum Pioneer semble être un bon produit pour la stabilité aérobie de l'ensilage, seulement le ratio [acide lactique]/[acide acétique] est assez faible ce qui risque d'impacter l'appétence de l'ensilage. Ce même risque est à prévoir sur l'ensilage à 40% de MS avec du kéfir Défi'flor, même si elle n'est pas ressortie significative pendant l'analyse.

## 2. Ensilage final, interprétation d'une baisse de NDF

Après avoir discuté de l'interprétation de la concentration en acides acétiques, les 3 modalités d'inoculum voient leur concentration en valeurs fourragères (NDF et ADF) plus faible qu'avec le témoin. En prenant l'exemple de l'inoculum Pioneer et kéfir sauvage, pour l'ensilage final (à 10 semaines) ils ont une valeur en NDF inférieure au témoin (cf. Tableau 12, page 22). Cela est expliqué par une consommation d'hémicellulose par les micro-organismes. Il reste à évaluer l'impact de cette baisse.

En se concentrant sur l'inoculum Pioneer dans le cas de l'ensilage à 40% de MS, sa valeur moyenne en NDF est de 416,2g/kgMS, alors que le témoin est à 459,1g/kgMS (différence en NDF de 43g/kgMS). Jalc *et al.* (2009), dans une expérimentation sur de l'ensilage d'herbe a testé 3 inocula différents avec 3 espèces de bactéries différentes (cf. Tableau 17). Les résultats ont montré une différence significative d'une modalité d'inoculum contenant du *Lactobacillus plantarum* avec le témoin. La teneur en NDF n'est pas la même que pour l'essai sur le kéfir, néanmoins la différence entre les 2 moyennes est de 34g/kgMS. Jalc *et al.* (2009) a ainsi conclu que certain type d'inoculum faisait plus consommer de constituants pariétaux.

La valeur de la NDF brute n'est pas vraiment interprétable, d'un point de vue valeur alimentaire, s'il n'est pas accompagné d'une digestibilité potentielle. Cependant la perte de 4% de NDF semble être une perte conséquente de valeur alimentaire. Il resterait maintenant à déterminer si la digestibilité de cette NDF est alors devenue plus faible ou plus élevée pour les modalités inoculum par rapport au témoin.



## C. Des pistes d'amélioration

Pour des questions de budget, l'essai n'a pas pu répondre à toutes les questions initialement posées par le projet. Le compromis s'est effectué sur le nombre de modalités de matière sèche, le nombre de modalités d'inoculum, le nombre d'analyse en laboratoire et le nombre de répétitions.

### 1. Diversité des taux de matières sèches des ensilages

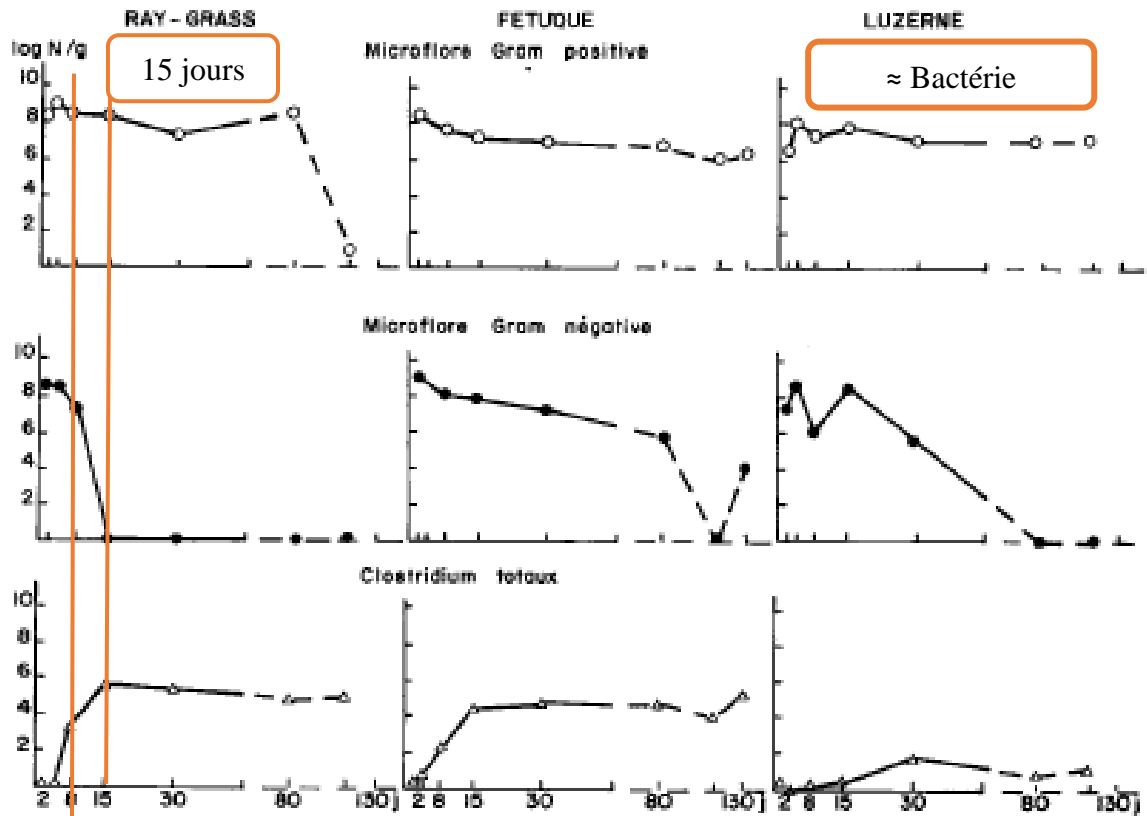
Le facteur taux de matière sèche est discuté sur les modalités choisies. Le choix a porté sur une matière sèche basse à 25% et une matière sèche haute à 40%. Des ensilages avec des teneurs en matière sèche inférieures à 25% de MS sont à trop fort risque de perdre de valeurs alimentaires par des fermentaires néfastes et des écoulements de jus. Cependant, il est possible d'augmenter la teneur en matière sèche plus haut que 40% de MS. Il aurait fallu avoir deux modalités de plus, par exemple une à 50% de MS pour caractériser un haut niveau de matière sèche et une autre à 60% pour observer l'effet sur la conservation dans une situation extrême. La loi de réponse sur le facteur MS aurait donc été plus intéressante.

Cependant, la période de l'année choisie pour effectuer ces ensilages était précoce en saison. Si l'on tente d'augmenter la matière sèche, les pertes au sol risquent d'être trop élevées, impactant fortement la valeur alimentaire.

Une modalité de plus, à 55% de MS, aurait pu être rajoutée, ou un deuxième essai fin mai, pour observer les résultats sur des taux de matières sèches plus élevées et avec des stades végétatifs plus avancés.

### 2. Des temps de fermentation mal évalués

L'analyse de l'ensilage en fin de fermentation (à 8 jours) est à discuter en vue des résultats obtenus. L'objectif initial de cette analyse intermédiaire était d'observer l'état de l'ensilage en fin de fermentation, cependant les résultats obtenus ne le montrent pas complètement. Si l'on considère qu'un ensilage en fin de fermentation se définit par le pH de stabilité et l'arrêt de l'activité bactérienne, l'objectif est d'obtenir des concentrations en acides et un pH, stables. D'après les résultats obtenus sur le pH entre l'ensilage à 8 jours et l'ensilage à 10 semaines (cf. Tableau 13, page 23), cela a encore diminué. Ainsi au stade 8 jours de fermentation, l'ensilage ne se trouve pas en fin de fermentation.



8 jours

FIG. 1. — Évolution du nombre de bactéries appartenant à divers groupes de la microflore dans les ensilages « holozéimiques » (piluliers)

Graphique 5 : évolution du nombre de bactérie en fonction du temps après ensilage (source : Gouet, 1972)

L'analyse sur l'effet des inocula pendant la période de stabilité de l'ensilage (après fermentation) n'est alors pas exacte, car la seule information que l'on peut en tirer est que la valeur en ADL et la concentration en moisissures n'évoluent pas pendant la phase de fermentation et de stabilité de l'ensilage.

