

Teneur en nitrates de l'ensilage de maïs

M Kammerer, H Pouliquen, L Pinault

École nationale vétérinaire de Nantes, CP 3013, 44087 Nantes cedex 03, France

(Reçu le 26 novembre 1991; accepté le 17 avril 1992)

Résumé — L'ensilage de maïs représentant un élément essentiel de la ration des bovins, il est intéressant de connaître sa teneur moyenne en nitrates, afin de pouvoir estimer les niveaux d'exposition et le risque éventuel d'intoxication chronique lié à un apport excessif par cet aliment. Les auteurs présentent la méthode et les résultats de l'analyse de 148 échantillons d'ensilage de maïs prélevés sur le terrain. La teneur moyenne est de 376 mg de N-NO₃/kg MS, mais il existe une grande hétérogénéité des concentrations, non seulement entre différents ensilages, mais également à l'intérieur d'un même silo.

nitrate / ensilage de maïs / toxicité

Summary — **Nitrate content in maize silage.** *Since maize silage is an important component of cattle feed, it is important to determine its nitrate content, in order to evaluate the risk of chronic intoxication. The authors describe a method for determining nitrate and nitrite content in maize silage, and give results of an analysis of 148 samples of silage collected from about 50 farms in the western region of France. The mean value of nitrate content in silage is 376 mg N-NO₃/kg DM, but wide variability in content was observed between different silages and within the silage itself.*

nitrate / maize silage / toxicity

INTRODUCTION

Si l'intoxication aiguë par les nitrates est bien connue chez les ruminants, il n'en est pas de même de leurs effets à moyen et long terme sur la santé et la productivité des animaux... Ces effets sont insidieux et peu spécifiques. On suspecte en particulier un effet défavorable sur la fertilité et la croissance, ainsi qu'une baisse de la résistance des animaux aux infections, et ce par le biais de l'oxydation de la vitamine A et de l'inactivation d'enzymes divers, en particulier ceux intervenant dans les fonctions immunitaires (Wood, 1980; Page *et al*, 1990).

Le danger d'intoxication chronique chez les ruminants est lié non seulement à la pollution de l'eau d'abreuvement, mais plus encore à un apport excessif par la ration, car les fourrages renferment des concentrations parfois très élevées de nitrates. Pour estimer les risques, il faut évaluer les niveaux d'exposition et il est donc important de connaître l'apport réalisé par un élément essentiel de la ration des bovins : l'ensilage de maïs. Peu de données sont disponibles à ce sujet, car la teneur en nitrates est rarement mesurée lors de l'analyse habituelle de la valeur alimentaire de la ration. Spoelstra (1985), estime que cette concentration

varie en moyenne de 1 à 4 g/kg MS et peut atteindre parfois 10 g/kg MS!

La teneur en nitrates des végétaux est en effet très variable, selon différents facteurs intrinsèques (espèce, variété, âge, organe) mais aussi extrinsèques (fertilisation azotée, climat, sol...). C'est pourquoi il est très difficile de proposer des valeurs «normales». De plus, dans le cas de l'ensilage, les fermentations microbiennes peuvent modifier les concentrations de départ, puisqu'une partie de la quantité initiale de nitrates est réduite en ammoniacque ou en oxydes d'azote.

Les mini-silos ou même les cultures expérimentales de plein champ permettent difficilement de tenir compte de tous ces facteurs. Aussi, pour avoir une bonne évaluation de la quantité de nitrates apportée par l'ensilage de maïs, nous a-t-il semblé intéressant de mener directement l'étude sur le terrain, en réalisant l'analyse d'un grand nombre d'échantillons récoltés dans différentes exploitations agricoles de l'Ouest de la France.

