

## ENSILAGES « GNOTOXÉNIQUES » DE FOURRAGES

### I. — ÉTUDE CINÉTIQUE DU DÉVELOPPEMENT BACTÉRIEN DANS DES ENSILAGES « GNOTOXÉNIQUES » (1) DE LUZERNE, FÊTUQUE ET RAY-GRASS

Ph. GOUET, M. CONTREPOIS, J. BOUSSET  
et Nathalie BOUSSET-FATIANOFF

avec la collaboration technique de Christine BES et Marie-France DORBE

Laboratoire de Microbiologie,  
Centre de Recherches de Clermont-Ferrand, I. N. R. A.,  
63 - Saint-Genès-Champagnelle

---

### RÉSUMÉ

Cette étude se propose d'analyser dans des ensilages de Luzerne, Fêtuque et Ray-Grass, le développement individuel, la persistance et les effets antagonistes éventuels de quelques espèces bactériennes dominantes : *L. plantarum*, *L. brevis*, « branching » *Lactobacillus*, *Str. faecalis*, *Pediococcus* sp. *Enterobacter* sp. *C. butyricum*, *C. tyrobutyricum*, *Clostridium* protéolytique.

Dans ce but, les trois fourrages hachés et ensilés dans des bocaux de 0,7 litre ou dans des piluliers de 50 ml, sont stérilisés par irradiation gamma. Les souches précédentes sont inoculées soit séparément, soit en association ( $M_1$  à  $M_6$ ) et on les dénombre individuellement après 2, 5, 8, 15, 30, 50, 90, 150 jours de conservation à 22°C. Avec le milieu de DE MAN, ROGOSA et SHARPE (1960) (MRS), le dénombrement sélectif est obtenu par la température (*Pediococcus* sp. 42°C), le marquage par des antibiotiques (*L. plantarum* avec la bacitracine, *L. brevis* avec la pénicilline), le pH (9,6) pour *Str. faecalis*, l'immunofluorescence (« branching » *Lactobacillus*) ; d'autres milieux de culture sélectifs sont employés pour *Enterobacter* sp. (Violet Red Bile Difco), pour *C. tyrobutyricum* et *C. butyricum* (milieu au lactate), *Clostridium* protéolytique (milieu à la gélatine).

Parallèlement, une cinétique de l'évolution des microflores Gram négative et Gram positive (« lactique »), anaérobie sporulée protéolytique ou fermentant le lactate, est réalisée à partir des ensilages « holoxéniques » provenant des mêmes fourrages.

Les résultats montrent que, dans les ensilages « polygnotoxéniques », la microflore Gram négative se développe aussi vite que la microflore « lactique » mais la première disparaît rapidement alors que la seconde reste dominante. La même évolution est remarquée dans les ensilages « holoxéniques » mais la microflore Gram négative y persiste plus longtemps (surtout dans la Luzerne et la Fêtuque) et les *Clostridium* lactate + se multiplient dans le Ray-Grass et la Fêtuque. Dans les ensilages « gnotoxéniques » de Fêtuque, seule l'association  $M_6$  inhibe la multiplication de *C. tyrobutyricum*.

Parmi les *Lactobacillaceae*, *L. brevis* (hétérofermentaire) est bien l'espèce la plus persistante lorsque la durée de conservation augmente ; *L. plantarum* arrive sur le même plan suivi de « branching » *Lactobacillus* et de *Pediococcus* sp. *Str. faecalis* qui n'a qu'une croissance limitée et une existence éphémère.

---

(1) La terminologie employée dans ce texte est celle proposée par RAIBAUD *et al.*, (1966).

