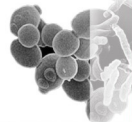


LALLEMAND
ANIMAL NUTRITION



SPECIFIC
FOR YOUR
SUCCESS



UNIVERSITY
of GUELPH



Qualité de l'ensilage et lutte biologique

*Gisèle LaPointe
Université de Guelph*

*Pascal Drouin
Lallemand Nutrition Animale*

LALLEMAND ANIMAL NUTRITION ■ SPECIFIC FOR YOUR SUCCESS
www.lallemandanimalnutrition.com

LALLEMAND

Points à couvrir

- Facteurs contribuant à la variation dans la qualité de l'ensilage
- Retour sur la fermentation
- Dynamique du microbiote des plantes: avant et après l'ensilement
- Qu'est-ce qu'il arrive après l'ouverture?
- Microorganismes pouvant causer des problèmes
- Lutte biologique

LALLEMAND ANIMAL NUTRITION ■ SPECIFIC FOR YOUR SUCCESS
www.lallemandanimalnutrition.com

LALLEMAND



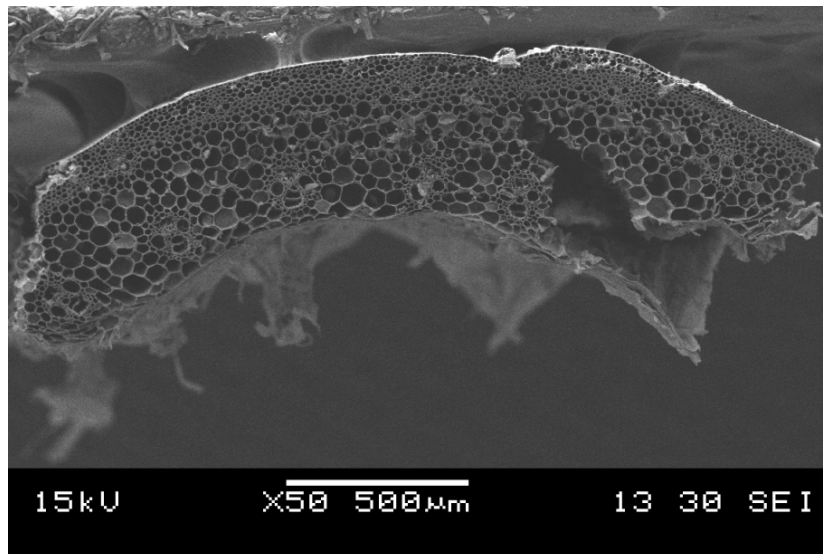
À ce niveau, rien de nouveau



LALLEMAND ANIMAL NUTRITION ■ SPECIFIC FOR YOUR SUCCESS
www.lallemandanimalnutrition.com



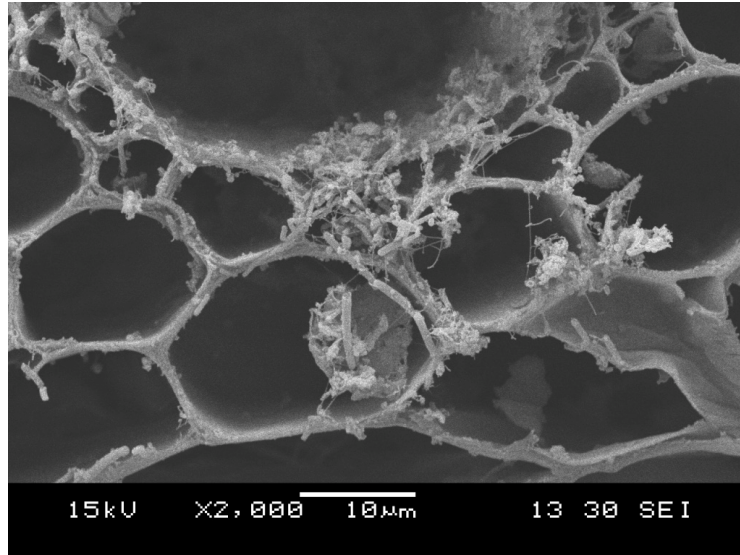
Mais si on changeait de point de vue?