Cette cinétique de fermentation se retrouve aussi sur des essais utilisant des bocaux en tant que mini-silo expérimental. Gouet *et al.* (1972) montre la cinétique des populations de différents types bactériens (cf. Graphique 5). Ces graphiques ne montrent pas la loi de réponse du pH, mais la loi de réponse du développement bactérien en fonction du temps. Comme le développement bactérien est en forte corrélation avec la production d'acides, une comparaison entre pH et concentration en bactéries sera effectuée. Il est possible d'observer que le nombre de bactéries selon leurs catégories continue de fluctuer après 8 jours. Ceci indique donc bien que l'ensilage n'a pas encore terminé sa phase de fermentation.

D'après les résultats de cette recherche, une analyse à 15 jours de fermentation aurait été plus judicieuse. Cependant les informations collectées à 8 jours de fermentation ont tout de même permis d'observer ce qu'il se passe lors de la fermentation et d'observer une différence significative entre les inocula. Une troisième analyse à 15 jours de fermentation aurait pu être effectuée pour observer les effets sur la stabilité.

Néanmoins comme l'ensilage est de très bonne qualité, il y a une forte probabilité que ces résultats indiquent une très bonne stabilité, se traduisant par des variables identiques entre l'ensilage à 15 jours et l'ensilage à 10 semaines.

### 3. Des pistes de nouvelles variables à expérimenter

L'éthanol pouvait être analysé pour comparer l'activité des levures entre les inocula. Seulement, après consultation d'Anthony Uijtewaal, responsable pôle fourrage à Arvalis, celui-ci indique que l'analyse de cette donnée n'apporterait pas d'informations complémentaires, car la réponse aux inocula est trop variable. Cette donnée aurait pu compléter l'interprétation des résultats sur la concentration en levures et leurs activités, et essayer de différencier l'inoculum de kéfir (contenant des levures) de l'inoculum bactérien (sans levures).

Afin de caractériser l'activité fongique de l'ensilage, il était possible d'analyser les mycotoxines, mais ces analyses seraient très onéreuses et d'après Anthony Uijtewaal, il est compliqué d'observer des résultats significatifs.





Une analyse sur la concentration en bactéries lactiques aurait été judicieuse, car cela aurait permis de connaître la quantité de bactéries lactiques épiphytes (naturellement présentes sur la plante) afin de mettre ces valeurs en comparaison avec la quantité de bactéries inoculées. D'après Muck (2010), la concentration en bactéries inoculées doit être supérieure à 10% de la concentration en bactéries épiphytes afin d'observer des effets significatifs.

Ces résultats amènent beaucoup d'interrogations, car ces recherches sur les inocula de kéfir sont très récentes et ont besoin de compléments d'expérimentations pour continuer à expliquer ces facteurs d'inoculation.



## Conclusion

L'objectif de l'étude était de mesurer l'effet du kéfir sur la conservation d'un ensilage d'herbe. Tout d'abord, les effets équivalents entre inocula n'ont pas pu être observés. L'acidification de l'ensilage n'a été ni plus rapide, ni plus forte, sauf pour l'ensilage à 40% de MS avec l'inoculum Pionner. Une meilleure conservation de la qualité du fourrage n'est pas obtenue. La stabilité aérobie s'est améliorée seulement par l'inoculum Pionner. Ces résultats sont très liés au contexte et à l'origine de l'ensilage d'herbe, car la qualité de ce dernier était déjà excellente ce qui a empêché d'observer de réelles améliorations. Des paramètres d'ajustement, comme la concentration de bactéries lactiques inoculées et la concentration en bactéries lactiques épiphytes dans l'ensilage, auraient potentiellement permis de savoir s'il était nécessaire d'inoculer ce type d'ensilage.

Néanmoins il est possible de conclure que pour ce type d'ensilage d'herbe, l'ajout d'un inoculum ralentit la fermentation et amène une baisse de la quantité des constituants pariétaux. Ces résultats sont à nuancer dans la situation où un ensilage à 40% de MS est inoculé avec le produit Pioneer, car l'acidification de celui-ci ainsi que sa stabilité aérobie étaient meilleures.

D'autres tests sont en cours, non pas en station expérimentale, mais sur 13 exploitations agricoles. Ces tests ne pourront pas fournir des résultats statistiquement intéressants, mais permettront d'observer des potentiels effets des inocula utilisés par les agriculteurs sur des ensilages très diverses. Ceci pourrait amener d'autres organismes à faire de nouveau essai sur ce sujet, à partir de ces résultats.

La diversité des ensilages n'a pas été explorée. L'application de ces résultats est limitée aux ensilages d'herbe proches de ceux expérimentés, car le type de plante, la saison et la matière sèche amène une forte variabilité. Dans une situation où un ensilage d'herbe a une forte concentration en sucres solubles et une faible teneur en MS, l'inoculation ne semble pas utile et pourrait même amener un risque de perte de valeurs fourragères. Il faut aussi être vigilant sur la quantité de kéfir à incorporer dans l'ensilage, car il est à étudier en fonction de sa concentration en bactéries lactiques et de la concentration en bactéries lactiques épiphytes. Enfin lorsque l'utilisateur fait le choix d'un inoculum commercial, il est important de bien le choisir en fonction du type d'ensilage récolté et de son objectif d'utilisation.

Toutes ces expérimentations montrent que le travail de recherche n'en est qu'à ces débuts. Les pistes sont intéressantes et doivent être poursuivies. Le kéfir a un potentiel qualitatif à exploiter.



Pour les recherches futures, un dernier point serait intéressant à creuser : celui de l'effet probiotique. Quand le sujet sur le kéfir est abordé, la question des probiotiques est sous-jacente. Ils sont définis comme « des micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont ingérés en quantités suffisantes, confèrent des avantages pour la santé » (Bajaj *et al.*, 2015). Pour des questions de budget, l'aspect amélioration de la santé des animaux n'a pas pu être testé. Cependant quelques chercheurs s'y intéressent. C'est le cas de Weinberg et Muck (1996) après avoir effectué une synthèse bibliographique sur l'inoculum bactérien, ils se sont dit que des effets probiotiques peuvent contribuer à certaines améliorations de performances animales déjà connues. Cette réflexion est encore plus accentuée pour des kéfirs utilisés en inoculum étant composés de multiples micro-organismes vivant en relation étroite et spécifique.



## Bibliographie

Amyot, A., 2003. Les additifs pour le foin et l'ensilage : mode d'action et recommandations d'utilisation pour chaque type de produit 23. Institut de recherche et développement en agroenvironnement, 1-23.

Bagg J., 2012, Problèmes de fermentation de l'ensilage. Omafra Ontario Ca. URL <http://www.omafra.gov.on.ca/french/crops/field/forages/silage-ferm-prob.htm> (accessed 9.20.19).

Bajaj, B.K., Claes, I.J.J., Lebeer, S., 2015. Functional mechanisms of probiotics. JMBFS 04, 321–327.

Blajman, J.E., Páez, R.B., Vinderola, C.G., Lingua, M.S., Signorini, M.L., 2018. A meta-analysis on the effectiveness of homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria for corn silage. *Journal of Applied Microbiology* 125, 1655–1669.

Bolsen, K. K., G. Ashbell and Z. G. Weinberg. 1996. Silage fermentation and silage additives. *Asian-Australian Jour. of Animal Sci.* 9 (5) : 483-614.

Buxton, D.R., Muck, R.E., Harrison, J.H., Pahlow, G., Muck, R.E., Driehuis, F., Elferink, S.J.W.H.O., Spoelstra, S.F., 2003. Microbiology of Ensiling, in: *Agronomy Monograph*. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America

Chambre d'agriculture de l'Ariège, 2019. Bilan fourrager : suite aux intempéries et à la qualité médiocre des stocks, cette étape est indispensable pour aborder l'hiver sereinement [WWW Document]. URL <https://ariege.chambre-agriculture.fr/actualites/toutes-nos-actualites/detail-de-lactualite/actualites/bilan-fourrager-suite-aux-intemperies-et-a-la-qualite-mediocre-des-stocks-cette-etape-est-indisp/> (accessed 9.20.19).

