



Influence de l'épandage de différents types de lisiers sur la contamination des fourrages et du sol par des spores de Clostridium. Partie I. INFLUENCE DE L'ORIGINE DU LISIER, DE SA FLUIDITE ET DE L'EPAISSEUR DU TAPIS VEGETAL SUR LA CONTAMINATION DE L'HERBE ET DU SOL

Ph. Gouet, M. Contrepolis, P. Corrot

► To cite this version:

Ph. Gouet, M. Contrepolis, P. Corrot. Influence de l'épandage de différents types de lisiers sur la contamination des fourrages et du sol par des spores de Clostridium. Partie I. INFLUENCE DE L'ORIGINE DU LISIER, DE SA FLUIDITE ET DE L'EPAISSEUR DU TAPIS VEGETAL SUR LA CONTAMINATION DE L'HERBE ET DU SOL. *Le Lait*, 1972, 52 (515_516), pp.360-371. hal-00928591

HAL Id: hal-00928591

<https://hal.science/hal-00928591>

Submitted on 11 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

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

Partie I

INFLUENCE DE L'ORIGINE DU LISIER, DE SA FLUIDITE ET DE L'ÉPAISSEUR DU TAPIS VÉGÉTAL SUR LA CONTAMINATION DE L'HERBE ET DU SOL

par

Ph. GOUET, M. CONTREPOIS et P. CORROT

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

La contamination bactérienne des fourrages et des sols des prairies de fauche ou de pâture par épandage de lisier n'a pas fait l'objet de recherches particulières. En effet, cette très ancienne technique était jusqu'à présent restée cantonnée aux régions montagneuses, et son innocuité dans les conditions géographiques, climatiques et alimentaires propres aux troupeaux de montagne était reconnue. Or l'évolution des techniques de culture ou d'élevage a entraîné, ces dernières années, un développement des étables à lisier et leur extension dans les zones d'élevage de plaine où il n'est pas certain que la même innocuité puisse être obtenue.

Contrairement aux bouses qui polluent localement la prairie et représentent essentiellement l'indigestible des aliments consommés dans les 2 à 4 j qui précèdent l'excrétion, le lisier est réparti de façon uniforme et englobe la totalité des excréments d'un troupeau produites durant plusieurs semaines. Ainsi, il augmente notablement la surface, l'intensité et la variété de la pollution. Parmi les bactéries que l'on identifie (Willssens, Buttiaux, 1958) dans les fèces des ruminants, les *Bacillus* et les *Clostridium*, généralement non pathogènes, survivent très longtemps aussi bien dans le lisier ou sur le sol que sur le fourrage en raison de leur possibilité de former une spore. Alors que les *Bacillus* sont des hôtes permanents de l'intestin du ruminant les *Clostridium* ne paraissent pas y être implantés. Leur origine et leur présence temporaire est à rechercher dans des aliments ingérés (pulpes, drèches, fourrages verts, fanés ou ensilés) et

leur importance numérique varie avec le degré de contamination de ceux-ci (Bergère et *al.*, 1969 ; Gouet, Contrepois, 1971 ; Contrepois, Gouet, Sauvart, 1971). Or la mécanisation de la fénaison et du ramassages des fourrages, la précocité des récoltes réalisées dans de mauvaises conditions atmosphériques tendent à augmenter la pollution par la terre et la prolifération bactérienne et fongique au cours du séchage. La distribution d'aliments ensilés de mauvaise qualité accroît encore plus nettement la concentration des spores dans les fécès qui passe de 10^2 ou 10^3 à 10^6 /g (Bergère et *al.*, 1968). On peut alors se demander, devant le développement des étables à lisier et compte tenu d'une hygiène de la traite généralement défectueuse, si ces bactéries fécales thermo-résistantes, ne risquent pas de constituer une source nouvelle et permanente de contamination du lait. Ce problème est susceptible de se poser en premier lieu dans les régions où se fabriquent, traditionnellement ou non, des fromages du type gruyère à cause des risques de gonflement, mais aussi dans les bassins laitiers où une part importante du lait est destinée à la consommation en nature sous forme liquide après avoir été soumis, soit à un traitement de pasteurisation, soit même à un traitement de stérilisation.