Cette enquête avait pour objectif de cerner la fourchette des valeurs de concentration en nitrates dans les ensilages de maïs consommés par des animaux sans effet néfaste apparent sur leur santé ou leurs productions, afin d'être en mesure d'interpréter ultérieurement les résultats d'analyse portant sur des ensilages suspects d'être responsables d'intoxication chronique.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Ensilages récoltés

Les prélèvements d'ensilage ont été réalisés durant la période décembre 1989-mai 1990, grâce à la collaboration de techniciens du Contrôle laitier ou de différentes laiteries, dans une cinquantaine d'exploitations réparties dans les dé-

partements suivants : Ille-et-Vilaine, Loire-Atlantique, Maine-et-Loire, Mayenne, Sarthe et Vendée. Ces exploitations faisaient partie d'un réseau de fermes dites «Fermes pilotes», parce que, sélectionnées pour leur bonne gestion et bonne conduite du troupeau, elles participaient à un programme de suivi «Qualité du lait» organisé par l'ITEB et le GIE Lait-viande des Pays de la Loire. Les conditions de réalisation et de conservation de leurs ensilages étaient donc satisfaisantes.

L'ensilage de chacune de ces exploitations a fait l'objet de prélèvement au moins 1 fois, et parfois à 2 ou 3 reprises espacées de 2 ou 3 mois. À chaque fois, 2 échantillons ont été prélevés sur le front de silo : l'un au centre, l'autre en périphérie. L'ensemble a représenté 148 échantillons.

Ces prélèvements étaient congelés 2 à 4 h plus tard et conservés à une température de -20 °C jusqu'au moment de l'analyse.

Méthode d'analyse de la teneur en nitrates

Détermination de la matière sèche

Les résultats étant exprimés par rapport à la matière sèche, pour chaque prélèvement nous avons au préalable déterminé le taux d'humidité de l'ensilage, à partir d'un échantillon d'environ 50 g, en réalisant la pesée avant et après passage à l'étuve à 100 °C pendant 24 h.

Détermination de la concentration en nitrates

Aucune méthode n'est homologuée pour le dosage des nitrates dans l'ensilage. Parmi les différentes méthodes disponibles, nous avons retenu celle proposée par l'AOAC (1977) dont le principe est celui de toutes les méthodes AFNOR homologuées pour le dosage dans l'eau ou les denrées d'origine animale ou végétale : réduction de l'ion nitrate en nitrite par passage sur colonne de cadmium, puis diazotation et colorimétrie.

Le protocole analytique mis en œuvre est le suivant : un échantillon d'ensilage d'environ 100 g, pesé avec précision, est introduit dans un bécher de 2 l et broyé au mixer pendant 5-10 s;

on ajoute un volume d'eau ultra-pure bouillante, tel que le bécher renferme au total 1 l d'eau, en prenant en compte le pourcentage d'eau présent dans l'ensilage et déterminé au préalable; le contenu du bécher est laissé à macérer pendant 1 h, et agité régulièrement; il est alors filtré sur filtre Whatman 42 et le filtrat est récupéré.

On prélève 5 ml de ce filtrat et on ajoute 5 ml de solution tampon pH 9,6 et 15 ml d'eau. La solution tampon est préparée en dissolvant 50 g de chlorure d'ammonium dans 500 ml d'eau et le pH 9,6 est ajusté à l'aide d'ammoniaque.

Ces 25 ml sont passés sur une colonne de cadmium de 15–20 cm de hauteur, à un débit constant de l'ordre de 3–5 ml/min. La colonne est rincée par 15 ml de solution de NaCl à 20% et l'éluat est récupéré dans une fiole de 50 ml. On ajoute 5 ml de solution de sulfanilamide à 0,5% et, après agitation suivie de 3 min de repos, 2 ml de solution aqueuse de *N*-naphtyl-éthylène diamine (NEDA) à 0,5%. On complète alors à 50 ml avec de l'eau; le contenu est agité et laissé à reposer durant 20 min pour obtenir la coloration maximale qui est stable durant 2 h au moins. L'absorbance est mesurée au spectrophotomètre à la longueur d'onde de 540 nm.