CODEX ALIMENTARIUS, normes alimentaires internationales, 2018. Normes CODEX 243-2003. FAO.

Gallo, A., Giuberti, G., Frisvad, J., Bertuzzi, T., Nielsen, K., 2015. Review on Mycotoxin Issues in Ruminants: Occurrence in Forages, Effects of Mycotoxin Ingestion on Health Status and Animal Performance and Practical Strategies to Counteract Their Negative Effects. *Toxins* 7, 3057–3111.

Garrote, G. L., Abraham, A. G., & De Antoni, G. L. (1997). Preservation of Kefir Grains, a Comparative Study. *LWT - Food Science and Technology*, 30(1), 77–84.

Gouet, Ph., Contrepois, M., Bousset, J., Bousset-Fatianoff, N., Bes, C., Dorbe, M.-F., 1972. Ensilages " gnotoxéniques ": étude cinétique du développement bactérien dans des ensilages " gnotoxéniques " de luzerne, fétuque et ray-grass. *Annales de biologie animale, biochimie, biophysique* 12, 159–171.

Hecer C; Ulusoy B. and Kaynarca D., 2018, Effect of different fermentation conditions on composition of kefir microbiota. *International Food Research Journal* 26(): 401-409.

Hsieh, H.-H., Wang, S.-Y., Chen, T.-L., Huang, Y.-L., Chen, M.-J., 2012. Effects of cow's and goat's milk as fermentation media on the microbial ecology of sugary kefir grains. *International Journal of Food Microbiology* 157, 73–81.

Jalc, D., Laukova, A., Pogány Simonová, M., Varadyova, Z., HOMOLKA, 2009. The use of bacterial inoculants for grass silage: Their effects on nutrient composition and fermentation parameters in grass silages. *Czech Journal of Animal Science* 54, 83–90.

Kleinschmit, D.H., Kung, L., 2006. A Meta-Analysis of the Effects of *Lactobacillus buchneri* on the Fermentation and Aerobic Stability of Corn and Grass and Small-Grain Silages. *Journal of Dairy Science* 89, 4005–4013.

Koyu, E.B.; Buyuktuncer Demirel, Z. A functional food: Kefir. *J. Nutr. Diet.* 2018, 46, 166–175.

Lefebvre, G., Lafrenière, C., 2015. La conservation des ensilages : Nouvelles réalités, nouveaux outils 43.

McDonald Henderson, P.A.R., 1962. Buffering capacity of herbage samples as a factor in ensilage. *J. Sci. Food Agric.* 13, 395–400.

Miguel da C. P., Cardoso M.G., Magalhães, K.T., Schwan, R.F., 2011. Profile of microbial communities present in tibico (sugary kefir) grains from different Brazilian States. *World J Microbiol Biotechnol* 27, 1875–1884.

Muck, R.E., 2010. Silage microbiology and its control through additives. *Revista Brasileira de Zootecnia* 39, 183–191.



Ninane, V., Mukandayambaje, R., Berben, G., 2009. Probiotiques, aliments fonctionnels et kéfir : le point sur la situation réglementaire en Belgique et sur les avancées scientifiques en matière d'évaluation des effets santé du kéfir. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*

Pahlow, G., Muck, R., Driehuis, F., Oude Elferink, S., Spoelstra, S.F., 2003. Microbiology of Ensiling, in: *Silage Science and Technology*. pp. 31-93.

Paragon B.M., Andrieu J.P., Brunschwig P., Gaillard F., Griess D., Heuchel V., Piriou B., Weiss P., 2004, Bonnes pratiques de fabrication de l'ensilage pour une meilleur maîtrise des risques sanitaires. Agence française de sécurité sanitaire des aliments. URL <https://docplayer.fr/10250958-Bonnes-pratiques-de-fabrication-de-l-ensilage-pour-une-meilleure-maitrise-des-risques-sanitaires-janvier-2004.html> (accessed 9.20.19).

Pidoux, M., 1989. The microbial flora of sugary kefir grain (the gingerbeer plant): biosynthesis of the grain from *Lactobacillus hilgardii* producing a polysaccharide gel. *World J Microbiol Biotechnol* 5, 223–238.

Queiroz, O.C.M., Ogunade, I.M., Weinberg, Z., Adesogan, A.T., 2018. Silage review: Foodborne pathogens in silage and their mitigation by silage additives. *Journal of Dairy Science* 101, 4132–4142. Muck, 1988 ref 64

Robin L., 2017, Allaitement des chevreaux au lait maternel acidifié ou thermisé, suivi d'exploitation en Rhône-Alpes. Angers : Ecole Supérieure d'Agricultures.

Santos, M.C., Kung, L., 2016. Short communication: The effects of dry matter and length of storage on the composition and nutritive value of alfalfa silage. *Journal of Dairy Science*

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

Winslow, T., 2013. Comprendre les analyses de fourrages, in: comité plantes fourragères. Presented at the Colloque sur les plantes fourragères: une alliée indispensable, CRAAQ, Québec, p. 20.

Zourari, A., Zourari, A., Anifantakis, E.M., 1988. Le kéfir. Caractères physico-chimiques, microbiologiques et nutritionnels. *Technologie de production. Une revue. Lait* 68, 373–392.



## Tables des schémas, photos, tableaux...

### Graphique

|  |         |
|--|---------|
| Graphique 1 : pH de 2 ensilages de luzerne en fonction du temps                      | page 6  |
| Graphique 2 : Niveaux d'activités des types de fermentation en fonction du pH        | page 7  |
| Graphique 3 : Corrélation linéaire entre la stabilité en aérobie et [acide acétique] | page 7  |
| Graphique 4 : pH de 4 MS d'ensilage de luzerne avec et sans sucre soluble            | page 8  |
| Graphique 5 : évolution du nombre de bactéries en fonction du temps après ensilage   | page 30 |

### Photo

|   |         |
|---|---------|
| Photo 1 : grain de kéfir (source: CAPdL)  | page 9  |
| Photo 2 : Vue au microscope électronique de grains de kéfir dans différents substrats | page 10 |
| Photo 3 : produit Défi'flor® (source: Solu'Nature)                                    | page 11 |

### Tableau

|   |         |
|---|---------|
| Tableau 1 : Comptage de bactéries épiphytes sur de l'herbe de prairie permanente  | page 6  |
| Tableau 2 : Teneur en MS du fourrage en fonction du stade physiologique           | page 6  |
| Tableau 3 : barème d'évaluation de la qualité de l'ensilage, INRA 1988            | page 9  |
| Tableau 4 : barème d'évaluation de la qualité de l'ensilage, Flieg-Vanbelle 1938  | page 9  |
| Tableau 5 : Effet des fermentations sur différents substrats de grains kéfir      | page 11 |
| Tableau 6 : Résultats méta-analyse de types d'inoculum sur de l'ensilage de maïs  | page 12 |
| Tableau 7 : Résultats expérimentation inoculum de bactéries homofermentaires      | page 12 |
| Tableau 8 : Résultats méta-analyse inoculum de bactéries hétérofermentaires       | page 13 |
| Tableau 9 : plan expérimental de l'essai ensilage                                 | page 15 |
| Tableau 10 : analyse des 2 ensilages 25%MS et 40%MS à t0, avant fermentation      | page 20 |
| Tableau 11 : résultats des comparaisons de moyennes pour l'ensilage à 8 jours     | page 21 |
| Tableau 12 : résultats des comparaisons de moyennes pour l'ensilage à 10 semaines | page 22 |
| Tableau 13 : variation des variables entre l'ensilage à 8 jours et à 10 semaines  | page 23 |
| Tableau 14 : évaluation de l'ensilage expérimental selon le barème INRA           | page 24 |
| Tableau 15 : évaluation de l'ensilage expérimental selon le barème Flieg-Vanbelle | page 24 |
| Tableau 16 : comparaison résultats de l'ensilage t0 et valeurs de référence       | page 25 |
| Tableau 17 : Résultats expérimentation inoculation dans de l'ensilage d'herbe     | page 28 |

