Influence de l'épandage de différents types de lisiers sur la contamination des fourrages et du sol par des spores de Clostridium

Partie II

EFFETS DES EPANDAGES REPETES DANS L'ANNEE DE LISIER LIQUIDE SUR LA CONTAMINATION DU SOL, DE L'HERBE VERTE, FANEE OU ENSILEE

par

Ph. GOUET, M. CONTREPOIS et P. CORROT

*Laboratoire de Microbiologie - Centre de Recherches de Clermont-Ferrand
(63) Saint-Genès Champanelle*

Les contraintes zootechniques, agronomiques, économiques et climatiques obligent fréquemment les éleveurs à répandre du lisier à plusieurs reprises sur une même parcelle. Ces épandages répétés entraînent une pollution bactérienne intense des prairies qui risque d'avoir des répercussions sur la conservation des fourrages, particulièrement lorsqu'elle procède par voie fermentaire comme dans le cas de l'ensilage. Cette étude se propose d'examiner les effets de plusieurs épandages de lisiers liquides sur la contamination du sol, du fourrage vert, puis fané ou ensilé, par les spores de bactéries anaérobies.

PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Une prairie temporaire de fétuque est divisée en trois parcelles rectangulaires de 0,7 ha chacune. La première ne reçoit pas de lisier et sert de témoin (T) alors que la seconde (S) est arrosée de lisier (LE) dilué d'animaux ayant consommé de l'ensilage et la troisième (F) de lisier (LF) d'animaux nourris au foin exclusivement.

La répartition des épandages et des prélèvements d'échantillons de fourrage est présentée dans le tableau 1.

La première coupe, récoltée le 3 mai, est ensilée dans des silos de 1m³ (2 silos par parcelle) sans adjonction de produits de conservation. La seconde coupe est fanée le 16 juillet.

TABLEAU 1. — Répartition des épandages de lisier et des prélèvements d'échantillons

Dates d'épandages ou de prélèvements	11/3	12/3	13/3	2/4	4/4	5/4	3/5	15/5	16/5	16/6	22/7
Récolte des fourrages							coupe ensilée				coupe fanée
N° des épandages (E) ou Prélèvements (P)	P ₁	E ₁	P ₂	P ₃	E ₂	P ₄	P ₅	P ₆	E ₃	P ₇	P ₈

La pluviométrie est relevée chaque jour, mais on a seulement reproduit dans le tableau 2 la pluviométrie totale durant la période expérimentale avec la moyenne et les extrêmes journaliers ainsi que le nombre de jours de pluies.

Echantillonnage et analyses

Des prélèvements (P_1 à P_8 du tab. 1) d'une centaine de g de fourrage et d'une dizaine de g de terre sont effectués tous les 5 m sur chaque diagonale des trois parcelles. Après homogénéisation on conserve pour chaque parcelle un échantillon de 1 kg de fourrage ou de terre. Après dilution et brassage l'échantillon de lisier est prélevé au moment de l'épandage à la sortie de la cuve à raison de 1 l par m³.

Dans le lisier, la terre, l'herbe, l'ensilage et le foin, on dénombre la totalité des spores de bactéries anaérobies sur milieu RCM (Hirsch, Grinstead, 1954) ; les spores de bactéries anaérobies protéolytiques ou fermentant le lactate sont dénombrées sur milieu liquide à la gélatine pour les premiers et au lactate pour les seconds selon les compositions et la méthode préconisées par Rosenberger (1961).

Dans les ensilages, on dose l'azote ammoniacal (Conway, 1950), l'acide lactique (Barnett, 1951), et les acides gras volatils (Zelter, Leroy, 1958) et on détermine le taux de matière sèche.

RESULTATS

Analyses des lisiers et des fourrages verts

La concentration en spores (fig. 1) des « lisiers de foin » des deux premiers épandages (E_1 , E_2) est comprise entre $0,5 \cdot 10^2$ et $2,5 \cdot 10^3$ par ml ; les « lisiers d'ensilage » correspondants sont nettement plus riches et on peut dénombrer suivant les milieux de 10 à 500 fois plus de spores ($5 \cdot 10^3$ - $8 \cdot 10^4$ spores/ml). Au troisième épandage (E_3) par contre les deux lisiers sont très semblables par leur nombre de spores. Les trois « lisiers d'ensilage » sont donc comparables entre eux alors que le troisième « lisier de foin » est beaucoup plus contaminé que les deux précédents.

