

①2

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 09.04.90.

③0 Priorité : 06.11.89 US 431883.

④3 Date de la mise à disposition du public de la demande : 10.05.91 Bulletin 91/19.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de recherche : *Le rapport de recherche n'a pas été établi à la date de publication de la demande.*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : *Société dite: PIONEER HI-BRED INTERNATIONAL, INC. — US.*

⑦2 Inventeur(s) : *Tomes Nancy J.,.*

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire : *Rinuy, Santarelli.*

⑤4 Procédé de traitement bactérien pour la conservation du fourrage ensilé et agent de conservation utilisé à cet effet.

⑤7 L'invention concerne la conservation du fourrage ensilé.

Un agent de conservation du fourrage ensilé, comprenant une quantité faible, mais efficace, du micro-organisme appelé *Propionibacterium jensenii*, ou de son équivalent génétique, est utilisé.

Application: procédé perfectionné de traitement bactérien pour la conservation du fourrage ensilé.

FR 2 653 973 - A1



La présente invention a pour objet un procédé de conservation de produits agricoles qui sont utilisés pour l'alimentation animale, après entreposage dans des conditions anaérobies.

5 L'utilisation d'additifs pour le fourrage ensilé est devenue d'une pratique courante dans la plus grande partie du monde agricole. Afin de comprendre comment les additifs pour le fourrage ensilé réagissent avec le fourrage ensilé, il peut être utile de passer tout d'abord
10 en revue les modifications biochimiques et microbiologiques fondamentales qui se produisent au cours du procédé d'ensilage. Immédiatement après la coupe, par exemple, du maïs, la respiration aérobie débute. Au cours de cette phase initiale, les glucides solubles présents dans les
15 tissus de la plante sont oxydés et transformés en anhydride carbonique et en eau. Ce processus se poursuit jusqu'à ce que la teneur en oxygène soit réduite ou que les glucides solubles soient épuisés. Dans des conditions idéales, avec un conditionnement et un compactage adéquats de la matière
20 ensilée, la respiration dure seulement quelques heures. La croissance des micro-organismes au cours de cette période est limitée à celle des micro-organismes qui sont tolérants à l'oxygène, ces micro-organismes comprenant les bactéries aérobies, les levures et les moisissures. Il est générale-
25 ment considéré que ces organismes sont néfastes pour le milieu car ils métabolisent les sucres en anhydride carbonique, en chaleur et en eau.

Une autre modification chimique importante qui se produit au cours de cette phase initiale est la
30 dégradation des protéines végétales par les protéases végétales. Les protéines sont dégradées en amino-acides et métabolisées ultérieurement en ammoniac et en amines. Il a été indiqué qu'une quantité allant jusqu'à 50% des protéines totales peut être dégradée au cours de ce
35 processus, en fonction de la vitesse de diminution du pH dans le fourrage ensilé.

Une fois des conditions anaérobies établies, les bactéries anaérobies prolifèrent. Les entérobactéries et les bactéries lactiques hétérofermentatives sont généralement les premières populations à s'installer. Ces
5 organismes produisent principalement de l'acide acétique, de l'éthanol, de l'acide lactique et de l'anhydride carbonique par fermentation du glucose et du fructose. Une fois commencée la chute du pH, il existe un fort accroissement de la population de bactéries lactiques homofermentatives produisant principalement de l'acide lactique.
10 L'accroissement rapide de la teneur en acide lactique a pour résultat une chute du pH à environ 4. A ce point, la masse ensilée reste généralement stable pendant toute la durée de l'entreposage, si elle n'est pas perturbée.

15 En résumé, lorsque la matière est initialement conditionnée dans une installation limitant la teneur en oxygène, telle qu'un silo couvert, le pH est abaissé, l'oxygène résiduel est utilisé et il est considéré que la matière subit une fermentation lactique. La matière reste
20 stable et peut être entreposée pendant de nombreux mois dans cet état.