### Schéma

|  |         |
|--|---------|
| Schéma 1 : Organigramme Chambre d'agriculture des Pays de Loire                        | page 2  |
| Schéma 2 : Schéma d'ensemble du projet PEI "santé animale" et volets d'action          | page 4  |
| Schéma 3 : Elaboration d'un ensilage à partir d'un fourrage vert (échelle microbienne) | page 5  |
| Schéma 4 : Composition type d'un kéfir de lait (source: Ninane, 2008)                  | page 10 |
| Schéma 5 : Composition d'un kéfir selon les groupes de bactéries utiles à l'ensilage   | page 12 |
| Schéma 6 : Schéma de la démarche de la problématique aux résultats attendus            | page 14 |
| Schéma 7 : Itinéraire technique de la parcelle servant à l'expérimentation             | page 15 |
| Schéma 8 : Mini-silo, méthode en tube PVC adaptée                                      | page 16 |
| Schéma 9 : Résumé des analyses en laboratoire effectuées pour l'essai                  | page 17 |
| Schéma 10 : Les constituants pariétaux selon Van Soest                                 | page 17 |
| Schéma 11 : Méthode d'analyse statistiques utilisée                                    | page 18 |
| Schéma 12 : Synthèses des résultats d'analyse  | page 23 |
| Schéma 13 : estimation des apports de kéfir sauvage face aux recommandations           | page 26 |



## Annexes

Annexe 1 – analyse personnelle du stage

Annexe 2 – définition et réglementation du kéfir selon le CODEX STAN 243-2003

Annexe 3 – semences utilisées pour la parcelle servant à l'expérimentation

Annexe 4 – méthode micro-ondes pour l'estimation de la matière sèche

Annexe 5 – produit inoculum Pioneer®

Annexe 6 – kéfir commercial Défi'flor®

Annexe 7 – graphiques de résultat des variables significatives à 8 jours de fermentation

Annexe 8 – graphiques de résultat des variables significatives à 10 semaines de fermentation

## Annexe 1 – Analyse personnelle du stage

A travers ce stage j'ai pu découvrir un nouvel environnement de travail, tourné principalement sur du conseil, mais pas uniquement. La recherche au sein des chambres d'agriculture prend une place importante, car elle permet d'expérimenter en toute transparence et en collaboration avec des agriculteurs afin que la recherche soit bien issue des questions qu'ils rencontrent. Le fonctionnement de ce type de recherche amène les personnes responsables de ces recherches à aussi avoir un volet conseil dans leur métier, leur permettant d'être en connexion avec le terrain. D'ailleurs un conseiller devrait être dans une recherche permanente, même bibliographique afin de se tenir informer des changements et des améliorations.

Le métier de recherche, développement et innovation sont très intéressants, car ce sont des métiers exigeants sur la précision des informations et l'interprétation. Ils peuvent cependant paraître rébarbatifs par la collecte, la mise en forme des données, la rédaction des rapports et publications scientifiques... Ces métiers demandent donc de la patience et de l'organisation pour garantir leurs bons déroulements. C'est alors le côté rébarbatif de ces métiers qui ne m'attire pas, car ces activités sont présentes sur des longues périodes (de plusieurs semaines à plusieurs mois).

Enfin un dernier élément important dans l'organisation d'une recherche est celui de la recherche de financement. Je n'ai pas participé à cette partie du projet, mais cet aspect est de plus en plus présent. Après discussion avec ma maître de stage et d'autres chercheurs, cette partie de la recherche me pose question. Cela semble aussi très contraignant. Fréquemment la recherche ne peut pas être menée dans son entièreté à cause de budget trop faible. Bien évidemment chaque entreprise et chaque situation est différente, pouvant rendre ce métier intéressant et attractif à mes yeux.

## Annexe 2 - définition et réglementation du kéfir selon le CODEX STAN 243-2003

|                                  |   |
|----------------------------------|---|
| Yaourt :                         | Cultures symbiotiques de <i>Streptococcus thermophilus</i> et <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> .   |
| Yaourt à base d'autres ferments: | Cultures de <i>Streptococcus thermophilus</i> et toute <i>Lactobacillus species</i> .   |
| Lait acidophile :                | <i>Lactobacillus acidophilus</i> .  |
| Kefir :                          | Levain préparé à partir de grains de kefir, <i>Lactobacillus kefiri</i> , espèces des genres <i>Leuconostoc</i> , <i>Lactococcus</i> et <i>Acetobacter</i> proliférant dans une relation spécifique étroite.<br>Les grains de Kefir constituent à la fois des levures de fermentation au lactose ( <i>Kluyveromyces marxianus</i> ) et des levures sans fermentation au lactose ( <i>Saccharomyces unisporus</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> et <i>Saccharomyces exiguus</i> ). |
| Kumys:                           | <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> et <i>Kluyveromyces marxianus</i> .   |

|  | Lait fermenté        | Yaourt, yaourt à base d'autres ferments et lait acidophile | Kefir                | Kumys                |
|--|----------------------|--|----------------------|----------------------|
| Protéine du lait <sup>(a)</sup> (% m/m)  | min. 2,7%            | min. 2,7%  | min. 2,7%            |                      |
| Matière grasse du lait (% m/m)   | inférieure à 10%     | inférieure à 15%   | inférieure à 10%     | inférieure à 10%     |
| Acidité titrable, exprimée en % d'acide lactique (% m/m)                                   | min. 0,3%            | min. 0,6%  | min. 0,6%            | min. 0,7%            |
| Ethanol (% vol./m)   |                      |  |                      | min. 0,5%            |
| Somme des micro-organismes constituant le levain défini à la section 2.1 (cfu/g, au total) | min. 10 <sup>7</sup> | min. 10 <sup>7</sup>                                       | min. 10 <sup>7</sup> | min. 10 <sup>7</sup> |
| Micro-organismes étiquetés <sup>(b)</sup> (ufc/g, total)                                   | min. 10 <sup>6</sup> | min. 10 <sup>6</sup>                                       |                      |                      |
| Levures (ufc/g)  |                      |  | min. 10 <sup>4</sup> | min. 10 <sup>4</sup> |

(a) La teneur en protéines est égale à 6,38 multipliée par la quantité totale d'azote Kjeldahl déterminée.

(b) S'applique lorsqu'une allégation nutritionnelle présente dans l'étiquetage fait référence à un micro-organisme spécifique (autre que ceux spécifiés dans la section 2.1 du produit en question) qui a été ajouté en tant que complément au levain spécifique.

Annexe 3 – semences utilisées pour la parcelle servant à l'expérimentation



Annexe 4 – méthode micro-ondes pour l'estimation de la matière sèche



## Analyse de la matière sèche au four à micro-ondes



2.7.x



Editeurs : Association pour le développement de la culture fourragère (ADCF), CH-1260 Nyon 1, en collaboration avec AGRIDEA, Jordils 1, CH-1000 Lausanne-6  
Auteurs : Pierre Aeby, Institut agricole Grangeneuve, rte Grangeneuve 31, CH-1725

La méthode permet de mesurer plus ou moins précisément en environ 45 minutes la teneur en matière sèche d'un fourrage à l'aide d'un four à micro-ondes.

Elle est particulièrement adaptée pour des échantillons de fourrages hâchés et où l'humidité est régulièrement répartie (par ex. ensilage de maïs ou d'herbe en coupe exacte).

*Les données chiffrées et indiquées dans la fiche sont données à titre indicatif.*

### Prélèvement d'un échantillon représentatif

Prélever un échantillon le plus homogène et représentatif possible du fourrage, en prenant plusieurs petites poignées sur toute la surface du tas. La précision du résultat de l'analyse dépend en grande partie du soin pris lors de cet échantillonnage.

Peser exactement un extrait d'au moins 100 grammes net, et le placer dans un récipient supportant les micro-ondes.

Idéalement peser au gramme près, ou mieux au dixième, et reporter dans le tableau au dos de la fiche.



*Attention à ne perdre aucun brin lors des manipulations, car l'extrait est petit : en fin de séchage, 1 gramme = environ 1% MS !*

### Séchage avec puissance dégressive

a) Placer l'extrait vert dans le four à la puissance de 1'000 watts pendant 4 minutes, sans couvrir.

b) Sortir le récipient, brasser l'extrait (attention, il est très chaud), sans rien perdre.

c) Laisser refroidir 2 minutes.

d) Baisser la puissance d'environ 1/4, et placer à nouveau l'extrait au four pendant 2-3 minutes.

e) Répéter b) et c).