On peut considérer a priori que le degré de contamination d'un fourrage par du lisier est déterminé par quatre paramètres :

- l'épaisseur et la densité du tapis végétal qui ralentit le lisier dans son cheminement vers le sol,
- la concentration bactérienne du lisier qui dépend elle-même, dans le cas des espèces sporulées, du type d'aliment présenté aux animaux : fourrage vert, foin, ensilage,
- la fluidité du lisier,
- la pluviométrie qui peut ou non précéder, accompagner ou suivre l'épandage.

Ce travail se propose d'étudier dans une première partie l'influence des trois premiers paramètres sur la contamination des fourrages par épandage de lisier et se limite à enregistrer le dernier.

Une seconde partie aborde l'effet d'épandages répétés (Gouet, Contrepois, Corrot, 1972).

PROTOCOLE EXPERIMENTAL

1) Disposition des parcelles

Dans une prairie permanente, n'ayant jamais reçu ni fumier, ni lisier, 15 parcelles de 5×5 m sont délimitées par des allées larges de 1,20 m. Les allées et 5 parcelles d'une même rangée sont fauchées à 5 cm de hauteur (herbe rase, lot I), alors que 5 autres (herbe moyenne, lot II) le sont à 10 cm. Les 5 dernières (herbe haute, lot III) sont laissées intactes, le fourrage atteignant une quinzaine de

centimètres d'épaisseur. Chaque type de parcelles est arrosé le même jour de lisier épais ou dilué, provenant d'animaux nourris au foin ou à l'ensilage. Pour chaque épaisseur de fourrage, une parcelle témoin (T I, T II, T III) ne reçoit pas de lisier. Il y a donc au total 12 parcelles traitées et 3 servant de témoin (tab. 1). Le traitement subi par le fourrage est désigné comme suit : F = Foin, E = Ensilage, Ep = Epais, D = dilué. Ainsi FD signifie : Lisier dilué d'animaux nourris au foin et EEp : Lisier épais d'animaux nourris à l'ensilage.

TABLEAU 1. — Répartition des parcelles expérimentales

I (5 cm d'épaisseur)	T I	FEp	ED	EEp	FD
II (10 cm d'épaisseur)	FEp	ED	T II	EEp	FD
III (15 cm d'épaisseur)	FD	EEp	FEp	ED	T III

2) Préparation des lisiers

Les lisiers proviennent d'étables d'animaux nourris soit à l'ensilage, soit au foin. Le lisier liquide est obtenu en diluant le lisier épais d'environ 3 fois son volume. On répand sur chaque parcelle l'équivalent de 10 m³/ha de lisier épais et 25 m³/ha de lisier dilué.

3) Prélèvement des échantillons de lisier, d'herbe et de terre

Les lisiers préparés dans des fûts de 200 l sont échantillonnés après brassage, immédiatement avant l'épandage.

Les prélèvements de fourrage sont effectués suivant les deux diagonales de la parcelle (de 0,3 à 3 kg suivant l'épaisseur de l'herbe). Le fourrage coupé à 3 cm du sol, manipulé avec précaution est congelé à -20° C en attendant d'être analysé. Le premier prélèvement (P₁) est effectué sur chaque parcelle 24 h après l'épandage, le second (P₂) 10 jours après puis les 33^{me} (P₃) et 76^{me} (P₄) jours.

Aux mêmes dates et aux mêmes emplacements que le fourrage, un échantillon de terre est prélevé sur chaque parcelle sur une profondeur de 2-3 cm.

4) Techniques bactériologiques

L'herbe, hachée en brins de 2 cm est soigneusement mélangée. Un échantillon de 25 g est agité pendant 10 mn dans 225 ml d'eau physiologique stérile. Les dilutions décimales ad hoc sont ensemencées sur les milieux suivants en vue des dénombrements :

TABLEAU 2

Volumes de lisiers épandus et concentrations en spores de *Clostridium*

<i>Lisier</i>	Matière sèche p. 100	Quantité épandue (l/m ²)	Nombre de spores (x10 ⁶ par ml)		
			Total	Protéolytique	Lactate +
FEp	14,5	1	15	12	1,5
EEp	9,7	1	1,7	1	0,36
FD	4,6	3	0,28	0,06	0,078
ED	3,26	3	0,1	0,05	0,012

— Anaérobies sporulés totaux (RCM) : Reinforced *Clostridium* medium (Hirsch, Grinstead, 1954).

— Anaérobies sporulés protéolytiques (G) : (Rosenberger, 1951).

— Anaérobies sporulés fermentant le lactate (R) : (Rosenberger, 1951).