## INTRODUCTION

Au cours de la conservation des fourrages par ensilage les remaniements métaboliques sont dus au développement simultané de plusieurs espèces bactériennes, anaérobies facultatives ou strictes, sporulées ou non, ainsi qu'à l'action de certaines enzymes végétales. L'orientation et l'intensité des fermentations dépendent de la microflore présente sur le fourrage au moment de la récolte (LANGSTON, BOUMA, 1960 a), de la composition biochimique de l'espèce fourragère qui constitue le substrat, de sa teneur en matière sèche (GOUET *et al.*, 1965), ainsi que des conditions de température (LANIGAN 1963, 1965; GIBSON *et al.*, 1958), du pH, de l'anaérobiose qui règnent au sein du silo. Les pertes d'éléments nutritifs (sous forme de gaz principalement), la qualité de l'ensilage, son appétibilité dépendent directement des espèces bactériennes qui vont proliférer et se succéder au cours de la conservation.

L'analyse *in situ* de l'évolution bactérienne dans un ensilage « holoxénique » naturellement contaminé est restée jusqu'à ce jour nécessairement incomplète en raison de l'absence de techniques permettant de dénombrer sélectivement des espèces appartenant à un même groupe physiologique ou à une même famille mais dont les produits du métabolisme diffèrent par leur nature et (ou) leur concentration. Cette étude ne peut être entreprise que si l'on dispose de fourrages stériles (« axéniques ») susceptibles d'être inoculés avec une microflore connue, simple ou complexe (ensilage « monoxénique » ou « polygnotoxénique ») et dont le développement peut être ensuite suivi; ceci implique de produire un végétal « axénique » (MABBITT, 1951; LUCKEY, 1963) en quantités suffisantes pour permettre d'effectuer l'ensemble des analyses biochimiques et microbiologiques ou encore de stériliser (HUHTANEN, PENSACK, 1963; GOUET, FATIANOFF, 1964) un fourrage récolté sur le champ sans affecter sa composition biochimique et son équipement enzymatique. Cette dernière solution présente l'avantage de fournir des résultats plus facilement extrapolables aux ensilages réalisés dans la pratique courante. Nous avons déjà montré (GOUET, FATIANOFF, BOUSSET, 1970) que l'irradiation gamma ne modifie pas sensiblement la composition d'un fourrage, ni l'activité protéolytique de ses enzymes, tout en assurant sa stérilisation; elle permet donc de séparer dans l'ensilage l'activité enzymatique bactérienne de celle du végétal.

Cette étude se propose de suivre le développement, la persistance et les effets antagonistes éventuels de quelques espèces bactériennes dominantes provenant d'ensilages « holoxéniques », inoculées isolément ou en association dans des ensilages « axéniques » de Luzerne, Fétuque et Ray-Grass.

## MATÉRIEL, ET MÉTHODES

Trois fourrages sont récoltés avec des ciseaux sur le champ à leur premier cycle végétatif; une Luzerne (variété Flamande) au stade bouton floral, puis un Ray-Grass (variété Rina) et une Fétuque des prés au début de l'épiaison. Ces fourrages sont rapidement hachés en brins de 1 à 2 cm et répartis à raison de 400 g dans des bocaux de 0,7 litre ou de 20 g dans des piluliers de 50 ml. Le contenu des bocaux permettra l'analyse des fractions glucidiques et azotées (BOUSSET *et al.*,

TABLEAU I

Ensilages « gnotoxéniques » : associations bactériennes étudiées (M<sub>1</sub> à M<sub>6</sub>)

Dénomination des mélanges	<i>Enterobacter</i> sp	<i>L. plantarum</i>	<i>L. brevis</i>	« branching » <i>Lactobacillus</i>	<i>Pediococcus</i> sp	<i>Str. faecalis</i>	<i>C. tyrobutyricum</i>	<i>C. proteolytica</i>
M <sub>1</sub>	+	+				+	+	+
M <sub>2</sub>	+		+			+	+	+
M <sub>3</sub>	+	+					+	+
M <sub>4</sub>	+		+				+	+
M <sub>5</sub>	+				+		+	+
M <sub>6</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+

TABLEAU 2

Ensilages « gnotoxéniques » : souches bactériennes utilisées et milieux employés pour leur dénombrement sélectif