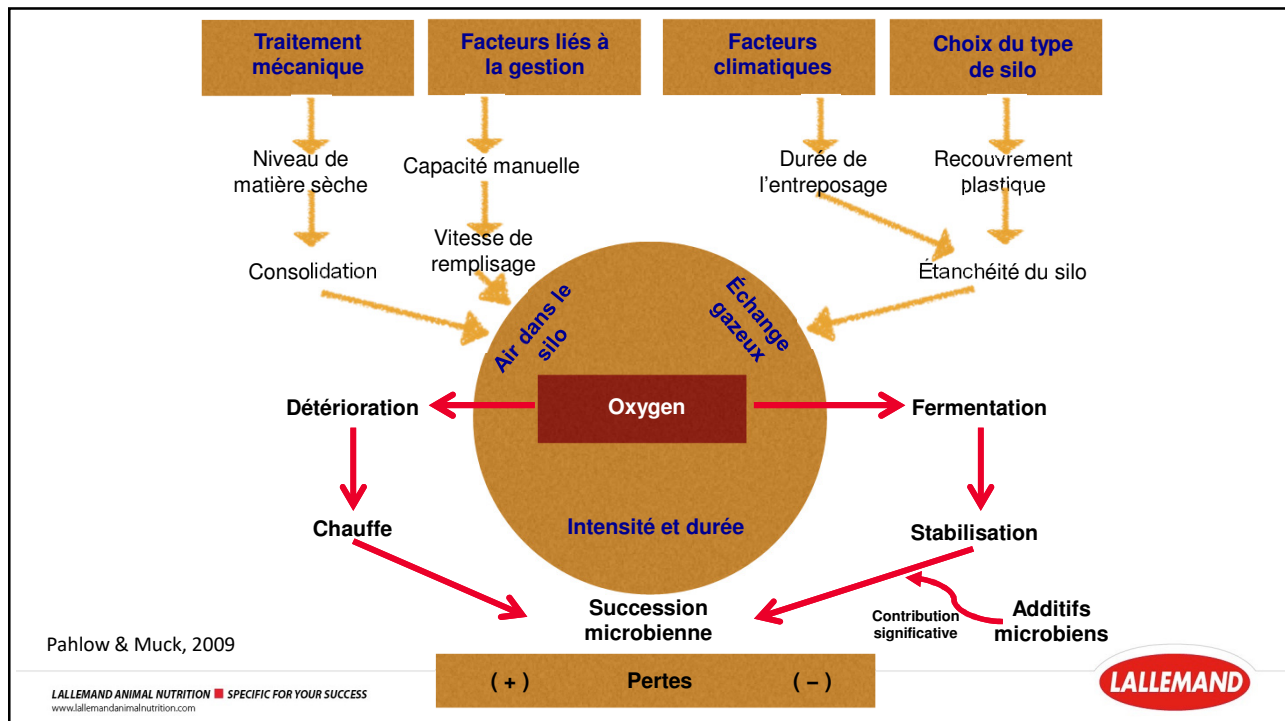
LALLEMAND ANIMAL NUTRITION ■ SPECIFIC FOR YOUR SUCCESS
www.lallemandanimalnutrition.com



Vers celui des microorganismes



LALLEMAND ANIMAL NUTRITION ■ SPECIFIC FOR YOUR SUCCESS
www.lallemandanimalnutrition.com

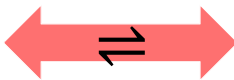
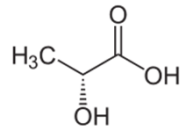


LALLEMAND ANIMAL NUTRITION ■ SPECIFIC FOR YOUR SUCCESS
www.lallemandanimalnutrition.com

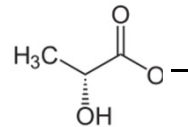


Rôle des acides organiques au niveau de la fermentation

Lactic acid
 pK_a of 3.86
 (pH value - 50% dissociated)



Lactate



Proton

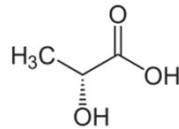
H^+

LALLEMAND ANIMAL NUTRITION ■ SPECIFIC FOR YOUR SUCCESS
 www.lallemandanimalnutrition.com



Effects of organic acids on microbial cells

Acide lactique
 pK_a de 3.86
 (valeur de pH - 50% dissociée)

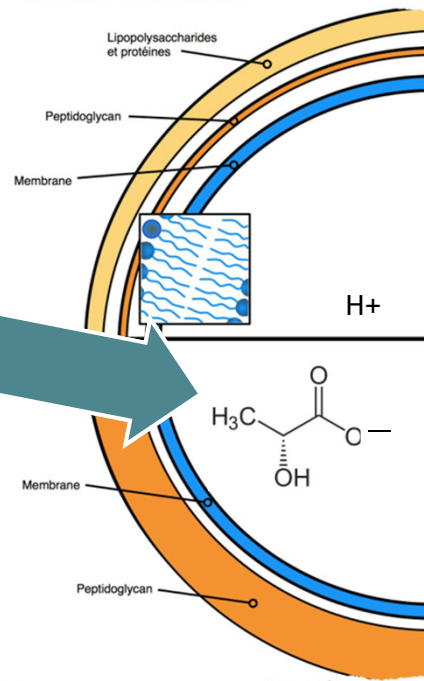


pK_a

Acetic acid 4.76

Propionic acid 4.86

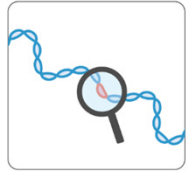
Butyric acid 4.82



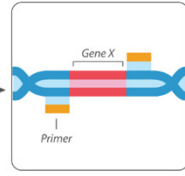
LALLEMAND ANIMAL NUTRITION ■ SPECIFIC FOR YOUR SUCCESS
 www.lallemandanimalnutrition.com