Lorsque le fourrage ensilé est prêt à être donné en nourriture, le couvercle supérieur est enlevé et le silo est ouvert pour l'affouragement. Puis la matière
25 est exposée à l'air et le processus n'est plus anaérobie. La microflore présente dans le fourrage ensilé proprement dit ou des impuretés provenant de l'air peuvent commencer à oxyder les acides présents. Cette oxydation provoque une perte de masse ou de matière sèche du fourrage et provoque
30 ainsi des pertes d'affouragement. En outre, les élévations résultantes du pH et de la température sont néfastes pour les animaux et le fourrage est refusé par les animaux une fois que sa température a commencé à s'élever. L'incidence de l'instabilité aérobie observée dans la pratique dépend
35 de la vitesse de déchargement de la matière ensilée du silo et de la durée d'ensilage de la matière avant ouverture. Si

le fourrage ensilé est déchargé lentement, cela laisse alors plus de temps pour que se produise une détérioration à la surface du fourrage ensilé mis à l'air libre. Des temps d'ensilage plus longs donnent généralement un
5 fourrage ensilé plus stable, les concentrations en acides étant plus élevées et toutes les populations de la microflore tendant à diminuer. En général, le fourrage ensilé est stable pendant au moins 5 jours après l'ouverture. Cela laisse un temps adéquat pour le déchargement du
10 fourrage ensilé.

On a établi récemment que des ensemencements bactériens facilitaient la conservation du fourrage ensilé, comprenant à la fois l'ensilage d'herbe et l'ensilage de maïs. Par exemple, l'ensemencement avec des bactéries
15 lactiques au cours de la phase de fermentation peut être avantageuse pour le processus de fermentation ; voir, par exemple, le brevet des Etats-Unis d'Amérique N° 4 842 871 au nom de Hill, délivré le 27 juin 1989, ainsi que les références de publications qui y sont citées. Pour la
20 stabilité du maïs à forte humidité, cette amélioration est probablement due à l'agent d'ensemencement accroissant la vitesse de fermentation anaérobie et la diminution du pH. Cela est avantageux car les pertes oxydatives provoquées par la microflore anaérobie sensible au pH, dans les
25 étapes initiales, sont ainsi évitées. Dans d'autres fourrages ensilés tels que les plants de maïs entiers, la luzerne, etc., l'agent d'ensemencement peut également avoir des effets avantageux sur la digestibilité des fourrages ensilés en provoquant un accroissement de la disponibilité
30 des fibres.

Il n'existe actuellement pas d'agent d'ensemencement disponible pour assurer la stabilité dans la seconde partie du processus qui se produit lorsque le silo est ouvert à l'air. Une raison de cette absence d'un agent
35 efficace d'ensemencement est la nature antagoniste des

conservateurs anaérobies et aérobies. Chacun peut interférer avec les performances de l'autre.

En conséquence, un objectif principal de la présente invention consiste à élaborer un agent bactérien
5 d'ensemencement du fourrage ensilé qui soit efficace au cours des stades anaérobies initiaux et qui maintienne également l'efficacité au cours des stades aérobies initiaux lorsqu'un silo est ouvert à l'air.

Un autre objectif de la présente invention
10 consiste à élaborer un agent d'ensemencement du fourrage ensilé qui soit efficace aux deux stades, l'agent d'ensemencement du second stade étant également un agent anaérobie, qui n'interfère en aucune manière avec un quelconque agent d'ensemencement du stade anaérobie
15 initial, constitué de bactéries productrices d'acide lactique, pouvant être présent.

Un autre objectif de la présente invention consiste à proposer un agent d'ensemencement du fourrage ensilé qui contient certaines espèces de Propionibactéries
20 qui se sont révélé avoir un rôle efficace dans le milieu des bactéries lactiques sans que chacune antagonise l'autre. Il en résulte une aptitude efficace à la conservation du fourrage ensilé au cours de la phase anaérobie initiale et en raison de la présence des produits métaboliques des Propionibactéries également au cours de la phase
25 aérobie ultérieure.

Le procédé et la manière de parvenir à chacun des objectifs de la présente invention, parmi d'autres, apparaîtront à la description détaillée figurant ci-après.