Souches bactériennes	<i>Enterobacter</i> sp	<i>L. plantarum</i>	<i>L. brevis</i>	« branching » <i>Lactobacillus</i>	<i>Pediococcus</i> sp	<i>Str. faecalis</i>	<i>C. tyrobutyricum</i>	<i>C. proteolytica</i>
Milieux de dénombrement	V R B **	M R S * + 100 $\gamma$ /ml de bacitracine	M R S * + 2 $\gamma$ /ml de pénicilline	Immuno- fluorescence	M R S * pH 5	M R S * pH 9,6	Milieu au lactate ROSENBERGER (1954) 37°C	Milieu à la gélatine ROSENBERGER (1954) 37°C
et température d'incubation	30°C	30°C	30°C		42°C	37°C		

\* M R S : DE MAN, ROGOSA, SHARPE (1960).

\*\* V R B : Violet Red Bile (Difco).

1971) ainsi que celle des métabolites fermentaires. Une série de bocaux et piluliers sont conservés à température ambiante et servent de témoins « holoxéniques ». Une seconde série identique à la précédente (« holoxénique ») servira de Témoin après congélation ; elle n'est pas irradiée mais stockée à  $-20^{\circ}\text{C}$  ; elle est décongelée le même jour que les ensilages irradiés puis conservée à  $22^{\circ}\text{C}$  durant la même période. Tous les autres bocaux sont congelés à  $-20^{\circ}\text{C}$ , avant et après l'irradiation (2 Mrad). Une série sert de témoin « axénique » et le reste est inoculé avec une ou plusieurs souches bactériennes.

Après décongélation, les bocaux et piluliers « axéniques » sont inoculés dans la masse à raison de 20 ml pour les premiers et 1 ml pour les seconds d'une suspension bactérienne dans de l'eau physiologique. L'inoculum est dilué pour apporter  $10^4$  à  $10^8$  bactéries ou  $10^3$  spores de chaque espèce par gramme de fourrage. Les ensilages « holoxéniques » et « axéniques » reçoivent la même quantité d'eau physiologique stérile.

Les souches bactériennes utilisées (tabl. 1) ont été isolées à partir d'ensilages « holoxéniques » de diverses espèces fourragères et identifiées selon les critères de SHARPE (1962) pour *Lactobacillus plantarum* et *Lactobacillus brevis*, LANGSTON et BOUMA (1960 a et b) pour « branching » *Lactobacillus*, *Streptococcus faecalis*, *Pediococcus* sp, GOUET (1966) pour *Enterobacter* sp., BEERENS, CASTEL et PUT (1962) pour les *Clostridium butyricum* et *tyrobutyricum*.

Tous les ensilages sont placés dans une étuve à  $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  et les cinétiques de dénombrements sont effectuées aux : 2, 5, 8, 15, 30, 50, 90, 150<sup>e</sup> jour de conservation. Dans les bocaux les bactéries sont dénombrées seulement en fin de conservation (100<sup>e</sup> jour).

Les six associations bactériennes expérimentées sont présentées dans le tableau 1 et les méthodes et milieux qui ont servi aux dénombrements dans le tableau 2. Ceux-ci sont réalisés à partir de dilutions décimales d'une macération (obtenue par agitation pendant 10 minutes) de 20 g dans 180 ml d'eau physiologique pour les bocaux de 0,7 litre ou de la totalité du contenu pour chaque pilulier.

Dans les ensilages « polygnotoxéniques » *L. plantarum*, *L. brevis*, *Pediococcus* sp. et *Str. faecalis* sont dénombrés sur le milieu gélosé de DE MAN, ROGOSA et SHARPE, 1960 (MRS). La différenciation est obtenue de la manière suivante : *L. plantarum* résiste à 100  $\gamma$ /ml de bacitracine et *L. brevis* est insensible à 2  $\gamma$ /ml de pénicilline (dénombrement après 48 heures à  $30^{\circ}\text{C}$  en anaérobiose dans des tubes de  $8 \times 400$ ).