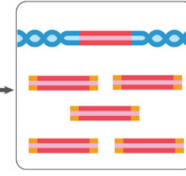
Profils des communautés microbiennes



ADN extrait



Gène ARNr 16S



Amplification par PCR

Analyse statistique
des familles de
microbes

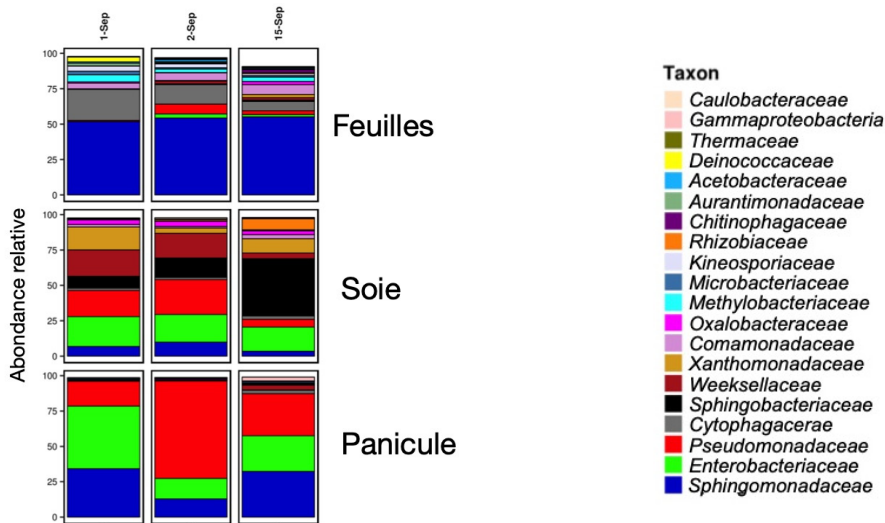


Alignement et
identification
taxonomique
des séquences

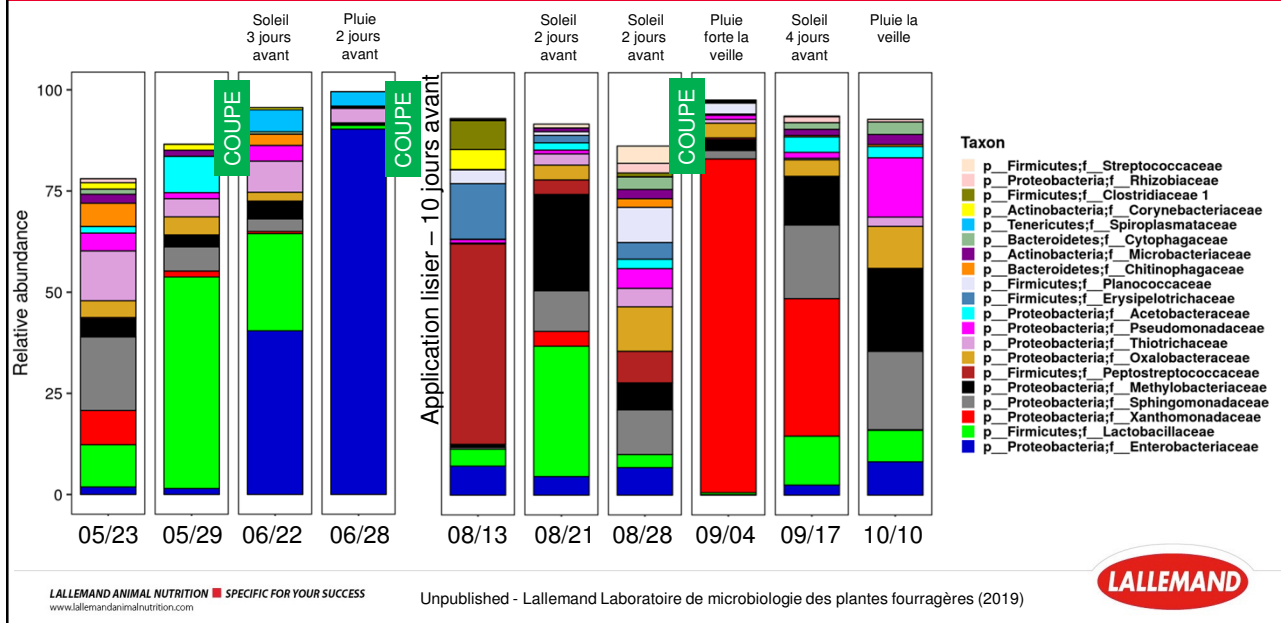


Séquençage des
amplicons

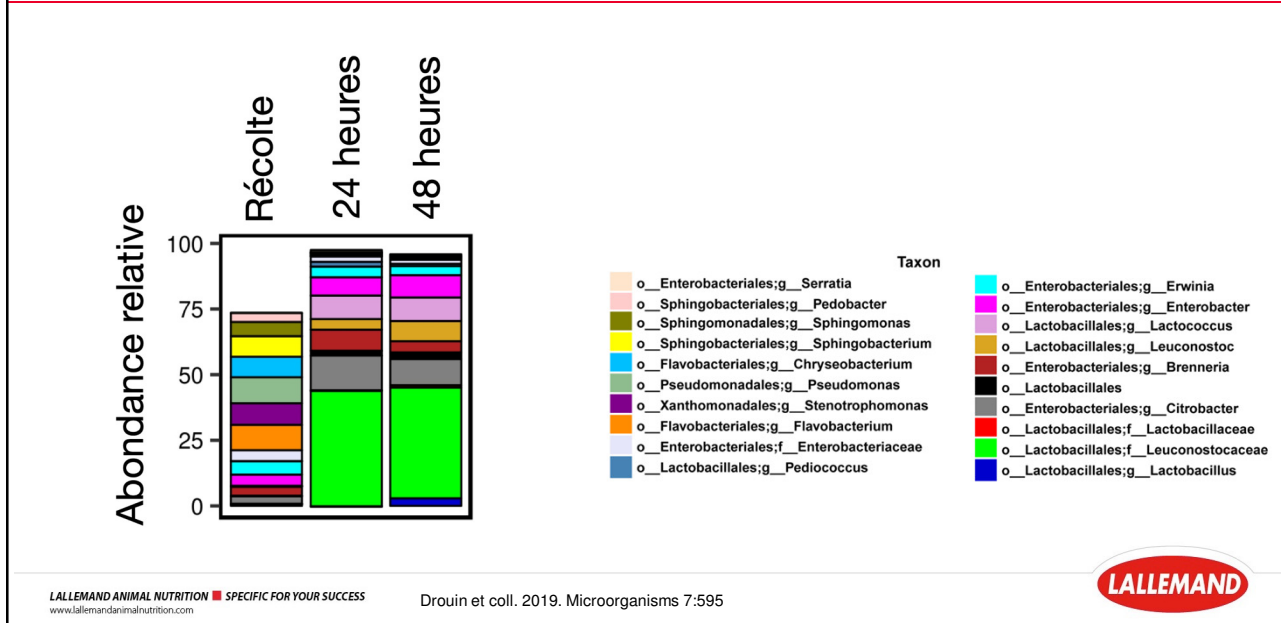
Microbiote du maïs – avant ensilage



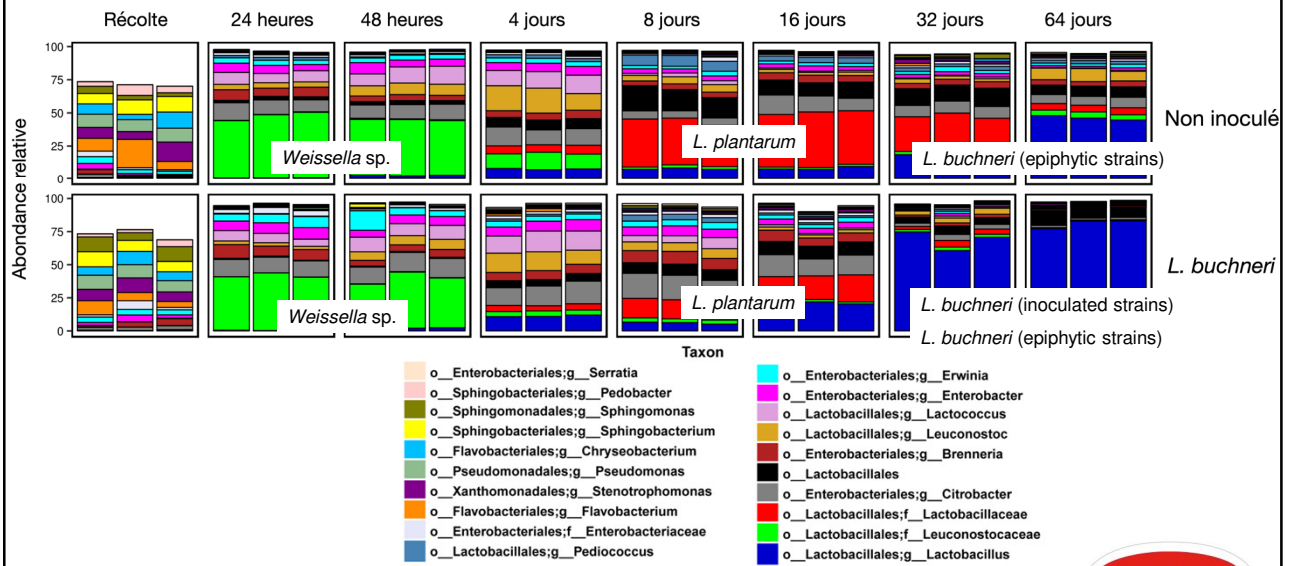
Changements du microbiote de la luzerne au champs (même parcelle)



Changements de microbiote suite à l'ensilement – maïs plante entière



Changements de microbiote suite à l'ensilage – maïs plante entière