Après ensemencements, les milieux liquides sont chauffés 10 mn à 75° C pour en sélectionner les spores, puis couverts d'un bouchon de paraffine pour maintenir l'anaérobiose. L'incubation est de 10 jours à 37° C et l'on considère comme positifs les tubes présentant un dégagement gazeux net. Le nombre de spores est calculé d'après la méthode de Mac Crady (1918) et rapporté au ml ou g suivant les cas.

Les lisiers et les terres sont analysés avec les mêmes techniques.

5) Les précipitations

Elles sont relevées chaque jour à 7 h tout au long de la période expérimentale (fig. 1).

RESULTATS

1) Analyses des lisiers

Dans les lisiers épais (tab. 2) la concentration en spores est nettement plus élevée dans FEp que dans EEp quel que soit le milieu de dénombrement employé.

Les lisiers dilués ont des nombres de spores comparables entre eux et nettement plus faibles que les lisiers épais. L'effet de dilution (1/3), que l'on retrouve dans les taux de matière sèche n'apparaît pas dans les nombres de spores en raison sans doute de la précision insuffisante de la méthode utilisée pour les dénombrements.

Quelle que soit l'origine du lisier, les anaérobies sporulés susceptibles de fermenter le lactate ne constitue que le dixième de la microflore anaérobie sporulée totale, l'importance de la microflore protéolytique restant intermédiaire entre les deux précédentes.

Par ailleurs, un examen macroscopique de la surface des tiges et des feuilles montre que des particules de lisier adhèrent durant plusieurs semaines. Dix jours après l'épandage et malgré 22 mm de pluie, le fourrage provenant des parcelles non fauchées ou coupées à 10 cm reste encore très chargé en lisier. Après 33 jours et des précipitations totalisant 72 mm d'eau, le lisier est encore visible et ce n'est qu'après 76 jours et 165 mm d'eau que les fourrages semblent en être débarrassés et présentent un aspect comparable entre eux et avec les témoins.

Enfin la cinétique des dénombrements effectués sur d'autres lisiers (Gouet, Contrepois, Corrot, 1972) et destinée à mesurer la longévité des spores dans ce milieu n'a montré aucune diminution de leur nombre (tab. 3) après 4 et 15 mois de conservation à 20° C.

TABLEAU 3. — Conservation des spores de *Clostridium* dans les lisiers

		Nombre de spores ($N \times 10^8/\text{ml}$)		
		Total	Protéolytiques	Lactate +
1 ^{re} analyse	Lisier de foin	2,5	1,1	0,8
	Lisier ensilage a	350	35	25
	Lisier ensilage b	50	8	25
2 ^{me} analyse (+ 4 mois)	Lisier de foin	3,5	0,5	0,25
	Lisier ensilage a	500	80	50
	Lisier ensilage b	80	30	35
3 ^{me} analyse (+ 15 mois))	Lisier de foin	2,5	1	0,45
	Lisier ensilage a	300	40	25
	Lisier ensilage b	60	20	20

2) Variations quantitatives de la microflore anaérobie sporulée pour l'herbe rase (lot I, fig. 2)

L'herbe coupée aux ciseaux à 2 cm au-dessous du niveau de la barre de coupe est nettement plus contaminée que le témoin. En présence de FD le nombre de spores diminue lentement et reste encore 10 fois supérieur au témoin ; avec du « lisier de foin » épais elle est 100 fois plus grande.