La concentration de l'échantillon est évaluée par référence à une gamme d'étalonnage, préparée à partir de solutions de nitrate de potassium renfermant 0, 6, 12 et 18 mg/l de l'ion nitrate.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Méthode d'analyse

La méthode de détermination de la matière sèche retenue sous-estime la teneur réelle en matière sèche et comme le proposent Dulphy et Demarquilly (1981), nous avons rectifié la valeur obtenue à l'aide d'un coefficient multiplicateur moyen de 1,05.

La méthode de préparation de l'échantillon a fait l'objet d'une validation dans notre laboratoire. Après avoir testé comme milieu d'extraction une solution de BaCl₂ et CdCl₂ à pH 1 (AOAC, 1977), une solution de NaOH à 2 % (pH 8) (Sen et Donaldson, 1978), une solution saturée de borax

(Stahr, 1977), nous avons finalement retenu comme solvant d'extraction le plus satisfaisant, l'eau ultra-pure à ébullition.

Le résultat de notre dosage rend compte en fait de l'ensemble (nitrates + nitrites) présents au départ dans l'échantillon. Cependant, nous avons vérifié sur une dizaine d'échantillons que la concentration en nitrites dans les ensilages est très faible (inférieure à 6 mg de N-NO₂/kg MS), lorsque la phase fermentaire est terminée et que le silo est ouvert à la consommation. Nous n'avons donc pas jugé nécessaire de rectifier le résultat brut.

Teneurs en nitrates

Les résultats confirment la grande hétérogénéité de la teneur en nitrates de l'ensilage de maïs, puisque les valeurs s'échelonnent entre 9 et 1 469 mg de N-NO₃ par kg de matière sèche (c'est-à-dire entre 41 et 6 507 mg de nitrates/kg). Mais ces valeurs extrêmes sont très occasionnelles, comme le montre la figure 1, qui reproduit l'histogramme de répartition des résultats par tranche de 250 mg de N-NO₃/kg MS. Les concentrations relevées sont donc du même ordre de grandeur que les estimations de Spoelstra (1985) citées plus haut.

La majeure partie des échantillons (plus de 72%) a une concentration comprise entre 50 et 550 mg de N-NO₃/kg MS; la moyenne sur l'ensemble des résultats est de 376 mg/kg MS, avec un écart type de 325. Remarquons que 8 échantillons sur 148 (soit un peu plus de 5%) avaient une concentration supérieure à 1 160 mg de N-NO₃/kg MS, soit 5 g de NO₃⁻, ce qui est classiquement considéré comme le seuil de concentration en nitrates dans la ration à partir duquel peuvent se manifester des effets néfastes à long terme chez les bovins (Meissonier, 1978; Berschneider *et al*, 1979).

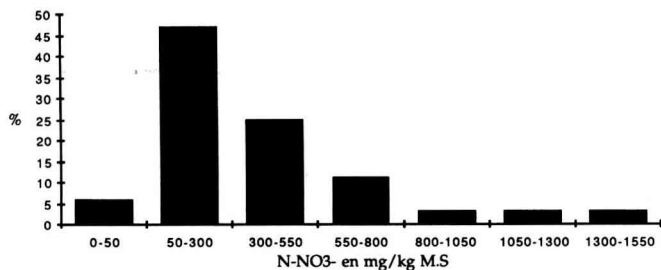


Fig 1. Histogramme de répartition des ensilages en fonction de leur teneur en azote nitrique.

On observe de grandes différences à l'intérieur d'un même silo, d'une part entre 2 endroits éloignés du silo, mais également sur un même front de coupe entre le centre et la périphérie. Le plus souvent, l'écart est de quelques dizaines de mg d'azote nitrique, mais il a atteint 1 092 mg dans un ensilage où on mesurait simultanément 1 361 mg N-NO₃/kg MS au centre et 269 en périphérie.

La concentration maximale dans le front de silo n'est pas toujours relevée au même endroit; c'est parfois la périphérie qui se révèle le plus riche et globalement on ne note pas de différence significative (selon le test *t* de Student) entre les moyennes des résultats de ces 2 zones (tableau I).