LALLEMAND ANIMAL NUTRITION ■ SPECIFIC FOR YOUR SUCCESS
www.lallemandanimalnutrition.com

Drouin et coll. 2019. Microorganisms 7:595



Microorganismes non souhaités dans les ensilages

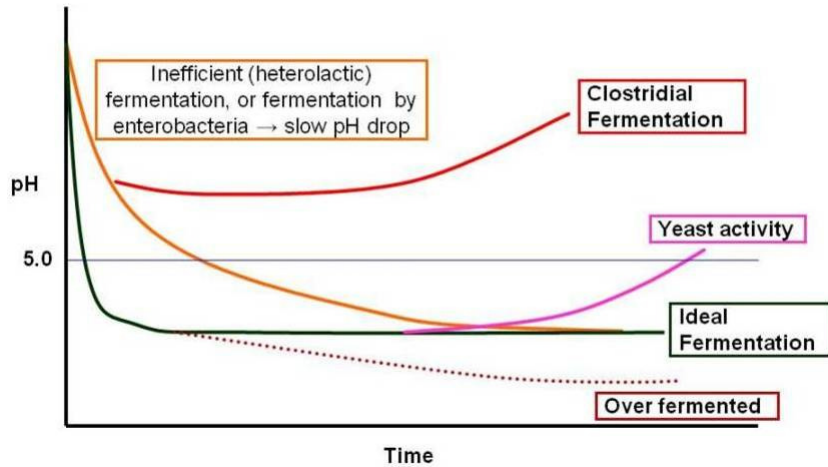
- Toxi-infections alimentaires:
 - *Clostridium*
 - *Bacillus*
 - *Listeria*
 - *Escherichia coli* produisant les toxines Shiga
 - *Staphylococcus aureus*
- Agents causant la mammite bovine: *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Streptococcus uberis* et *Streptococcus dysgalactiae*
- *Mycobacterium bovis* (tuberculose bovine) et autres mycobactéries
- Moisissures (mycotoxines)