Tout au long de la période expérimentale (10 mars - 22 juillet), la contamination du fourrage de la parcelle témoin T est restée sensiblement constante (fig. 1) : 10^2 à 10^3 /g pour la microflore anaérobie sporulée totale et 10 à 10^2 /g pour les protéolytiques et la microflore fermentant le lactate. Avant le premier épandage (E_1) la contamination du fourrage de chaque parcelle est très voisine : 10^3 /g pour la microflore anaérobie sporulée totale, 10^2 pour les protéolytiques et 10 à 10^2 /g pour les bactéries lactate⁺.

Le premier « lisier de foin », très peu contaminé, ne renferme que 350 spores/ml sur RCM alors que le « lisier d'ensilage » correspondant en contient 80 000 par ml.

Fig. 1 : Cette figure présente d'une part les concentrations en spores (par ml) dans les lisiers épandus, d'autre part l'évolution du nombre de spores (par g) sur les fourrages au cours des huit prélèvements effectués (P₁ à P₈). Les flèches simples, doubles ou triples représentent respectivement le premier, le second et le troisième épandage de lisier. Les trois secteurs séparés par les traits les plus épais permettent de distinguer les microflores totales (MT), protéolytique (MPr), fermentant le lactate (ML⁺).

Après le premier épandage (E_1) de « lisier de foin » (parcelle F, prélèvement P_2) le nombre de spores des différentes espèces augmente de 2 à 5 fois selon le milieu, alors qu'en présence de « lisier d'ensilage » (parcelle S) l'augmentation atteint 15 à 60 fois ; le nombre de spores lactate⁺ n'a pas doublé dans le premier cas mais il a progressé de 15 fois dans le second.

Dans les 3 semaines qui suivent le premier épandage, la pluviométrie atteint 25,1 mm (tabl. 2) et au troisième prélèvement (P_3) le nombre de spores diminue nettement pour devenir à nouveau sensiblement égal à celui de P_1 pour les fourrages des parcelles T et F. Par contre le fourrage de la parcelle S (« lisier d'ensilage ») reste nettement plus contaminé.

A la suite du second épandage (E_2) la contamination remonte et dépasse même le niveau atteint lors du premier épandage (prélèvement P_1). Ces lisiers restent comparables aux deux premiers : la microflore lactate + du « lisier d'ensilage » LE_3 est cinq fois plus nombreuse que celle de LE_1 et trente fois plus que celle de LF_2 .

Au prélèvement P_3 , soit 1 mois après le second épandage (31 mm d'eau), lors de la coupe pour l'ensilage, la concentration en spores a diminué pour les fourrages T et F mais la parcelle S reste nettement plus contaminée que les deux autres.

Le prélèvement P_4 effectué sur la repousse, 12 j après la coupe montre des résultats identiques entre T et F, mais la contamination, bien que faible (5.10^6 /g) est encore nettement plus importante pour S.

Le « lisier d'ensilage » du troisième épandage (E_3) est plus riche en spores que celui du foin, exception faite de la microflore protéolytique. Le prélèvement qui suit, effectué 1 mois après l'épandage (20 mm de pluie) montre pour F et S une contamination dix à vingt fois supérieure à celle de T. On retrouve encore cet écart 2 mois après ce troisième épandage (95 mm d'eau), au moment de la récolte fanée.

Analyses de terre (fig. 2)

Dans les sols T, F ou S, les microflores anaérobies sporulées protéolytiques et surtout lactate⁺ ne constituent le plus souvent que le $1/10^6$ ou le $1/100^6$ de la microflore totale anaérobie et chacune de ces microflores est numériquement comparable à celles que l'on trouve dans le lisier ou sur les fourrages.

L'analyse statistique montre que la terre F contient un nombre de germes significativement supérieur aux terres T et S qui ne peuvent être distinguées. Le classement selon le degré de contamination effectué pour les prélèvements du sol ne révèle de différences significatives qu'entre les deuxième et troisième (5 p. 100), et troisième et quatrième prélèvements (20 p. 100). Il ne semble pas possible de distinguer statistiquement l'effet des épandages pris individuellement.