30 Dans la présente invention, le fourrage ensilé, comprenant l'ensilage d'herbe et/ou l'ensilage de maïs, sont conservés à la fois pendant la phase anaérobie initiale du procédé d'ensilage et au cours des phases initiales de conditions aérobies après ouverture d'un silo.
35 La conservation est effectuée en mélangeant certains agents

bactériens d'ensemencement de la phase anaérobie qui donnent des produits métaboliques qui, au cours de la phase aérobie, ont pour rôle de maintenir la stabilité. L'agent d'ensemencement appartient aux Propionibactéries qui, ce
5 qui est important, sont compatibles avec les autres bactéries de la phase anaérobie et, ainsi, ne retardent en aucune manière le procédé d'ensilage. Les agents bactériens d'ensemencement ajoutés pour la conservation en phase anaérobie sont des Lactobacillus classiques qui produisent
10 de l'acide lactique par fermentation. Les Propionibactéries sont également anaérobies, mais leurs produits métaboliques sont responsables de la stabilité en phase aérobie. De préférence, elles appartiennent à l'espèce Propionibacterium jensenii ou à un de ses équivalents génétiques.

15 En résumé, la présente invention propose un procédé de traitement du fourrage ensilé, qui consiste à administrer au fourrage ensilé une quantité faible, mais efficace pour la conservation du fourrage ensilé, de certaines espèces de Propionibactéries, en particulier
20 P.jensenii, et plus particulièrement les souches P-9 et P-Fargo, ayant respectivement les numéros ATCC 53961 et 53962, de préférence en association avec des micro-organismes producteurs d'acide lactique.

La pourriture de produits agricoles tels que le
25 foin, le maïs, etc., due à une détérioration provoquée par la croissance de micro-organismes responsables de la putréfaction, est un problème important dans le monde agricole. Par exemple, lorsque le maïs est entreposé dans un silo à une haute teneur en humidité, le fourrage ensilé
30 résultant possède une valeur nutritionnelle considérablement plus faible et présente souvent une teneur supérieure en moisissures visibles.

L'expression "fourrage ensilé", telle qu'elle est utilisée dans la présente invention, désigne tous les
35 types de produits agricoles fermentés tels que l'herbe

ensilée, la luzerne ensilée, le maïs ensilé, le sorgho ensilé, des mélanges de céréales fermentées et d'herbe, etc. Tous peuvent être traités avec succès au moyen de l'agent d'ensemencement de la présente invention.

5 Conformément au procédé de la présente invention, le fourrage ensilé est traité avec une quantité, efficace pour la conservation du fourrage ensilé, d'un micro-organisme du genre Lactobacillus, tel que ceux figurant dans le brevet des Etats-Unis d'Amérique en
10 copropriété N° 4 842 871, délivré le 27 juin 1989. Cependant, de la manière expliquée précédemment, pour parvenir à une efficacité proximale de conservation du fourrage ensilé, on ne peut ignorer les conditions aérobies existant lorsqu'un silo est ouvert ou bien lorsque le
15 fourrage ensilé est enlevé du silo et placé dans des auges. Il n'est pas rare que le produit, précédemment stable dans des conditions anaérobies, subisse rapidement une détérioration une fois qu'il est exposé à l'air.

 De manière inattendue, il a été trouvé que, si
20 un agent d'ensemencement du fourrage ensilé comprend une partie constituée d'un agent bactérien anaérobie classique d'ensemencement tel qu'un micro-organisme du genre Lactobacillus et une autre partie constituée de certains organismes bactériens anaérobies d'ensemencement dont les
25 métabolites ont pour rôle une conservation dans des conditions aérobies, il se produit alors une conservation à la fois en phase aérobie et en phase anaérobie, et aucune n'est antagoniste des performances de l'autre.

 Un aspect inattendu de la présente invention
30 est que seules certaines espèces de Propionibactéries ont un rôle efficace dans la présente invention. L'addition de Propionibactéries au fourrage ensilé, de manière générale, est connue ; voir, par exemple, Flores-Galarza R.A. et B.A. Glatz, J. Food Protection 48:407-411 (1985). En outre, il
35 existe dans la même revue un article de Parker et de son

inventeur, N.J. Moon, intitulé "Interactions of Lactobacillus and Propionibacterium In Mixed Culture," J. Food Protection, 45:326-330 (1982). Cet article diffère de la présente invention en ce qu'il utilise des espèces différentes de Propionibactéries, et les espèces mentionnées dans l'article de 1982 ne sont pas satisfaisantes pour l'utilisation dans la présente invention. Si d'autres espèces de Propionibactéries sont utilisées, par opposition à celles qui sont mentionnées, aucun effet n'est obtenu au stade aérobique et, en fait, l'interaction produite par l'association peut être pire et non meilleure.