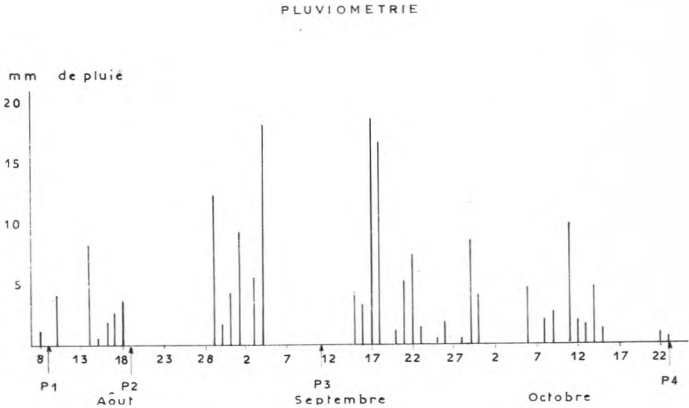


fig. 1

Relevés pluviométriques au cours de la période expérimentale

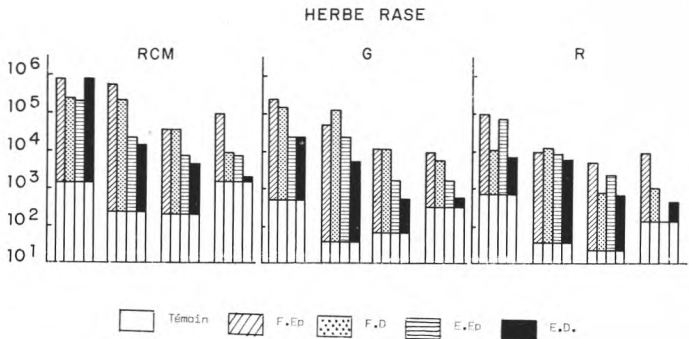


fig. 2

Variations du nombre des spores (par g) trouvées sur l'herbe rase
RCM : microflore anaérobie sporulée totale.
G : microflore protéolytique.
R : microflore Lactate +.

Avec ED la diminution du nombre de spores est rapide pendant les 10 premiers jours, plus lente, mais régulière par la suite. Après 11 semaines le niveau est identique à celui du témoin. Avec EEp le fourrage reste un peu plus contaminé que le témoin.

3) Variations quantitatives de la microflore anaérobie sporulée pour l'herbe moyenne (lot II, fig. 3)

La pollution naturelle du fourrage témoin est sensiblement la même que celle de l'herbe la plus épaisse, soit moins de 1000 spores/g pour la microflore anaérobie sporulée totale et 100 pour les microflores protéolytique ou Lactate +.

Avec du lisier de foin liquide la contamination atteint 10^6 spores/g, se maintient au 10^{5e} jour et commence à diminuer légèrement au bout de 1 mois pour rester supérieure à 10^4 /g après 76 jours.

En présence de FEp, la contamination à l'origine reste identique à celle du FD, mais la diminution est moins rapide ; les nombres sont encore très élevés après 76 jours.

Le niveau de contamination des fourrages ayant reçu du lisier d'ensilage liquide ou épais est plus faible que dans le cas du foin. La pollution reste toutefois très marquée après 2 mois 1/2 et particulièrement pour la microflore fermentant le lactate.

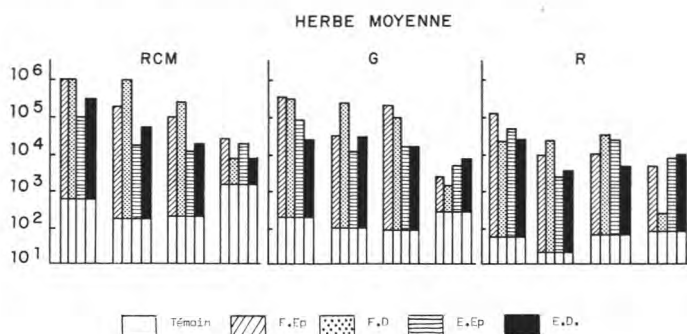


fig. 3

Variations du nombre de spores (par g) trouvées sur l'herbe moyenne

RCM : microflore anaérobie sporulée totale.

G : microflore protéolytique.

R : microflore Lactate +.

4) Variations quantitatives de la microflore anaérobie sporulée dans le cas de l'herbe haute (lot III, fig. 4)

Selon les milieux et les prélèvements, le nombre d'anaérobies sporulés se situe entre 10^2 et 10^3 /g sur les fourrages témoins ne rece-

vant pas de lisier. Après l'épandage de lisier de foin, liquide ou épais la concentration en spores s'accroît de 1 000 fois pour FD et sensiblement autant pour FEp.

Dix jours après, la réduction du nombre est extrêmement faible et au bout de 1 mois, la contamination est encore 100 fois supérieure à celle du témoin. Après 76 jours le fourrage arrosé de FEp a peu changé comparativement au prélèvement du 33^{me} jour quel que soit le milieu de dénombrement.

L'effet concernant la concentration en spores, plus faible dans les lisiers d'ensilage liquide ou épais que dans le lisier de foin, se retrouve sur les fourrages qui les ont reçus. La décontamination est semblable à celle des fourrages arrosés de lisiers de foin. La microflore anaérobie sporulée totale décroît régulièrement jusqu'au 3^{me} prélèvement puis se stabilise en restant au moins 10 fois plus nombreuse que sur le témoin. Par contre, la microflore protéolytique reste sensiblement constante.