TABLEAU 2. — Répartition de la pluviométrie du début à la fin des essais

	mm de pluie Total	Nombre de jours de pluie	Moyennes et extrêmes (mm par jour de pluie)
Après le 1 ^{er} épandage (12 mars - 3 avril)	32	8	4 0,6 - 9,6
Du 2 ^{me} épandage à la 1 ^{re} coupe (4 avril - 3 mai)	52	10	5,2 0,1 - 22,5
Du 3 ^{me} épandage à la 2 ^{me} coupe (16 mai - 22 juillet)	93	25	3,3 0,2 - 14,9

Fig. 2 : Cette figure présente l'évolution de la concentration en spores dans les terres des trois parcelles au cours des prélèvements P_1 à P_7 . Les flèches simples, doubles ou triples situent respectivement le moment des premier, second et troisième épandages. Les trois secteurs séparés par les traits les plus épais permettent de distinguer les parcelles témoin (T), « lisier de foin » (F) et « lisier d'ensilage » (S).

Analyses des ensilages et foins (tab. 3)

Alors que le fourrage de la parcelle témoin a été récolté à 21 p. 100 de matière sèche (M.S.), les fourrages des parcelles F et S ont été légèrement préfanés (27 p. 100 - 29 p. 100 de M.S.). Les ensilages correspondants sont tous de mauvaise qualité : pH élevés (5 - 5,6),

concentrations importantes d'acide butyrique (2,5 - 3,8 p. 100 M.S.) et 16 à 29 p. 100 d'azote ammoniacal.

Ces résultats sont confirmés par les dénombrements bactériologiques : la microflore fermentant le lactate domine très nettement parmi les anaérobies sporulés (10^6 /g) mais on ne décèle pas de différences entre les ensilages T, F et S.

Les foins sont très différents des ensilages : d'une part le nombre total des spores est 1 000 fois plus faible et d'autre part la microflore fermentant le lactate est très nettement sous-dominante. Les foins ayant reçu du lisier de foin ou d'ensilage sont plus contaminés que le témoin.

DISCUSSION

Malgré la faible concentration en spores des lisiers utilisés dans ces expériences, leur épandage s'est toujours traduit par une augmentation du nombre de ces spores sur le fourrage ce qui confirme nos résultats antérieurs (Gouet, Contrepois, Corrot, 1971). De même le nombre de spores tend à régresser sous l'effet de la pluie et de la pousse de l'herbe mais la différence avec le témoin reste marquée, tout au moins dans l'intervalle des épandages ou des coupes.

La répétition des épandages n'a pas entraîné d'effet cumulatif au niveau du fourrage alors que cet effet tend à se manifester dans le sol.

Au niveau des ensilages aucune relation n'est apparue entre leur qualité et l'origine du lisier, bien que le fourrage (S) ayant reçu du « lisier d'ensilage » contienne vingt à cinquante fois plus de spores fermentant le lactate que les deux autres (T, F). En fait, il est probable que l'effet du nombre de spores, dans la mesure où il reste assez faible (10^2 - 10^3 /g) doit être le plus souvent masqué par les conditions de milieu qui règnent dans l'ensilage (pH, rH, équilibres bactériens) et qui déterminent le développement des *Clostridium*.

Dans le cas du foin on a remarqué que la contamination était faible et qu'elle restait comparable à celle du fourrage vert (P_s). La terre apportée au cours du ramassage n'a donc pas sensiblement pollué le fourrage, celui-ci ayant déjà, du fait de l'apport de lisier, une concentration en spores voisine de celle du sol.

En conclusion, il ne semble donc pas que l'apport répété de lisiers sur une prairie ait des conséquences néfastes vis-à-vis des foins et des ensilages dans la mesure où le lisier est peu contaminé et que le dernier épandage se situe au moins 1 mois avant la récolte. Il est donc probable, dans ces conditions, que l'épandage de lisiers ne doit pas avoir de répercussion notable sur la contamination du lait et ne doit pas augmenter les risques de gonflement butyrique des

TABLEAU 3. — Qualité chimique des ensilages ; nombres de spores de *Clostridium* trouvées dans les ensilages et dans les foins

	Matière sèche corrigée (p. 100)	pH	N NH ₃ p. 100 N total	p. 100 de matière sèche				Nombre de spores (en milliers par g)		
				Ac. lactique	Ac. acétique	Ac. propionique	Ac. butyrique	Total	Protéolytique	Lactate +
Ensilages										
Témoin 1**	21,8	5,57	28,0	0,10	3,17	1,64	2,97	6 400	120	4 000
Témoin 2**	21,4	5,57	28,8	0,19	3,36	1,73	3,29	5 500	650	3 500
LF* 1	28,7	5,33	17,5	0,20	2,10	0,43	2,46	2 900	180	1 800
LF* 2	29,0	5,48	20,9	0,60	1,43	0,53	3,40	1 800	13	1 800
LE* 1	26,9	4,92	15,6	2,20	1,26	0,37	3,82	1 350	13	1 400
LE* 2	27,0	5,22	18,8	1,17	2,44	0,33	3,39	9 700	3	9 700
Foins										
Témoin 1								1,5	0,2	0,04
Témoin 2								0,2	0,13	0,03
LF 1								3,5	0,2	0,7
LF 2								3,5	0,7	0,07
LE 1								30	0,2	0,5
LE 2								3	0,2	0,05

*LF = Ensilage dont le fourrage provient de la parcelle arrosée avec du « lisier de foin ».