*Rester constamment à côté du four : le fourrage peut se consumer ! Il ne doit jamais sentir le brûlé ou les marrons chauds (dans ce cas, l'éliminer et recommencer).*

*Pour limiter ce risque, placer une tasse d'eau dans le four.*

f) Poursuivre en abaissant par étape la puissance de 1/4 par 1/4 jusqu'au stade "décongélation", avec une durée de séchage de 2 minutes à chaque niveau de puissance.

g) Au stade "décongélation", peser une première fois l'extrait presque sec (utiliser le tableau au dos, pour chaque poids sec relevé).

h) Le remettre au four pendant 1-2 minutes toujours à la puissance "décongélation", repeser, et répéter l'opération tant qu'il y a encore des différences de poids.

i) Lorsqu'il n'y a plus aucune différence entre 2 passages au four, l'extrait est sec. Ce poids sec final est utilisé pour le calcul de la teneur en MS.

☞ *Il est possible de sécher 2 extraits dans le même laps de temps : pendant que l'un est en phase de séchage dans le four, l'autre est brassé et refroidi.*

### Calcul de la teneur en matière sèche

| extrait                              | exemple (maïs<br>12 septembre) |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|--------------------------------------|--------------------------------|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
| poids vert net sans récipient (en g) | 125.0                          |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| poids sec net 1 (en g)               | 45.4                           |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| poids sec net 2                      | 41.2                           |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| poids sec net 3                      | 38.1                           |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| poids sec net 4                      | 37.2                           |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| poids sec net 5                      | 36.8                           |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| poids sec net 6                      | 36.8                           |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| poids sec net 7                      | -                              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| poids sec net 8                      | -                              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| <b>Teneur en % MS</b>                | <b>29.4</b>                    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| <i>100 x poids sec/poids vert</i>    |                                |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

Remarque : la teneur en MS obtenue avec cette méthode est généralement de 1 à 2% de MS plus haute qu'avec l'analyse de référence en laboratoire (eau résiduelle difficile à extraire).

### Avantages et inconvénients de la méthode

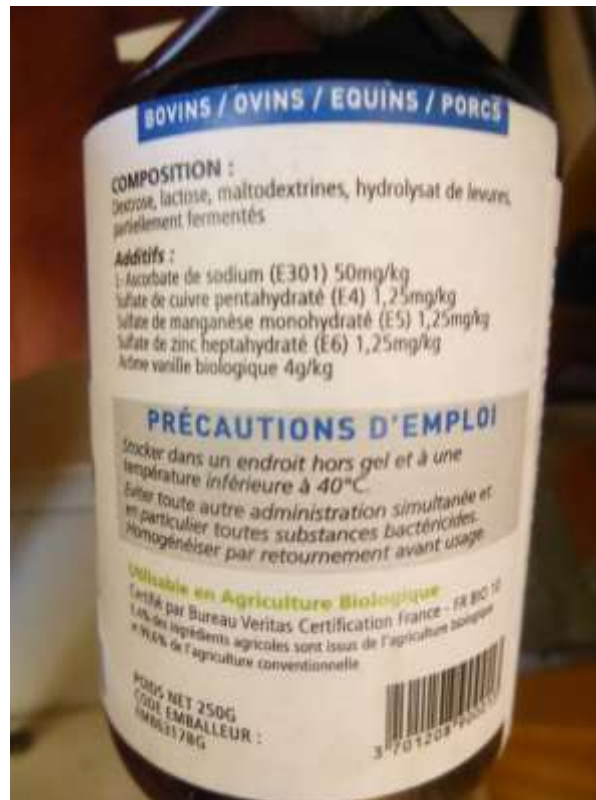
| Avantages  | Inconvénients                                       |
|--|---|
| rapide (compter 45 minutes, sans l'échantillonnage)            | méthode comportant une certaine imprécision         |
| analyse possible de plusieurs secteurs d'un silo (front, bord) | échantillonnage soigneux (petite quantité analysée) |
| coûts  | risque d'incendie                                   |

# TROUVEZ LA CLÉ ADAPTÉE À VOTRE SITUATION

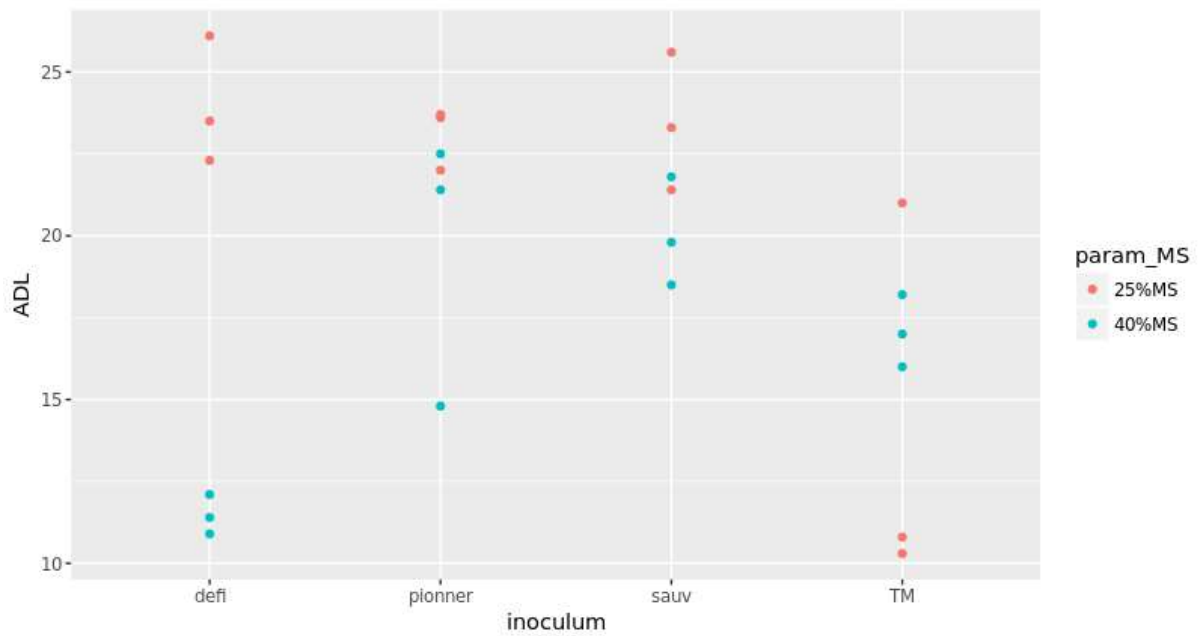
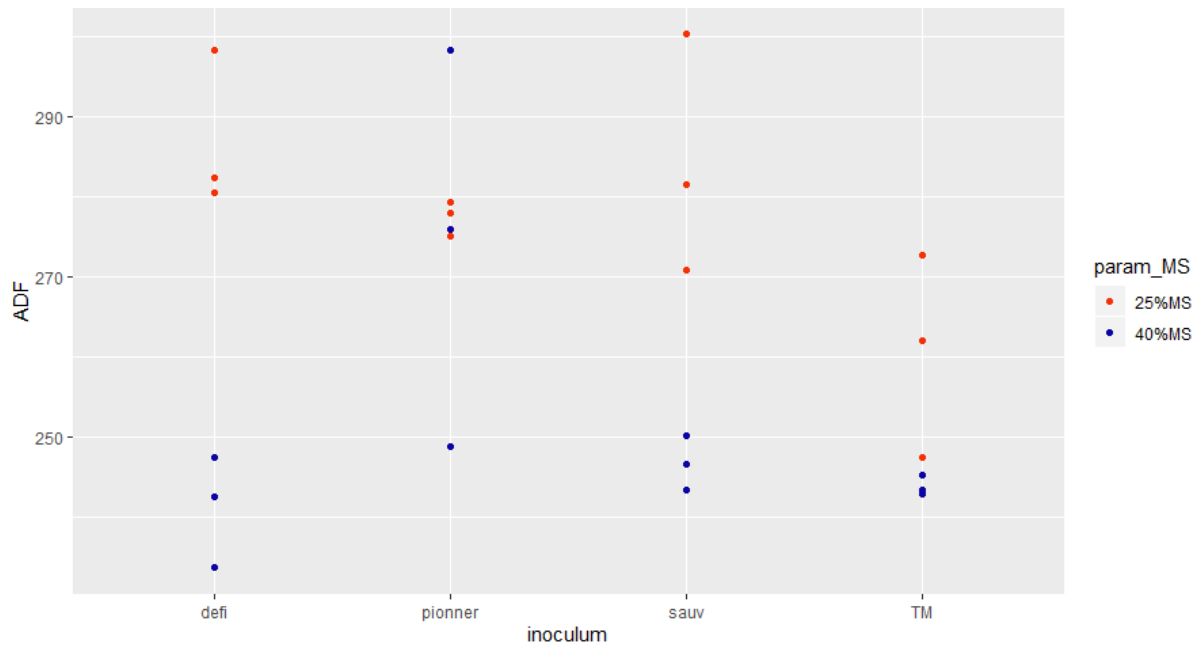
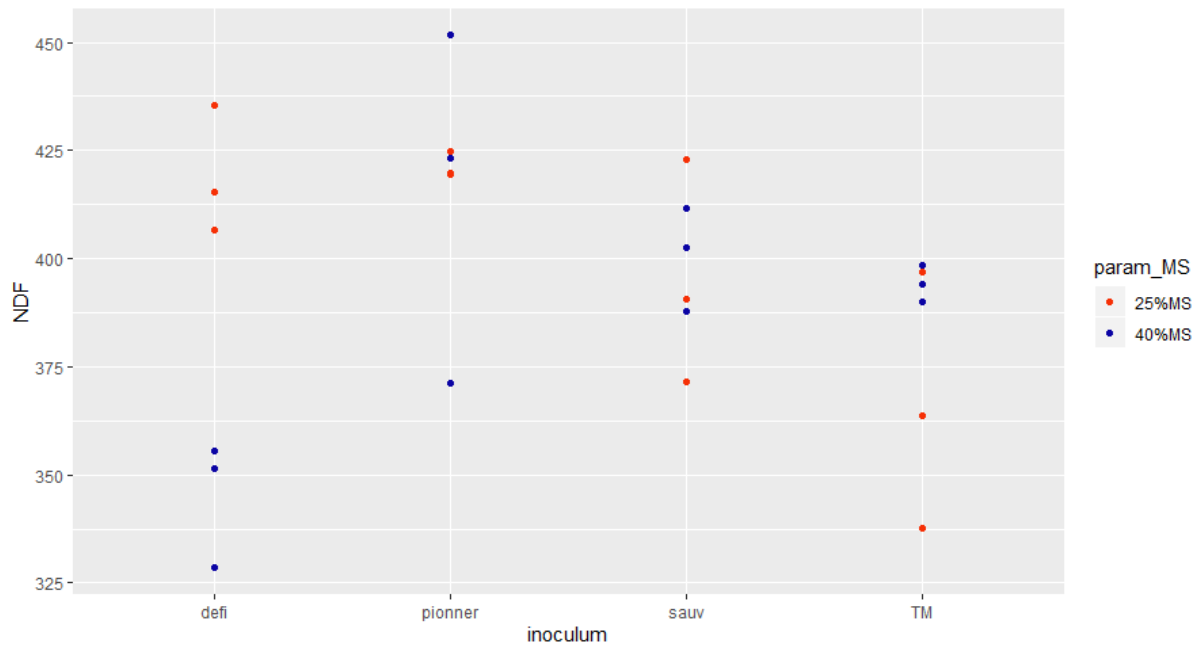