En résumé, la présente invention dépend obligatoirement de la présence spécifique de certaines espèces appartenant aux Propionibactéries. En particulier, les espèces de Propionibactéries qui se sont révélées convenir dans la présente invention sont : Propionibacterium jensenii et, de préférence, la souche P-Fargo de Propionibacterium jensenii et la souche P-9 de Propionibacterium jensenii. Cependant, il doit être entendu que la présente invention, bien que dépendant de la présence spécifique de certaines espèces, est destinée à comprendre ces espèces et leurs équivalents génétiques, ou bien leurs mutants efficaces qui présentent les propriétés désirées des espèces et des souches mentionnées. Ces équivalents génétiques ou leurs mutants sont considérés être fonctionnellement équivalents aux espèces dont elles sont issues. Il est bien connu de l'homme de l'art qu'une mutation spontanée est un phénomène fréquent chez les micro-organismes et que des mutations peuvent également être intentionnellement produites par différentes techniques connues. Par exemple, des mutants peuvent être produits en utilisant des techniques chimiques, des techniques utilisant la radioactivité et des techniques de recombinaison.

Quelle que soit la manière d'induire des

mutations ou les équivalents génétiques, la condition déterminante est que le rôle consiste à conserver le fourrage ensilé de la manière décrite pour l'espèce et/ou la source d'origine. En d'autres termes, la présente invention comprend les mutations résultant de modifications mineures telles que, par exemple, des modifications taxonomiques mineures.

Des compositions caractéristiques utiles pour le traitement de la présente invention peuvent comprendre les micro-organismes du genre Lactobacillus dans les intervalles utiles pour le traitement des produits ensilés, à savoir classiquement 10^8 à 10^{14} micro-organismes viables/tonne, de préférence 10^{10} à 10^{12} micro-organismes viables/tonne.

En ce qui concerne Propionibacterium jensenii, et les souches P-9 et P-Fargo particulièrement appréciées, la quantité de micro-organismes viables/tonne de fourrage ensilé doit être comprise dans l'intervalle d'environ 10^8 à 10^{14} micro-organismes par tonne, de préférence d'environ 10^{10} à 10^{12} micro-organismes par tonne. Le cas échéant, les Propionibactéries peuvent être utilisées seules et il est préféré de les utiliser en association avec des micro-organismes producteurs d'acide lactique.

La composition de la présente invention peut comprendre également d'autres organismes usuels pour la conservation du fourrage ensilé tels que, par exemple, des micro-organismes des genres Lactobacillus, Streptococcus et Pediococcus, ainsi que certains enzymes provenant de champignons ou de bactéries, sous réserve qu'ils ne présentent en aucune manière un antagoniste avec les micro-organismes aérobies actifs.

L'homme de l'art connaît d'autres supports et formes posologiques convenables, ou bien sera apte à les déterminer par une expérimentation usuelle. En outre, l'administration des différentes compositions peut être

effectuée en utilisant des techniques classiques bien connues de l'homme de l'art, à savoir la pulvérisation, le poudrage, etc.

5 La description précitée décrit de manière générale la présente invention. Une compréhension plus détaillée peut être obtenue par référence aux exemples spécifiques suivants qui sont proposés seulement à des fins d'illustration et ne sont pas destinés à être limitatifs, sauf spécification contraire.

10 EXEMPLES

Dans les exemples d'essais présentés sur les tableaux ci-dessous, le traitement, la préparation et l'entreposage étaient les suivants : les espèces de Propionibactéries utilisées dans les essais sur le fourrage
15 ensilé, qui ont été effectués dans les années 1986, 1987 et 1988, comprenaient à la fois les souches P-9 et P-Fargo de l'espèce Propionibacterium jensenii, ainsi que d'autres Propionibactéries à des fins de comparaison. Les souches de l'espèce Propionibacterium jensenii sont couramment
20 disponibles auprès de la Culture Collection de l'Iowa State University et sont déposées dans l'American Type Culture Collection (ATCC) sous les numéros de dépôt 53961 et 53962. Dans les essais, P. shermanii, sous la désignation P-19, et P. thoenii, sous la désignation P-8, ont été
25 utilisés à des fins de comparaison pour obtenir des résultats montrant que seul P. jensenii ou son équivalent génétique, est satisfaisant dans la présente invention. La teneur en agent d'ensemencement est égale à 10^5 par gramme. Cela correspond à 10^{11} micro-organismes par tonne. Les
30 traitements ont été effectués au moyen d'un liquide.