LALLEMAND ANIMAL NUTRITION ■ SPECIFIC FOR YOUR SUCCESS
www.lallemandanimalnutrition.com



Facteur de risques pour l'innocuité des ensilages

- Réduction du pH lente
 - Fermentation lente
 - Manque de sucre fermentescible
 - Matière sèche trop élevé ou variable
- Présence d'oxygène
 - Mauvaise compaction
 - Problème d'étanchéité du silo
 - Longue période avant de recouvrir ou sceller



LALLEMAND ANIMAL NUTRITION ■ SPECIFIC FOR YOUR SUCCESS
www.lallemandanimalnutrition.com



Impact de la fermentation sur certains microorganismes non souhaités

Table 1. Microbiological analysis of the fresh whole-plant corn and 30 days silage

Sample	Counts (CFU/g of FM) of viable microorganisms						
	Lactic acid bacteria	Bacilli	Coliform bacteria	Aerobic bacteria	Molds	Yeasts	Clostridia
Fresh whole-plant corn	1.4×10 ⁵	8.6×10 ²	1.2×10 ⁵	3.3×10 ⁴	5.8×10 ⁴	2.3×10 ⁵	9.0×10 ³
30 days corn stover silage	2.4×10 ⁶	4.2×10 ²	1.1×10 ⁵	2.0×10 ⁴	ND	2.0×10 ²	ND

CFU, colony forming unit; FM, fresh matter; ND, not detected.

Li et coll. 2015. Asian Australas. J. Anim. Sci. 28:620-631

Table 5. pH values, concentrations of undissociated (Und.) acids (g/kgDM) and listeria counts in contaminated silages after 30 days. MIC values for *L. monocytogenes* are given for comparison.

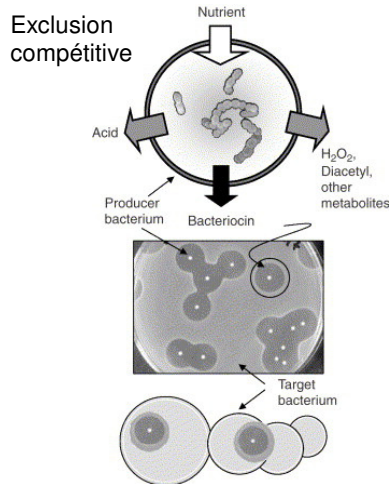
	Silages treated with:			MIC values (g/kgDM) after Östling & Lindgren (1993)	
	No additive	Formic acid	Lactic acid bacteria	MIC values (g/kgDM)	
				Anaerobic conditions	Aerobic conditions
Low DM level (200 g/kg)					
pH	4.9	4.3	3.9	4.5 to 5.1	4.8 to 5.1
Und. lactic	5.8	20.7	61.3	0.36	1.44
Und. acetic	3.3	8.1	8.7	0.96	1.44
Und. formic	<0.1	0.7	<0.1	-	-
Sum of undissociated acids	9.1	29.5	70.1	-	-
<i>L.monocytogenes</i> (log cfu/g)	2.3	nd	nd	-	-
Medium DM level (430 g/kg)					
pH	5.8	5.5	4.1	4.5 to 5.1	4.8 to 5.1
Und. lactic	0.3	0.2	30.9	0.12	0.48
Und. acetic	0.3	0.3	4.1	0.32	0.48
Und. formic	0	<0.1	0	-	-
Sum of undissociated acids	0.7	0.5	35.0	-	-
<i>L.monocytogenes</i> (log cfu/g)	7.9	4.2	nd	-	-

Pauly & Tham. 2003. Acta Vet. Scand. 44:73-86

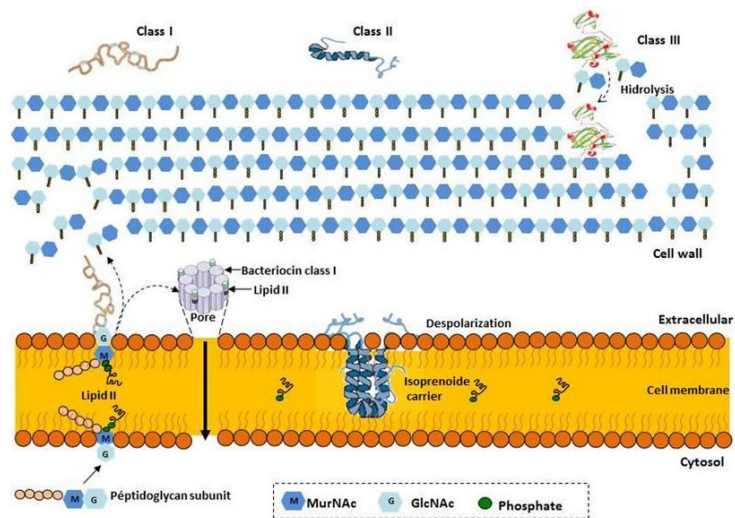
* nd = not detected.