En boîte de Petri *Pediococcus* sp. pousse sélectivement à pH 5 et à  $42^{\circ}\text{C}$  et *Str. faecalis* à pH 9,6 à  $37^{\circ}\text{C}$ .

« Branching » *Lactobacillus* est dénombré en boîtes de Petri sur milieu MRS à  $30^{\circ}\text{C}$  lorsqu'il est en ensilage « monoxénique ». Ne disposant pas de milieu sélectif pour le dénombrer lorsqu'il est mélangé aux bactéries lactiques précédentes, nous avons procédé à un comptage au microscope selon la technique de Breed sur des macérations d'ensilage après marquage par la technique d'immunofluorescence indirecte. Pour cela, un sérum anti « branching » *Lactobacillus* est obtenu sur lapin par injections sous-cutanées, en 4 points, de 4 ml d'une émulsion à partie égale d'une suspension de  $5 \times 10^8$  bactéries et de l'adjuvant complet de Freund (3 injections à une semaine d'intervalle) ; le sérum est recueilli au bout de trois semaines. Le marquage est obtenu avec un sérum de mouton anti lapin couplé à l'isothiocyanate de fluorescéine. Les spores de *C. butyricum*, *C. tyrobutyricum* et du *Clostridium* protéolytique sont dénombrées en milieux liquides selon la méthode de MAC CRADY (1918) : milieu au lactate de ROSENBERGER (1951) pour les deux premiers et milieu à la gélatine (ROSENBERGER 1951) pour le dernier. Après inoculation les spores sont sélectionnées et activées par un chauffage de dix minutes à  $75^{\circ}\text{C}$  et l'anaérobiose maintenue par un bouchon de paraffine de 2 cm.

Dans les ensilages « holoxéniques » le dénombrement est limité aux principaux groupes physiologiques : Gram négatif (Violet Red Bile Difco), Gram positif (microflore lactique) (MRS + 0,05 p. 100 d'acétate de thallium). Pour les bactéries anaérobies sporulées, les spores seules sont dénombrées, selon la technique précédemment décrite.

## RÉSULTATS

### A. — Ensilages « holoxéniques » (fig. 1)

Dans les piluliers, l'évolution de la microflore des ensilages « holoxéniques » congelés et non congelés est sensiblement identique (fig. 1).

La multiplication bactérienne est rapide et atteint dès le 2<sup>e</sup> jour  $10^7$  à  $10^8$  bactéries Gram négatives par gramme d'ensilage et sensiblement autant de bactéries

Gram positives. La croissance est un peu moins rapide sur Luzerne où le maximum est atteint seulement entre le 2<sup>e</sup> et le 4<sup>e</sup> jour. Jusqu'à ce moment la microflore Gram négative domine légèrement la microflore Gram positive.