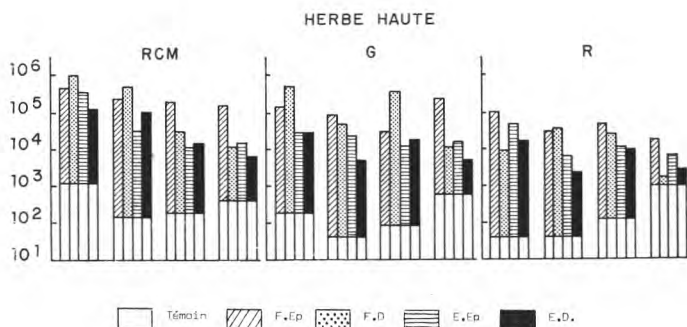


fig. 4

Variations du nombre de spores (par g) trouvées sur l'herbe haute

RCM : microflore anaérobie sporulée totale.

G : microflore protéolytique.

R : microflore Lactate +.

5) Evolution de la contamination du sol (tab. 4)

Avant l'épandage, la contamination des sols par les anaérobies sporulés est très légèrement supérieure à celle des fourrages témoins. Après l'épandage des lisiers on enregistre une faible augmentation, mais les sols renferment à ce moment 1 000 fois moins de sporulés que les fourrages qui les recouvrent. Au second et troisième prélèvement, les résultats sont assez fluctuants et il n'est pas possible de déceler un enrichissement systématique du sol en spores.

TABLEAU 4. — Nombre de spores de *Clostridium* trouvées dans les sols (en milliers par g de matière sèche)

Epaisseur du fourrage	Prélèvement*	Parcelles									
		Témoin		FEp		FD		EEp		ED	
		MT**	ML+***	MT	ML+	MT	ML+	MT	ML+	MT	ML+
I (5 cm)	P ₁	6,7	0,8	159	22,3	53	7,3	1	1,2	19	2,8
	P ₂	52	2,3	9	0,8	87	13,4	5,5	1,7	5,2	3,3
	P ₃					71	1,1			5,0	0,8
II (10 cm)	P ₁	11	0,8	1,6	0,2	22,8	8,5	22,3	0,8	22,5	1,6
	P ₂	20	0,8	16	0,8	12,6	4,4	2,6	1,3	4,6	4,3
	P ₃					51,4	32	8,7	3,1		
III (15 cm)	P ₁	3,8	1	51,7	2,2	33	33	16	2,2	11,1	5,2
	P ₂	11	0,5	8,5	2,6	3,3	3,3	4,6	1,3	11,6	1,4
	P ₃	8,7								8,2	3,2

* Les prélèvements P₄ n'ont pas été effectués pour les sols.

** MT = Microflore totale.

*** ML+ = Microflore fermentant le Lactate.

DISCUSSION

Les recommandations faites aux éleveurs relativement aux conditions d'épandage des lisiers concernent généralement leur caractère fertilisant. Bien qu'il soit toujours déconseillé d'opérer par temps sec, on remarque que les praticiens sont fréquemment amenés à se débarrasser de leur lisier. En effet il leur est difficile de concilier le volume de la fosse, l'absence d'intempéries et la portance des sols dans les parcelles les plus appropriées et au moment opportun pour l'épandage. De plus, un départ précoce de la végétation ou au contraire des repousses tardives qui n'ont pu être fauchées ou pâturées créent un tapis végétal suffisamment dense pour intercepter le lisier, surtout s'il est épais, dans son cheminement vers le sol. Dans notre étude, le choix des trois épaisseurs de fourrage a été dicté par l'intérêt qu'il y avait à suivre l'évolution de la contamination dans les situations extrêmes et moyennes observées dans la pratique. Nos résultats ont été obtenus dans des conditions pluviométriques voisines de celles que l'on peut rencontrer lors d'un automne, d'un hiver ou d'un printemps peu humides et il est probable qu'ils auraient été différents si l'épandage s'était effectué sous la pluie, celle-ci ne devant cependant être ni trop intense, ni trop persistante pour permettre l'emploi des matériels sur les prairies et conserver au lisier sa valeur fertilisante. La contamination plus importante du « lisier de foin » comparée au « lisier d'ensilage » quant à elle relève du hasard.