Tableau I. Moyenne (*m*) et écart type (*s*) en mg/kg MS de la concentration en azote nitrique dans les échantillons prélevés au centre et en périphérie des silos.

	Centre	Périphérie
<i>m</i>	421	347
<i>s</i>	331	296

Ce n'est du reste pas surprenant, dans la mesure où les silos sont réalisés par dépôt de couches successives de maïs pouvant provenir de parcelles différentes par les fumures azotées réalisées, les précédents culturaux, les conditions pédo-climatiques. C'est pourquoi les concentrations peuvent varier notablement d'une année sur l'autre, si le climat ou les conditions culturales sont modifiées.

CONCLUSION

Le bilan de ces résultats montre que l'ensilage de maïs peut renfermer des quantités importantes de nitrates, pouvant atteindre et même dépasser les limites estimées par différents auteurs comme dangereuses à long terme pour la santé ou les productions des bovins.

Mais l'ensilage ne représente pas le seul élément de leur ration. De plus, en raison de la très grande variabilité des concentrations mesurables au sein de ce fourrage, il est probable que le plus souvent les concentrations très élevées ne correspondent pas sur le terrain à un niveau d'exposition régulier et prolongé, mais plutôt à une consommation occasionnelle et le risque n'est alors plus le même.

En conséquence, il est important lorsque l'on désire connaître l'apport en nitrates de la ration, de ne pas se baser sur l'analyse d'un seul échantillon d'ensilage, mais de réaliser 2 ou 3 prélèvements sur le même front de coupe et de répéter ces prélèvements quelques semaines plus tard, afin d'apprécier la régularité ou la variabilité de l'apport.

REMERCIEMENTS

Cette étude n'aurait pu être conduite sans la collaboration de M Larhantec, technicienne au laboratoire du service de pharmacie-toxicologie de l'ENVN. Nous adressons nos remerciements pour leur précieuse participation, à JL Meynard de l'ITEB, au Dr L Caquineau, à M Besnard du Contrôle laitier de la Sarthe, ainsi qu'aux laiteries suivantes : Laiterie Saint-Père (St-Père-en-Retz, 44), La Cana (Ancenis, 44), Laiterie Tessier (Seiches-sur-le-Loir, 49), Celia (Craon, 53), Fromageries Perreault (Château Gontier, 53), Clamat (Le Lude, 72), ULCO (Luçon, 85).

RÉFÉRENCES

Association of Official Analytical Chemists (AOAC) (1976) *In: Methods of analysis*, 12^e

edn, Georges Banta Company Inc, Menasha, 132-133

- Berschneider F, Willer S, Neuffer K (1979) Untersuchungen zur Frage der Nitrattoleranz bei ständiger Verabreichung von Grünfütter mit erhöhtem Nitrat und Nitritgehalt im Hinblick auf die Vermeidung von Schädwirkungen und Leistungsdepressionen bei Wiederkäuern. *Tierzucht* 33, 8, 362-366
- Dulphy JP, Demarquilly C (1981) Problèmes particuliers aux ensilages. *In: Préviation de la valeur nutritive des aliments des ruminants*. INRA Publications, Versailles, 81-104
- Meissonnier E (1978) Intoxication par les nitrates. *Point Vét* 6, 30, 67-75
- Page RD, Gilson WD, Guthrie LD (1990) Serum progesterone and milk production and composition in dairy cows fed two concentrations of nitrate. *Vet Hum Toxicol* 32, 27-31
- Sen NP, Donaldson B (1978) Improved colorimetric method for determining nitrate and nitrite in foods. *J Assoc Off Anal Chem* 61, 6, 1389-1394
- Spoelstra SF (1985) Nitrate in silage. *Grass Forage Sci* 40, 1-11
- Stahr HM (1977) Grasses, alfalfa, silage – automated colorimetric procedure. *In: Analytical toxicology methods manual*. IOWA State Univ Press, Ames, Iowa, 68-71
- Wood PA (1980) The molecular pathology of chronic nitrate intoxication in domestic animals: a hypothesis. *Vet Hum Toxicol* 22, 26-27