*LE = Ensilage dont le fourrage provient de la parcelle arrosée avec du « lisier d'ensilage ».

**1 - 2 = 1^{er} et 2^{me} échantillons

gruyères. Toutefois les résultats mériteraient d'être confirmés par des essais d'épandages renouvelés durant plusieurs années consécutives.

L'étude de la contamination des fourrages par les lisiers de polygastriques a été limitée ici aux aspects susceptibles d'avoir une répercussion en technologie laitière. On pourrait cependant généraliser, avec quelques nuances, les résultats obtenus, à d'autres espèces bactériennes, certes moins résistantes que les sporulés mais souvent beaucoup plus nombreuses et fréquentes dans le tractus digestif des ruminants jeunes ou adultes : *Escherichia coli* pathogènes provenant de veaux diarrhéiques, Salmonelles, Brucelles. Pour réduire les risques de pollution qui peuvent s'aggraver avec l'augmentation du nombre et des dimensions des étables ou ateliers d'élevage sans paille, il est utile, pour le moment, que les conditions sanitaires d'épandage des lisiers soient rappelées aux praticiens, en attendant de pouvoir appliquer aux lisiers des traitements d'épuration systématiques.

Résumé

La répartition des épandages de lisier sur une même prairie temporaire risque d'augmenter la contamination bactérienne des fourrages et du sol. En 2 mois, on répand à 3 reprises sur une première parcelle du lisier de ruminants nourris au foin et sur une seconde parcelle du lisier de ruminants nourris à l'ensilage ; une troisième parcelle sert de témoin. On dénombre dans les lisiers, sur l'herbe verte puis fanée ou ensilée et dans le sol superficiel, les *Clostridium* protéolytiques ou fermentant le lactate.

Les résultats montrent que l'épandage des lisiers entraîne toujours une augmentation du nombre de spores sur le fourrage vert. On ne remarque cependant pas d'effet cumulatif sur le fourrage alors que cet effet tend à se manifester dans le sol.

La contamination du foin est faible et celle des ensilages semble dépendre beaucoup plus des facteurs de la conservation que de la contamination initiale.

Summary

Effect of spreading different types of manure contamination of forages and of the soil by Clostridium spores

Part II

Effects on contamination of the soil, green grass and wilted or ensiled grass when liquid manure is repeatedly spread during the year

When manure is repeatedly spread on the same temporary prairie, bacterial contamination of forages and soil tends to increase. The manure of ruminants fed on hay was spread three times in two months

on one plot, and on a second plot the manure of ruminants fed with ensilage was spread. The third plot served as a control. Proteolytic *Clostridium*, or those fermenting the lactate, were counted on the green grass and then on the wilted or ensiled grass as well as in the top soil.

Results show that spreading manure always causes an increase in the number of spores on the green forage. However, no cumulative effect was seen on the forage while it was observed in the soil.

Hay contamination was low, and ensilage contamination seemed to depend more on storage factors than on initial contamination.

Références bibliographiques

- BARNETT (A. J. G.) (1951). — The colorimetric determination of lactic acid in silage. *Biochem. J.*, 49, 527-538.
- CONWAY (E. J.) (1950). — Microdiffusion and volumetric error. 4^{me} Edit. Grosby Lockwood and son, London.
- GOUET (Ph.), CONTREPOIS (M.), CORROT (P.) (1972). — Influence de l'épandage de différents types de lisiers sur la contamination des fourrages et du sol par des spores de *Clostridium*. I. Influence de l'origine du lisier, de sa fluidité et de l'épaisseur du tapis végétal sur la contamination de l'herbe et du sol. *Le Lait*, LII, 515-516, 360-371.
- ROSENBERGER (R. F.) (1951). — The development of methods for the study of obligate anaerobes in silage. *Proc. Soc. Appl. Bact.*, 14, 161-164.
- ZELTER (S. Z.), LEROY (F.) (1958). — Azote uréique et activité bactérienne in vitro au niveau du rumen. *Ann. Zootech.*, 3, 173-183.
-