Potentiel de lutte biologique envers les microorganismes non souhaités



Deegan et coll. 2019. Int. Dairy J. 16:1058-1071



Yusuf & Hamid . 2013. IOSR Journal of Pharmacy 3:44-50

LALLEMAND ANIMAL NUTRITION ■ SPECIFIC FOR YOUR SUCCESS
www.lallemandanimalnutrition.com

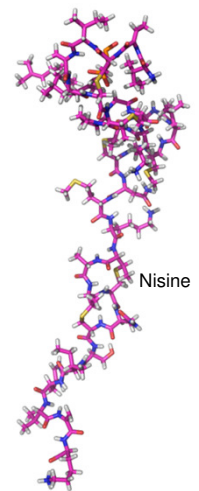


Lutte biologique – bactéries lactiques

- Production d'acides organiques
 - Contribution à l'abaissement du pH
- Synthèse de peptide ayant des propriétés antimicrobiennes
 - Bactériocines spécifiques – les lantibiotiques
 - Type A – action rapide en créant des pores dans les parois (i.e. nisine, gallidermin)
 - Type B – inhibe la synthèse de parois (i.e. cinnamycin, duramycin)
 - Active à faible concentration
- Chacune peut-être spécifique envers des espèces spécifiques

Table 4. Antimicrobial activity of the representative strains

Strain number	Antimicrobial activity		
	<i>Salmonella enterica</i> ATCC 43971 [†]	<i>Escherichia coli</i> ATCC 11775 [†]	<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 4698 [†]
ZZU 50	++	+++	+++
ZZU 64	+	+	++
ZZU 170	+	+	+
ZZU 203	+++	+++	+++
ZZU 204	++	+++	+++
ZZU 205	+	++	+
ZZU 223	+	+++	+
ZZU 273	++	+++	+++
ZZU 274	+++	++	+++
ZZU 278	+++	++	+++
ZZU 283	+++	+	+++
ZZU 299	+++	+	+++



Nisine

LALLEMAND ANIMAL NUTRITION ■ SPECIFIC FOR YOUR SUCCESS
www.lallemandanimalnutrition.com

Li et coll. 2015. Asian Australas. J. Anim. Sci. 28:620-631



Lutte biologique – levure de la famille des *Saccharomycetaceae*

A-Compétition pour nutriments
Exclusion compétitive

B-Changement de pH

C-Production d'éthanol

D-Mycococines

- E-Formation de pores
- F-Inhibe synthèse de parois
- G-Bloque division cellulaire

H-Inhibition de toxines bactériennes

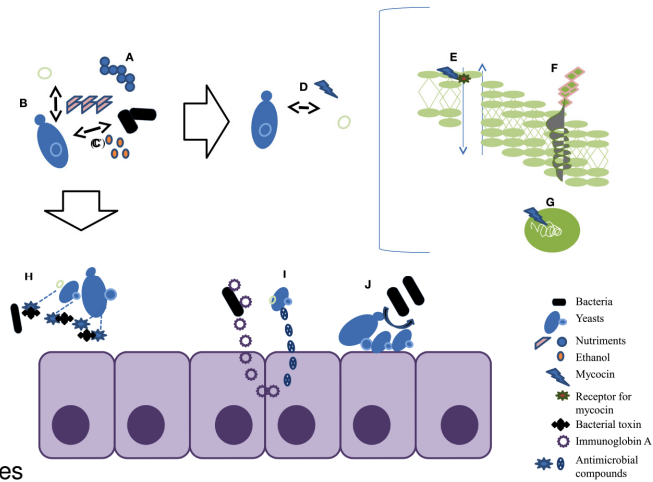


FIGURE 1 | Summary of the different aspects of antagonistic properties of yeasts. (A) Competition for nutrients; **(B)** pH changes; **(C)** production of high concentrations of ethanol; **(D)** killer toxins or mycococins; **(E)** mycocin causes ion leakage by the formation of channels on the cytoplasmic

membrane; **(F)** mycocin inhibits the synthesis of cell wall component β -1,3-glucan; **(G)** mycocin interrupts cell division by blocking the DNA synthesis; **(H)** proteases degrade bacterial toxins; **(I)** stimulate the immune response; **(J)** yeasts inhibit attachment to intestinal cells.

LALLEMAND ANIMAL NUTRITION ■ SPECIFIC FOR YOUR SUCCESS
www.lallemandanimalnutrition.com