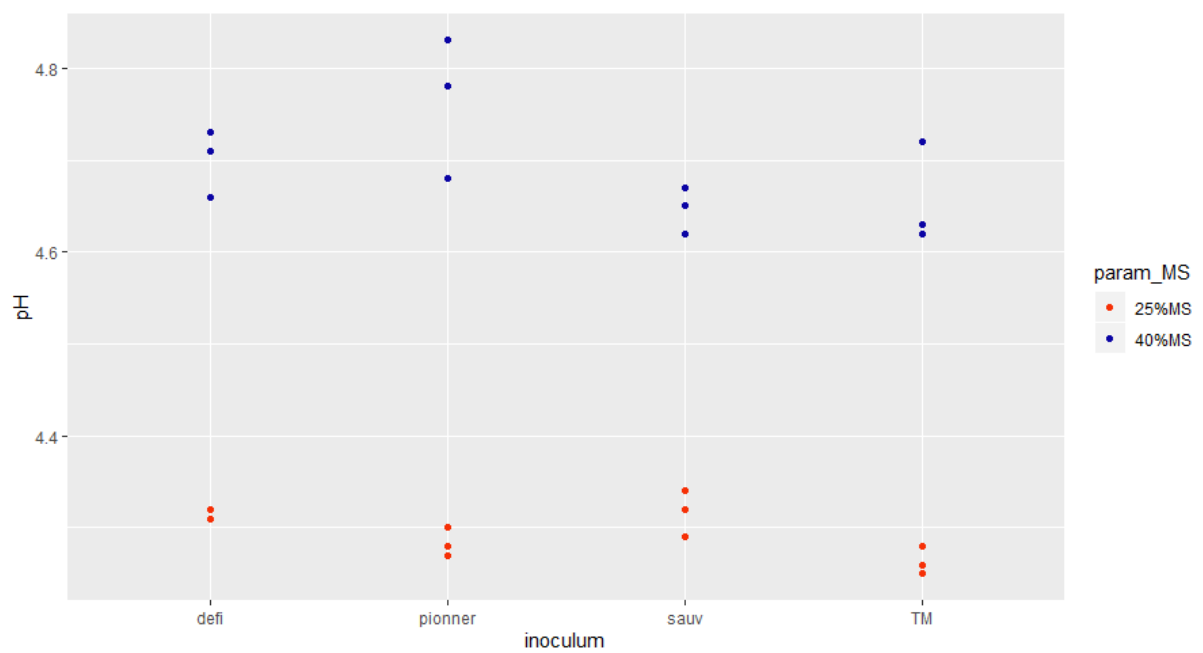
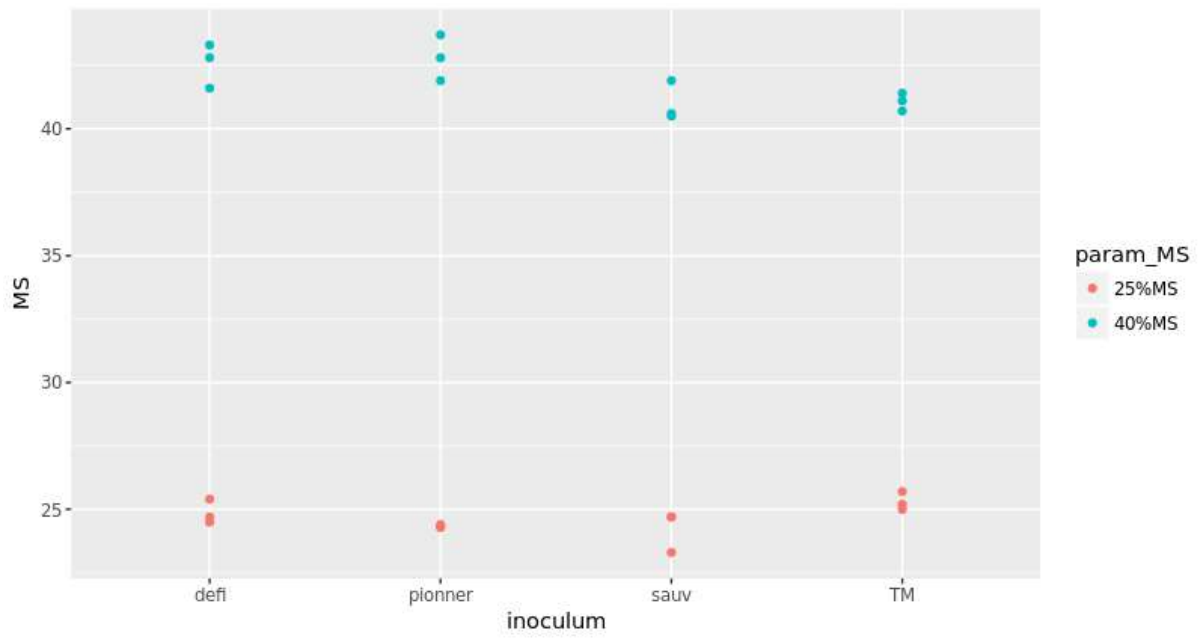
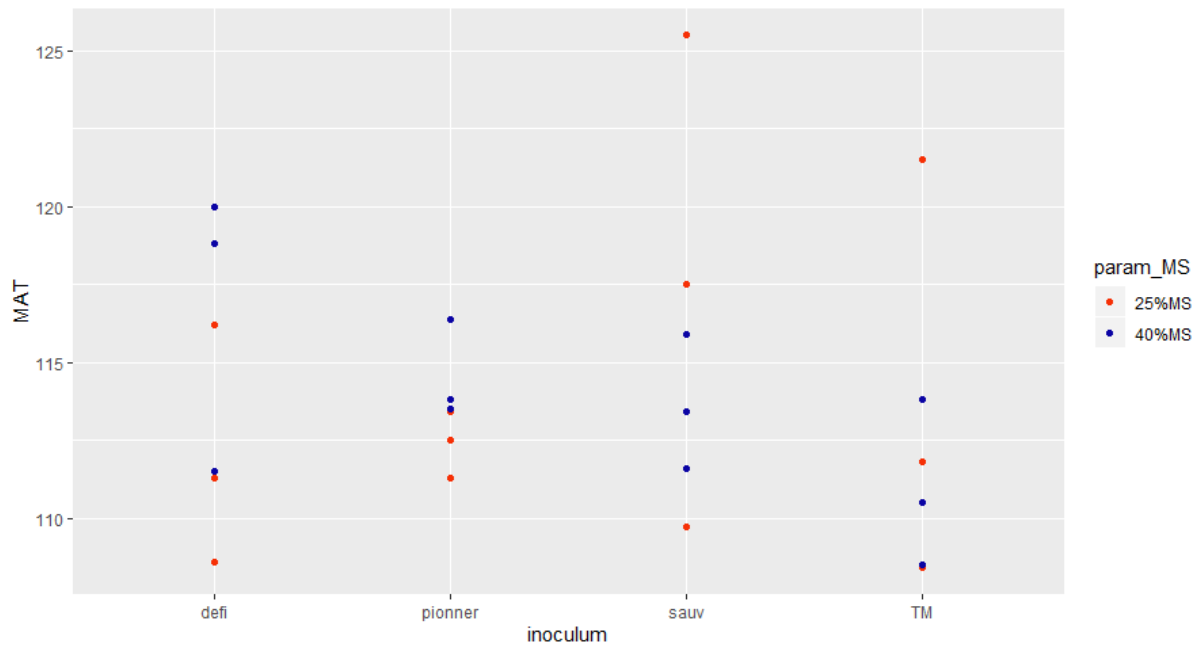
|                               |  | 1. Situation de récolte   | 2. Objectif  | 3. Produits recommandés                 |
|-------------------------------|--|---|--|---|
| Herbe<br>Prairies temporaires |  | Herbe < 25% de MS   | <b>Réduction des butyriques</b><br>Réduction de la dégradation des protéines                         | Pioneer® 1188/<br>SILA-BAC®             |
|                               |  | Herbe > 25% de MS<br>mais ensilée sous la pluie                       | <b>Réduction des échauffements</b><br>Accélération de la baisse du pH                                | Pioneer® 11G22/<br>SILA-BAC® Kombi      |
|                               |  | Préfanée (> 25% MS)<br>et de bonne qualité<br>(Cellulose brute < 23%) | <b>Amélioration de la qualité des fibres</b><br>Stabilisation du silo                                | Pioneer® 11GFT                          |
| Céréales immatures            |  | Mélange de céréales<br>et de protéagineux (Métail)                    | <b>Réduction des échauffements</b><br>Accélération de la baisse du pH                                | Pioneer® 11G22/<br>SILA-BAC® Kombi      |
|                               |  | Céréales immatures pures  | <b>Réduction des échauffements</b>   | Pioneer® 11A44/<br>SILA-BAC® Stabilizer |
| Luzerne                       |  | Préfanée  | <b>Acidification rapide</b><br>Réduction de la dégradation des protéines                             | Pioneer® 11H50                          |
|                               |  | Préfanée<br>(35% MS mini)   | <b>Amélioration de la digestibilité des fibres des luzernes mures</b><br>Réduction des échauffements | Pioneer® 11AFT                          |
| Mais pour méthaniseur         |  | Production de biogaz  | <b>Amélioration de la production de méthane (+8%)</b>  | Pioneer® 11CH4                          |
| Mais fourrage                 |  | Tous types de maïs  | <b>Ouverture rapide du silo</b><br>Réduction des butyriques  | Pioneer® 1188/<br>SILA-BAC®             |
|                               |  | Tous types de maïs  | <b>Amélioration de l'acidification du maïs</b>   | Pioneer® 1132                           |
|                               |  | Entre 26%<br>et 50% de MS   | <b>Réduction des échauffements</b><br>Amélioration de la fraîcheur<br>et de la stabilité à l'air     | Pioneer® 11A44/<br>SILA-BAC® Stabilizer |
|                               |  | Maïs > 28% de MS  | <b>Amélioration de la digestibilité des fibres</b><br>Stabilisation du silo                          | Pioneer® 11CFT                          |
| Maïs grains humides           |  | Entre 25% et<br>40% d'humidité  | <b>Acidification et stabilisation des maïs grains humides (porcs)</b>                                | Pioneer® 11B91                          |
|                               |  | Entre 25% et<br>40% d'humidité  | <b>Stabilisation des maïs grains humides (bovins)</b>  | Pioneer® 11A44/<br>SILA-BAC® Stabilizer |