Les céréales traitées ont été divisées en portions égales et conditionnées dans des seaux en matière plastique de 19 l avec des couvercles munis d'un joint étanche en caoutchouc. Les couvercles étaient munis d'une
35 soupape régulatrice de pression, de sorte que les gaz

puissent s'échapper et maintenir encore l'anaérobiose. Les sceaux ont été entreposés à une température de 20 à 25°C pendant 30 à 120 jours avant leur ouverture pour simuler une condition régnant dans un silo.

5 Les seaux ont été ouverts, soumis à une cotation numérique en ce qui concerne des différences visuelles de couleur et l'odeur, puis ont été vidés sur une feuille propre en matière plastique. Les céréales ont été
10 mélangées et des échantillons ont été prélevés pour analyse microbiologique et chimique. Les céréales restantes ont été divisées en deux portions de 500 g et placées dans des récipients en Styrofoam fabriqués spécialement afin d'avoir des parois de 50,1 mm pour retenir la chaleur. Des thermistances ont été placées au centre de la masse de
15 chaque récipient et la température a été mesurée chaque heure pendant un temps allant jusqu'à 7 à 10 jours. Le pH a été déterminé deux fois par jour en utilisant un pH-mètre muni d'une pointe lancéolée.

Les populations de micro-organismes aérobies,
20 de micro-organismes micro-aérophiles, de lactobacilles, de streptocoques, de micro-organismes utilisateurs de lactates, de bactéries coliformes, de levures et de moisissures, ainsi que d'actinomycètes ont été déterminées en utilisant des milieux et des conditions appropriées (par
25 exemple la gélose trypticase-soja (TSA), le milieu Mann-Ragosa-Shaye modifié (MRS), la gélose au Mitis salivarius (MS), la gélose au lactate de sodium (NAL), la gélose à la chlortétracycline-rose Bengale (RBC), le milieu sélectif NBARC. Les populations ont été déterminées dans les
30 céréales au moment de l'ensilage et lorsque le fourrage ensilé a été exposé à l'air, le jour 0 des déterminations de stabilité aérobie.

La valeur fourragère des échantillons a été évaluée lorsque le procédé d'ensilage a commencé et lorsque
35 les céréales ont été mises à l'air libre pour déterminer la

stabilité aérobie. Les paramètres fourragers usuels, comprenant le dosage des fibres avec une solution acide de détergent (ADF), le dosage des fibres, moins l'azote non disponible, avec une solution acide de détergent (ADF-N), le dosage des fibres avec une solution neutre de détergent (NDF), le dosage de l'azote (N) et le dosage des cendres (ASH), ont été déterminés. Les acides de la fermentation ont été dosés le jour de l'ouverture pour évaluer la stabilité aérobie.

Dans les cas où il existait une association avec des bactéries du genre Lactobacillus, un produit du commerce de Pioneer Hi-Bred International, Inc., couramment disponible et connu sous le nom de Pioneer Brand 1186, a été utilisé. Le Pioneer Brand 1186 est une marque d'agent d'ensemencement du maïs, à haute teneur en humidité, qui contient l'espèce Lactobacillus plantarum, de la manière décrite dans le brevet des Etats-Unis d'Amérique N° 4 842 871. Cette description est citée à titre de référence dans le présent mémoire.

Les tableaux 1, 2 et 3 ci-dessous résument les essais. Le "Témoin" ne renfermait aucun agent d'ensemencement, "1186" ne contenait aucune Propionibactérie, P-8 est une espèce différente de celle de la présente invention, tout comme P-19. "PF" signifie P-Fargo. Les résultats montrent que, généralement, un temps plus long est nécessaire pour parvenir à une élévation du pH à une valeur supérieure à 5,0 et pour parvenir à une élévation de température de 1,5°C pour un fourrage ensilé mis à l'air libre qui contient Propionibacterium jensenii, et que P-8 et P-9 ne possèdent pas une action adéquate en présence de 1186 et, en fait, peuvent être antagonistes des performances convenables de 1186 seul.