Hatoum et coll. 2012. *Frontiers in Microbiology*. 3:article 421



Importance pour la production laitière

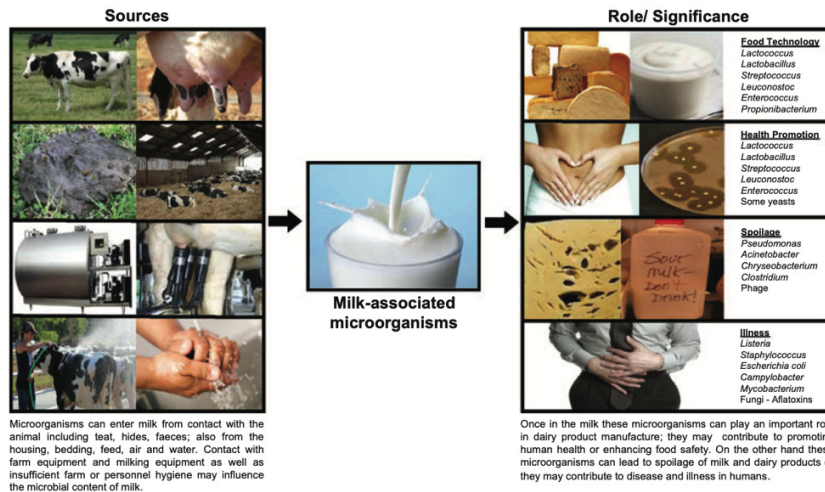


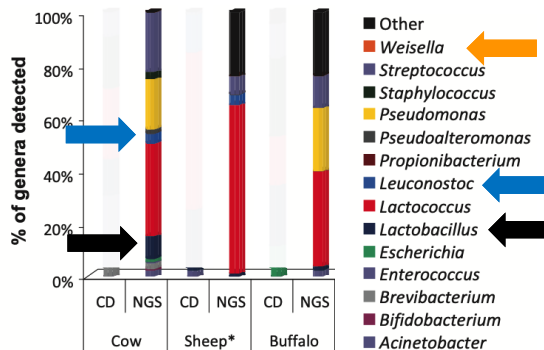
Fig. 1. The potential sources of the microorganisms that are present in raw milk and the role/significance that some of these have when present in milk.

LALLEMAND ANIMAL NUTRITION ■ SPECIFIC FOR YOUR SUCCESS
www.lallemandanimalnutrition.com

Quigley et coll. 2013. *The complex microbiota of milk*. *FEMS Microbiol. Rev.* 37:664-698



Importance pour la production laitière



Analyse du profil microbien du lait par séquençage des amplicons du gène ARNr 16S

- Primordial pour la productivité des animaux
- Maintenir le troupeau en santé
 - Important autant pour les animaux en lactation que pour les taures
- Ensilage de qualité
 - Permet de réduire la charge de cellules somatiques
 - Contribue les risques de transfert de bactéries sporulées dans le lait

Listériose entérique des bovins en Argentine

- Deux jours après la consommation de l'ensilage mois
- 20% du troupeau affecté (40 animaux)
- Perte de 13 animaux sur une période de 10 jours
- *Listeria monocytogenes* isolé de l'ensilage, de la vésicule biliaire et détecté dans les ganglions lymphatiques mesentériques et la paroi intestinale.

Brief Communication

A. J. V. L. D.

Enteric listeriosis in grazing steers supplemented with spoiled silage

Journal of Veterinary Diagnostic Investigation
2016, Vol. 29(1) 65-69
© 2015 The Author(s)
Reprints and permissions:
sagepub.com/journalsPermissions.nav
DOI: 10.1177/1040638715616658
jvdi.sagepub.com

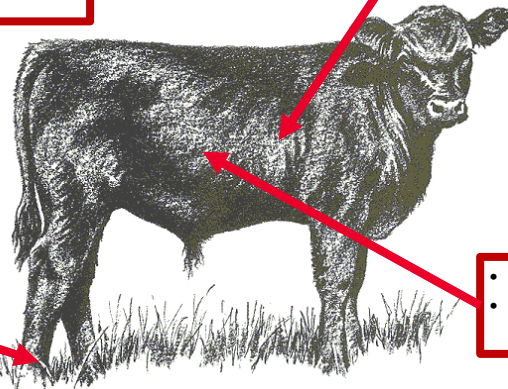
Juan A. García,¹ Juan F. Micheloud, Carlos M. Campero, Eleonora L. Morrell, Ernesto R. Odriozola, Ana R. Moreira

Certains impacts des mycotoxicoles

- Chaleurs irrégulières
- Problèmes de conception
- Kystes ovariens
- Pertes d'embryons

- Gastroentérites
- Hémorragies intestinales
- Fonctions ruminales anormales
- Diarrhées
- Cétoses

- Contamination du lait
- Mammites
- Réduction de la production de lait pour le veau



- Pododermatite (laminitis)

- Réduction prise alimentaire
- Réduction efficacité alimentaire

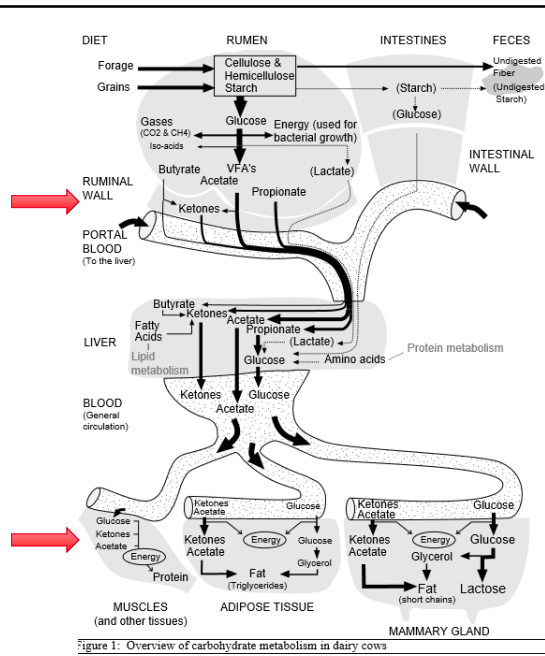


Figure 1: Overview of carbohydrate metabolism in dairy cows

L'acide butyrique en excès provenant d'ensilage contaminé avec spores butyriques:

- taux élevés de cétones dans le plasma sanguin (acidose).