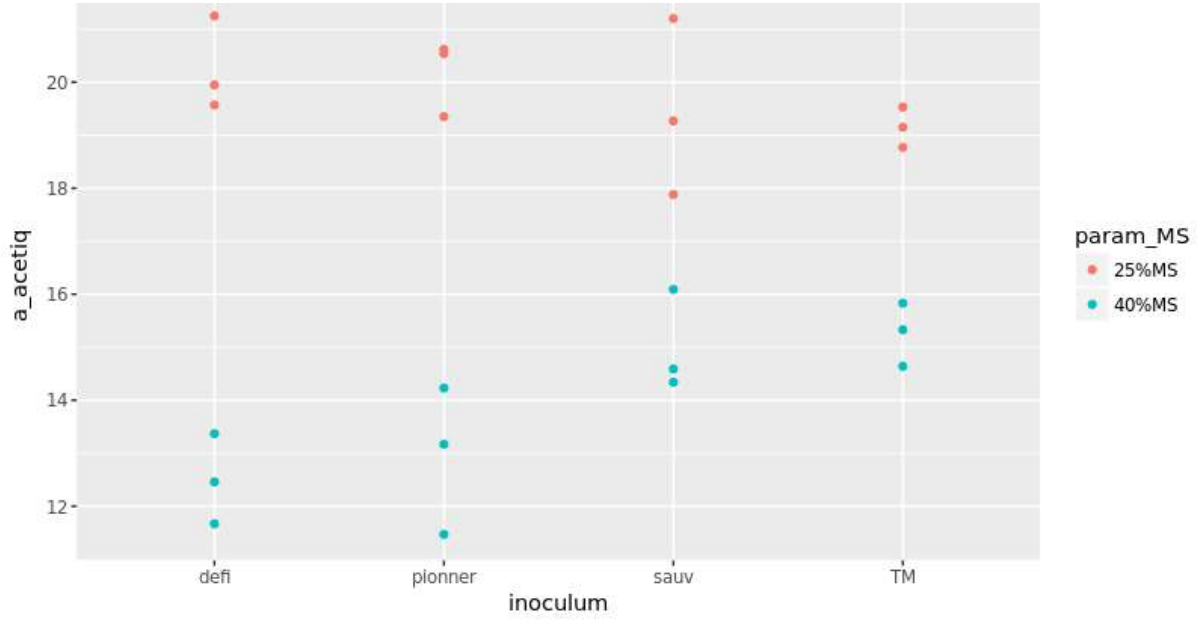
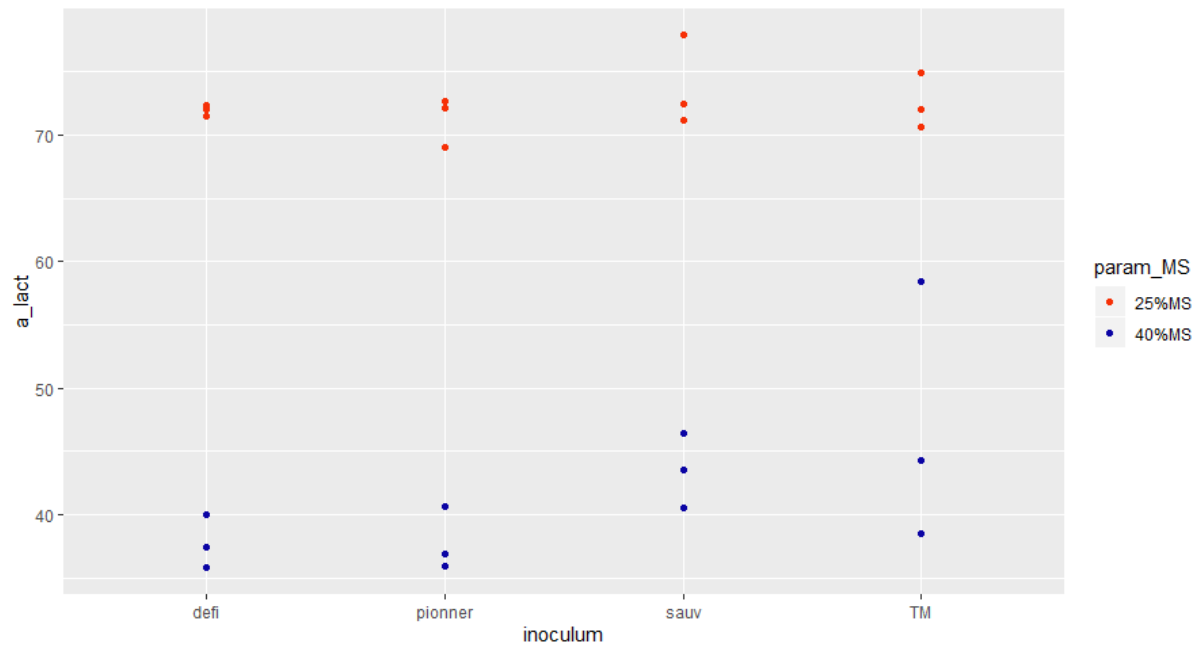
Annexe 6 - kéfir commercial Défi'flor®