Dans les études effectuées en 1987 (tableau 3), des souches supplémentaires ont été utilisées seules ou en association avec 1186, et les fourrages ensilés ont été

exposés à l'air au bout de 60 jours. Dans ces études, les fourrages ensilés les plus stables dans des conditions aérobies étaient de nouveau ceux traités avec Propionibacterium sp. seul : P-9, P-Fargo et P-8. Ces fourrages
5 ensilés présentaient une stabilité de la température et du pH pendant 8 jours, temps au bout duquel l'expérience a été terminée. Le moins stable étant le témoin non ensemencé qui présentait une instabilité du pH et une élévation de température immédiates. L'association P-19 + 1186 présen-
10 tait une instabilité du pH et une élévation de température immédiates. L'association P-19 + 1186, et 1186, étaient stables pendant environ 1 jour de plus que le témoin. Les autres mélanges étaient intermédiaires en ce qui concerne la stabilité de pH et de température.

15 Des mélanges de chaque souche des Propionibactéries et de 1186 étaient moins stables que n'importe laquelle des souches pures de Propionibactéries et possédaient des teneurs inférieures en acides propioniques. Ainsi, dans ces études, une réponse antagoniste a été
20 observée avec un ensemencement conjoint de 1186 et de certaines souches de Propionibactéries, mais non avec P-9 et P-Fargo.

En 1988, la même conception a été utilisée pour les essais, sauf que des temps supplémentaires d'ouverture
25 ont été utilisés pour évaluer l'évolution de la fermentation et l'effet sur la stabilité, et seules deux souches de Propionibactéries ont été utilisées : P-8 et P-9. P-9 s'est révélée efficace en association avec 1186, et non P-8.

Les tableaux 1 et 2 sont des résumés d'essais
30 effectués en 1986-1988 sur les effets de traitements sur la stabilité du maïs à forte teneur en humidité. La stabilité est définie comme le nombre d'heures requis pour une élévation du pH à plus de 5,0 et une élévation de la température interne supérieure de 1,5°C à la température
35 ambiante.

Tableau 1

<u>Année</u>	<u>Jour d'ouver- ture</u>		<u>Traitement</u>					
			<u>Témoin</u>	<u>1186</u>	<u>P-9</u>	<u>1186+P-9</u>	<u>P8</u>	<u>P8+1186</u>
1986	34	pH	103	89				
		temp.	65	83				
1987	60	pH	79	120	>168	144	>168	138
		temp.	38	62	>168	82	149	82
1988	35	pH	72	55	84	72	79	70
		temp.	50	43	60	55	50	55
	95	pH	108	110	120	156	108	89
		temp.	68	76	72	82	60	48
	140	pH	>240	240	180	240	>240	>240
		temp.	>240	>240	>240	>240	>240	>240

Tableau 2

<u>Année</u>	<u>Jour d'ouver- ture</u>		<u>Traitement</u>					
			<u>Témoin</u>	<u>1186</u>	<u>PF</u>	<u>PF+1186</u>	<u>P19</u>	<u>P19+1186</u>
1986	34	pH	103	89	120	79		
		temp.	65	83	79	58		
1987	60	pH	79	120	>168	>168	>168	120
		temp.	38	62	>168	>168	132	67

Le tableau 3 est un résumé d'essais effectué de 1986 à 1988. Le nombre d'heures pour parvenir à une stabilité accrue ou réduite (-) est indiqué, comparative-
 5 ment au témoin, qui ne renferme aucun organisme d'ensemencement.