Dans nos conditions expérimentales la fluidité du lisier n'ayant pas eu d'effet marqué incite à penser que la quasi totalité des lisiers est restée sur la plante. Un épandage uniforme de $25 \text{ m}^3/\text{ha}$ ne représente d'ailleurs qu'une hauteur de 2,5 mm, qu'un tapis végétal un peu épais suffit à intercepter si une précipitation d'une dizaine de mm ne l'entraîne pas vers le sol. Il est à souligner que, suivant la concentration en spores du lisier, ce volume suffit pour apporter de 10^2 à 10^4 spores par cm^2 de sol. La vitesse de décontamination est sensiblement la même, quel que soit le lisier, et il faut dans nos conditions pluviométriques environ 1 mois pour réduire de 10 fois la concentration bactérienne initiale. Dans le cas du fourrage I l'effet de dilution dû à la repousse réduit plus vite cette concentration et fournit en définitive le fourrage le moins contaminé.

On peut conclure que l'épandage d'un lisier à 10^4 spores/ml aura peu d'effet contaminant au-delà de 1 mois mais un lisier de cette « qualité » ne peut être obtenu qu'avec une alimentation à base de fourrages verts ou de fourrages parfaitement récoltés et conservés. Dans le cas contraire il est nécessaire que la prairie ait été fauchée et que l'épandage se fasse par temps humide ou pluvieux pour éviter que le lisier ne sèche et ne colle à la plante.

Dans tous les cas, le sol reste nettement moins riche en spores (10 à 100 fois) que le fourrage qui le recouvre et ne peut donc le contaminer de façon appréciable au moment de la récolte.

Summary

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

Part I

Effect of the origin of the manure of its fluidity and of the thickness of the plant

Results show that spreading manure increased spores concentration in the grass and that decontamination was slow. The fluidity of the manure had little importance for the volumes spread during the experiment.

Thus, we conclude that contamination would be low at the end of the month if the manure does not contain more than 10^4 spores per ml, and if the grass is not thick. Consequently, the quality of silage given to animals is of considerable importance.

Références bibliographiques

- BERGÈRE (J. L.), GOUET (Ph.), HERMIER (J.) et MOCQUOT (G.) (1968). — Les *Clostridium* du groupe butyrique dans les produits laitiers. *Ann. Inst. Pasteur Lille*, XIX, 41-54.
- BERGÈRE (J. L.), ROUSSEAU (P.), DUMONT (P.), MOCQUOT (G.), HERMIER (J.), GOUET (Ph.) et ZELTER (S. Z.) (1969). — Expérimentation sur la fabrication d'Emmental et de Comté avec du lait de vaches nourries à l'ensilage A.I.V. I. Aspects technologiques. *Bulletin Technique d'Information*, n° 239, 357-386.
- CONTREPOIS (M.), GOUET (Ph.) et SAUVANT (D.) (1971). — Comportement des spores de bactéries anaérobies fermentant le lactate dans le tractus digestif du ruminant. II. Evolution du nombre de *C. tyrobutyricum* introduites au niveau du rumen au cours du transit digestif chez le ruminant. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, 11 (1), 139-154.
- GOUET (Ph.) et CONTREPOIS (M.) (1971). — Comportement des spores de bactéries anaérobies fermentant le lactate dans le tractus digestif du ruminant. I. Variations avec le régime de la concentration en spores dans le rumen et les fécès. *Ann. Biol. Anim. Bioch., Biophys.*, 11 (1), 129-138.
- GOUET (Ph.), CONTREPOIS (M.) et 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*. II. Effets des épandages répétés dans l'année de lisier liquide sur la contamination du sol, de l'herbe verte, fanée ou ensilée (sous presse).
- HIRSCH (A.) and GRINSTED (E.) (1954). — Methods for the growth and enumeration of anaerobic spore formers from cheese, with observations on the effect of nisin. *J. Dairy Res.*, 21, 101-110.
- MAC CRADY (M. H.) (1918). — Tables for rapid interpretation of fermentation tube results. *Canad. publ. Hlth* 5, 9, 201-210.
- ROSENBERGER (R. F.) (1951). — The development of methods for the study of obligate anaerobes in silage. *Proc. Soc. Alpp. Bact.*, 14, 161-164.
- WILSSENS (A.) et BUTTIAUX (R.) (1958). — Les bactéries de la flore fécale de la vache saine. *Ann. Inst. Pasteur Lille*, 332-340.