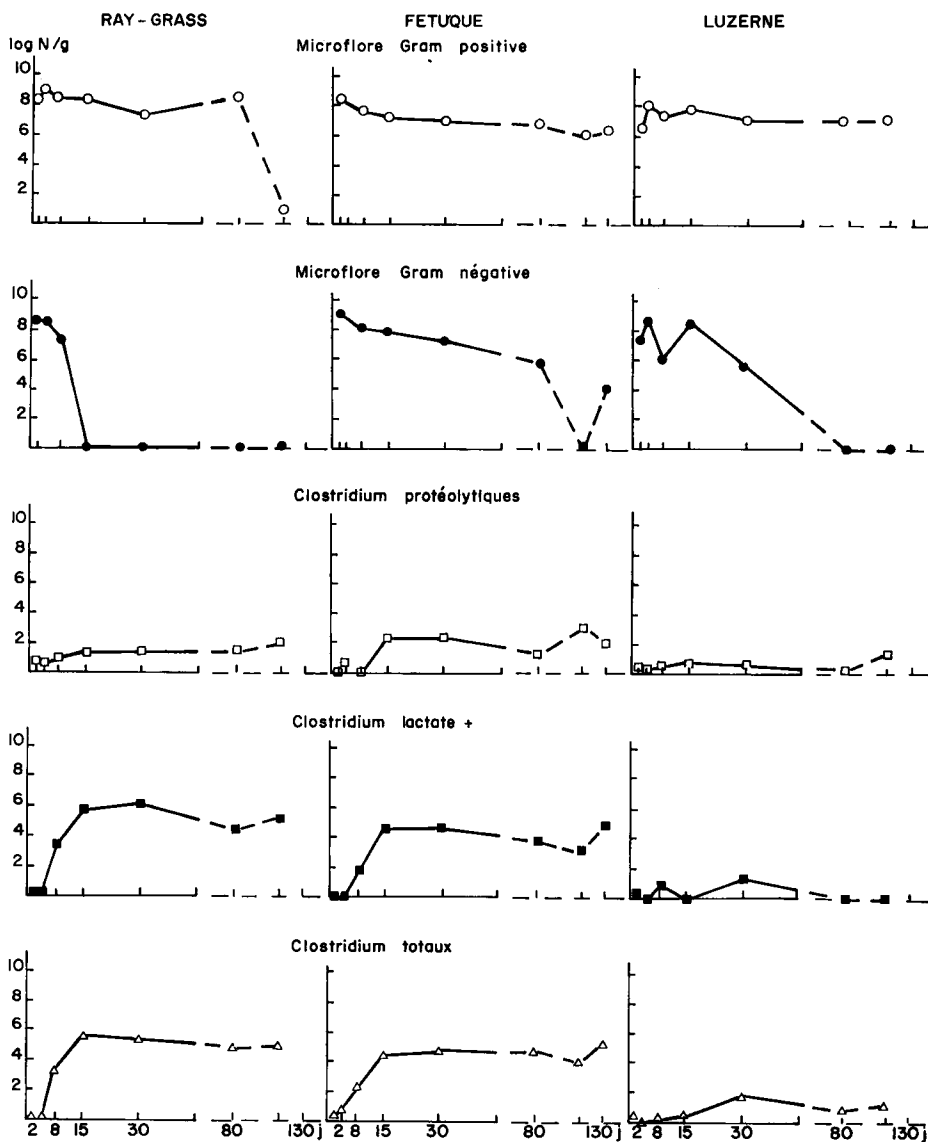


FIG. 1. — Évolution du nombre de bactéries appartenant à divers groupes de la microflore dans les ensilages « holoxéniques » (piluliers)

Les bactéries Gram négatives disparaissent entre le 8<sup>e</sup> et le 15<sup>e</sup> jour dans le Ray-Grass, alors que l'on en compte encore  $4 \times 10^8$  au 30<sup>e</sup> jour dans la Luzerne et  $5,5 \times 10^8$  dans la Fétuque au 60<sup>e</sup> jour. Par contre, les bactéries Gram positives demeurent présentes ( $10^6$  à  $10^7/g$ ) après cinq mois de fermentation dans la Fétuque

et la Luzerne alors qu'elles disparaissent presque entre le 80<sup>e</sup> et le 130<sup>e</sup> jour dans le Ray-Grass.

La microflore anaérobie sporulée se multiplie moins vite que la microflore non sporulée Gram positive ou négative. C'est seulement entre le 5<sup>e</sup> et le 8<sup>e</sup> jour que l'on observe une augmentation du nombre de spores dans la Fétuque et le Ray-Grass. Les *Clostridium*, qui fermentent le lactate, dominant et atteignent 10<sup>4</sup> à 10<sup>8</sup> spores/g dans le Ray-Grass, le maximum étant obtenu vers le 15<sup>e</sup> jour. Le nombre de spores diminue ensuite très légèrement jusqu'au 150<sup>e</sup> jour.

Les *Clostridium* protéolytiques évoluent de façon sensiblement identique aux précédents mais leur nombre est plus faible (10<sup>2</sup> à 10<sup>3</sup>/g dans la Fétuque et 10<sup>4</sup> à 10<sup>3</sup>/g dans le Ray-Grass). Dans la Luzerne, aucune espèce de ces *Clostridium* ne s'est multipliée.