Tableau 3

<u>Année</u>	Jour d'ouver- ture		Traitement				
			<u>1186</u>	<u>P-9</u>	<u>1186+P-9</u>	<u>P8</u>	<u>P-8+1186</u>
1986	34	pH	-14				
		temp.	-2				
1987	60	pH	41	>89	65	89	59
		temp.	24	>130	44	111	44
1988	35	pH	-17	12	0	7	-2
		temp.	-7	10	5	0	5
	95	pH	2	12	48	0	5
		temp.	8	4	14	-8	-20
	140*	pH	0	-60	0	0	0
		temp.	0	0	0	0	0
Moyennes du 30ème au 90ème jour							
		pH	2,5	37,7	37,7	24	9,5
		temp.	5,8	48,0	21,0	20	7,2

*La stabilité du pH et de la température pour le témoin excédait 240 heures. Tous les échantillons traités étaient stables pendant plus de 240 heures (10 jours) en ce qui concerne la température et pendant 180 heures (7,5 jours) en ce qui concerne le pH.

On ne sait pas de manière précise pourquoi l'association des souches spécifiques mixtes de Lactobacillus et P. jensenii de la présente invention est efficace, mais il est considéré que cela est dû à la production d'acide acétique et d'acide propionique en des quantités suffisantes pour retarder le développement de levures et d'autres micro-organismes responsables de la putréfaction au cours du processus de dégradation aérobie. Il est également considéré que la Demanderesse a trouvé certains types de Propionibacterium jensenii qui sont plus tolérants aux hautes teneurs en acide lactique et à un pH de 3,8-4,5, qui est plus bas que le pH égal à 5,0 du milieu ambiant, associé habituellement à l'activité des Propionibactéries. Dans certains cas, les fourrages ensilés qui ont été ensemencés avec ces Propionibactéries possédaient également des numérations inférieures de levures lorsque les fourrages ensilés ont été mis à l'air libre, ce qui suggère que la croissance des levures a été inhibée au cours du procédé d'ensilage. Ces exemples démontrent que cet effet est spécifique de certaines espèces, et que tous les types ou toutes les souches dans une espèce n'ont pas un comportement adéquat identique. Les types de P. jensenii étaient les plus efficaces et les souches P-9 et P-Fargo étaient les meilleures.

De la manière indiquée, l'agent d'ensemencement peut être le P. jensenii seul pour son effet de conservation dans un milieu aérobie, ou bien il peut être associé à un organisme de conservation anaérobie.

Il va de soi que la présente invention n'a été décrite qu'à titre explicatif, mais nullement limitatif, et que de nombreuses modifications peuvent y être apportées sans sortir de son cadre.

REVENDEICATIONS

1. Procédé de conservation du fourrage ensilé, caractérisé en ce qu'il consiste : à traiter du fourrage ensilé avec une quantité faible, mais efficace pour la conservation du fourrage ensilé, du micro-organisme appelé Propionibacterium jensenii, ou de son équivalent génétique.

2. Procédé suivant la revendication 1, caractérisé en ce que le Propionibacterium jensenii est choisi dans le groupe comprenant les souches de P. jensenii appelées P-9 et P-Fargo, ou bien leurs équivalents génétiques.

3. Procédé suivant la revendication 2, caractérisé en ce que la quantité de micro-organismes viables par tonne de fourrage ensilé est comprise dans l'intervalle de 10^8 à 10^{14} micro-organismes par tonne.

4. Procédé suivant la revendication 3, caractérisé en ce que la quantité de micro-organismes viables par tonne de fourrage ensilé est comprise dans l'intervalle de 10^{10} à 10^{12} micro-organismes par tonne.

5. Procédé suivant la revendication 4, caractérisé en ce que la quantité de micro-organismes viables est égale à environ 10^{11} micro-organismes par tonne.

6. Procédé suivant la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend un traitement avec un micro-organisme producteur d'acide lactique.

7. Procédé suivant la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend un traitement avec un micro-organisme du genre Lactobacillus.

8. Procédé suivant la revendication 7, caractérisé en ce que le micro-organisme du genre Lactobacillus est Lactobacillus plantarum, ATCC 53187, ou son équivalent génétique.

5 9. Agent de conservation du fourrage ensilé, caractérisé en ce qu'il comprend en association : une quantité faible, mais efficace pour la conservation du fourrage ensilé, du micro-organisme P. jensenii, ou de son équivalent génétique, en association avec une quantité faible, mais efficace pour la conservation du fourrage ensilé, d'un micro-organisme du genre Lactobacillus.

10 10. Composition suivant la revendication 9, caractérisée en ce qu'elle comprend un milieu de culture convenable.