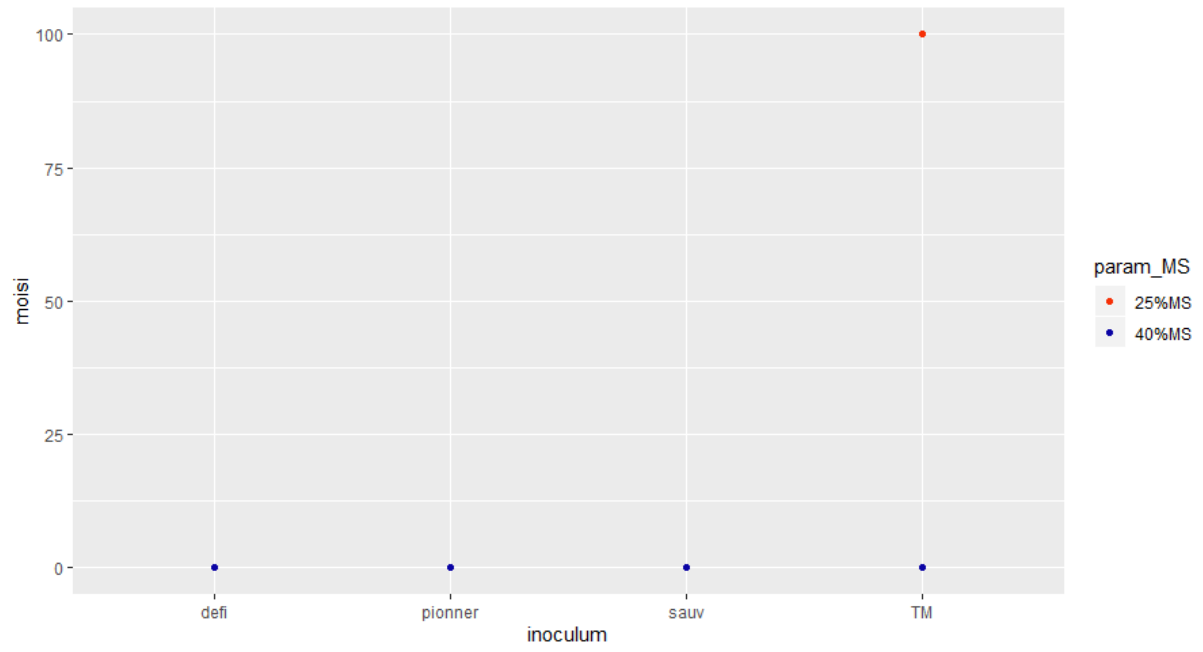
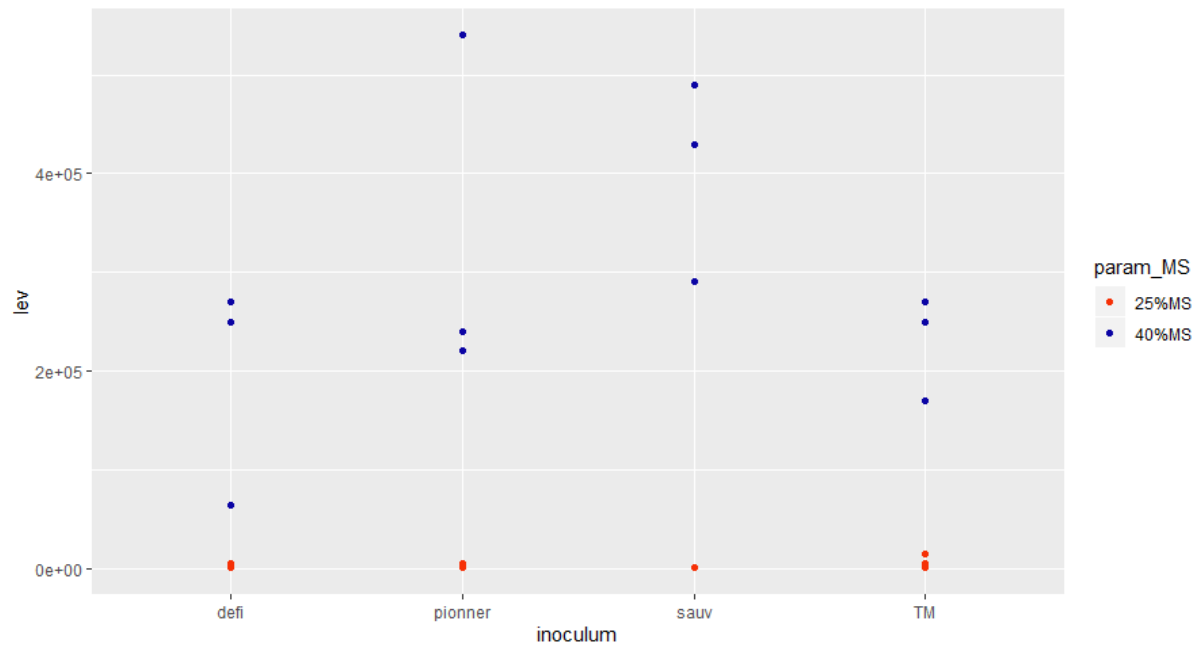


## Annexe 7 – graphiques de résultat des variables significatives à 8 jours de fermentation











Annexe 8 – graphiques de résultat des variables significatives à 10 semaines de fermentation