Effets négatifs sur la production laitière, la fertilité et la santé (maladie métabolique)



Effets des inoculants bactériens pour ensilages envers l'établissement de microorganismes non souhaités

Effets sur les ensilages	Exemple d'additifs bactériens	Effets microbiens ou physico-chimiques	Métabolismes microbiens impliqués
Limite l'établissement des microorganismes pathogènes	<i>Enterococcus faecium</i> <i>Lactobacillus</i> sp.	Augmente la concentration en acide lactique. Réduction de <i>E. coli</i> , entérobactéries, staphylocoques, <i>Bacillus</i> et <i>Listeria</i>	Synthèse d'acides organiques (acide lactique). Action directe suite à la synthèse de molécules antibiotiques.
Limite la production de mycotoxines	<i>Lactobacillus</i> sp. <i>Enterococcus</i> sp. <i>Streptococcus</i> sp.	Réduit concentration en mycotoxines (zéaralénone et fumonisines)	Biotransformation de certaines toxines. Attachement aux parois microbiennes pour d'autres.
Réduit la charge en amines biogènes	<i>Lactobacillus plantarum</i> seul ou en combinaison avec <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , et <i>Pediococcus pentosaceus</i>	Réduit la concentration en tyramine, cadavérine, ou putrescine	Inhibition de microorganismes impliqués dans la production des amines biogènes. Réduction de la dégradation des peptides par une acidification rapide et induction de l'environnement anaérobie.

LALLEMAND ANIMAL NUTRITION ■ SPECIFIC FOR YOUR SUCCESS
www.lallemandanimalnutrition.com

Adapté de:
Dunière et coll. 2013. Animal Feed Sci. Technol. 182: 1-15



Réduction d'*E. coli* O157:H7 dans l'ensilage de luzerne

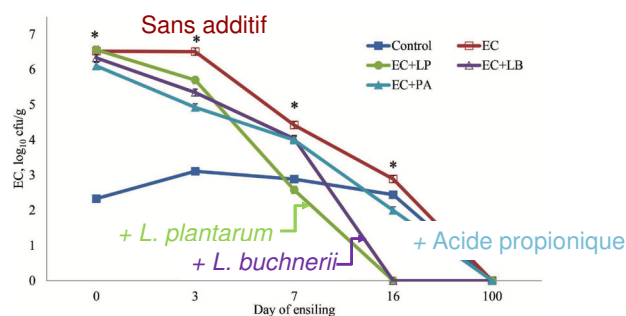


Figure 4. *Escherichia coli* O157:H7 (EC) of alfalfa forage treated without (control) or with *Escherichia coli* O157:H7 (EC) alone, or EC and either of 2 bacterial inoculants or propionic acid during ensiling. Control = distilled water; EC = 1×10^7 cfu/g of *E. coli* O157:H7; LP = 1×10^7 cfu/g of *Lactobacillus plantarum*; LB = 1×10^7 cfu/g of *Lactobacillus buchneri*; PA = 2.0 g/kg of propionic acid; Treatment \times day P -value = 0.001; an asterisk (*) indicates that concentrations differed at the day of ensiling specified ($P < 0.05$). Error bars represent SE. Color version available online.

Journal of Dairy Science Vol. 99 No. 6, 2016

LALLEMAND ANIMAL NUTRITION ■ SPECIFIC FOR YOUR SUCCESS
www.lallemandanimalnutrition.com



Conclusions et Questions

- Joindre des stratégies de lutte biologique aux bonnes pratiques de gestion
- Les bactéries lactiques, dont les *Lactobacillus* couramment utilisées en tant qu'additif microbien pour ensilage, possèdent des propriétés de lutte biologique permettant d'assurer un ensilage de qualité:
 - Production d'acides organiques permettant de réduire le pH
 - Capacité d'exclusion compétitives envers souches épiphytes et aussi envers des pathogènes
 - Production de molécules ayant un effet sur la survie de microorganismes non-souhaités dans les ensilage
- Ces particularités peuvent réduire de façon importante la « charge » en microorganismes pathogènes
- Une bonne gestion du chantier d'ensilage, le maintien de l'absence d'oxygène ainsi que d'assurer de retirer assez d'ensilage du silo lors de la reprise permet d'assurer la qualité de l'ensilage et d'éviter le développement de bactéries sporulées, dont:
 - *Bacillus cereus* (contamination du lait)
 - *Clostridium perfringens* (santé animale)
 - *Clostridium botulinum* (santé animale)
- Un ensilage de qualité permet aussi d'éviter des contaminations microbiennes pour les produits de l'entreprise, dont le lait et la viande.

NOTICE: This presentation and its contents including any research data is, unless otherwise specifically attributed, the intellectual property of Lallemand Animal Nutrition, a trading division of Lallemand Inc ("Lallemand") and may not be copied or reproduced or distributed, in whole or in part, without the prior consent of Lallemand.

DISCLAIMER: Although reasonable care has been taken to ensure that any facts stated in this presentation are accurate and that any opinions or advice expressed are fair and reasonable, no warranty is given as to the accuracy, completeness or correctness of the information. To the extent permitted by law, Lallemand, its officers, employees and agents shall not be liable for any loss suffered, howsoever arising, from the use by a third party of the information, advice or opinions contained within this presentation. This presentation does not constitute an offer, invitation, solicitation or recommendation with respect to the purchase of Lallemand products and information within, including the specifications of products, may be amended or withdrawn without prior notice. This presentation may contain information on products which are not available for sale nor are approved for use within certain jurisdictions.