Les résultats des dénombrements effectués sur les 3 fourrages en bocal après 100 jours de conservation (tabl. 3) sont comparables à ceux obtenus dans les piluliers de 20 g (fig. 1) pour les microflores Gram positive et négative et les *Clostridium* dans le Ray-Grass et la Fétuque. Par contre, dans la Luzerne le nombre de spores a augmenté dans les bocaux (1,7 × 10<sup>4</sup>/g et 5 × 10<sup>5</sup>/g pour les *Clostridium* totaux, respectivement dans les témoins non congelés et congelés) mais pas dans les piluliers.

#### B. — Ensilages « mono- et polygnotoxéniques » (fig. 2 et 3)

Dans les ensilages « monoxéniques » (fig. 2), *Enterobacter* sp. atteint un maximum de 10<sup>9</sup>/g environ au 2<sup>e</sup> jour dans le Ray-Grass et la Fétuque et seulement après le 2<sup>e</sup> jour pour la Luzerne. Il disparaît vers le 100<sup>e</sup> jour dans les deux premiers alors qu'il se maintient dans la Luzerne après 150 jours (10<sup>5</sup>/g). Dans les ensilages « polygnotoxéniques », en association avec des bactéries lactiques, la même phase de croissance rapide est observée pendant les 2 à 3 premiers jours puis une inhibition prononcée se manifeste après 4 à 8 jours, délai à partir duquel on ne retrouve plus d'*Enterobacter* sp. dans les trois fourrages (fig. 3). Le nombre maximum atteint (10<sup>7</sup> à 5 × 10<sup>8</sup>/g) est plus faible en ensilage « polygnotoxénique » qu'en ensilage « monoxénique » dans tous les cas mais plus particulièrement lorsque *Enterobacter* sp. est associé à *L. brevis* (M<sub>2</sub> et M<sub>4</sub>). Cet effet inhibiteur de *L. brevis* apparaît surtout avec le Ray-Grass et la Luzerne (10<sup>7</sup>/g au maximum) alors que dans la Fétuque *Enterobacter* sp. atteint 10<sup>3</sup>/g.

*L. plantarum* (homofermentaire) s'implante rapidement, seul ou en association, atteignant et dépassant 10<sup>9</sup>/g vers le 4<sup>e</sup> jour, dans les trois types d'ensilages « gnotoxéniques ». On ne le retrouve plus entre le 45<sup>e</sup> et le 90<sup>e</sup> jour dans le Ray-Grass mais il reste à un niveau élevé dans la Fétuque et la Luzerne (10<sup>4</sup> à 10<sup>5</sup>/g au 150<sup>e</sup> jour dans M<sub>1</sub> et M<sub>3</sub>) ; il disparaît toutefois au 125<sup>e</sup> jour dans l'essai M<sub>6</sub> de Fétuque.

*L. brevis* (hétérofermentaire) se développe à la même vitesse que *L. plantarum* dans les ensilages « gnotoxéniques », mais dans la phase de déclin sa persistance est remarquable jusqu'au 150<sup>e</sup> jour (10<sup>5</sup> à 10<sup>7</sup>/g) : elle est la plus forte dans la Luzerne et la plus faible dans le Ray-Grass. Toutefois, dans le mélange M<sub>6</sub>, *L. brevis* disparaît dans le Ray-Grass entre le 50<sup>e</sup> et le 80<sup>e</sup> jour et dans la Fétuque entre le 80<sup>e</sup> et le 125<sup>e</sup> jour ; il persiste dans la Luzerne à raison de 10<sup>5</sup>/g au 125<sup>e</sup> jour, ce qui confirme le classement des fourrages précédents : Luzerne, Fétuque, Ray-Grass.

*Pediococcus* sp. évolue de la même façon que *L. plantarum* ou *L. brevis* en ensi-

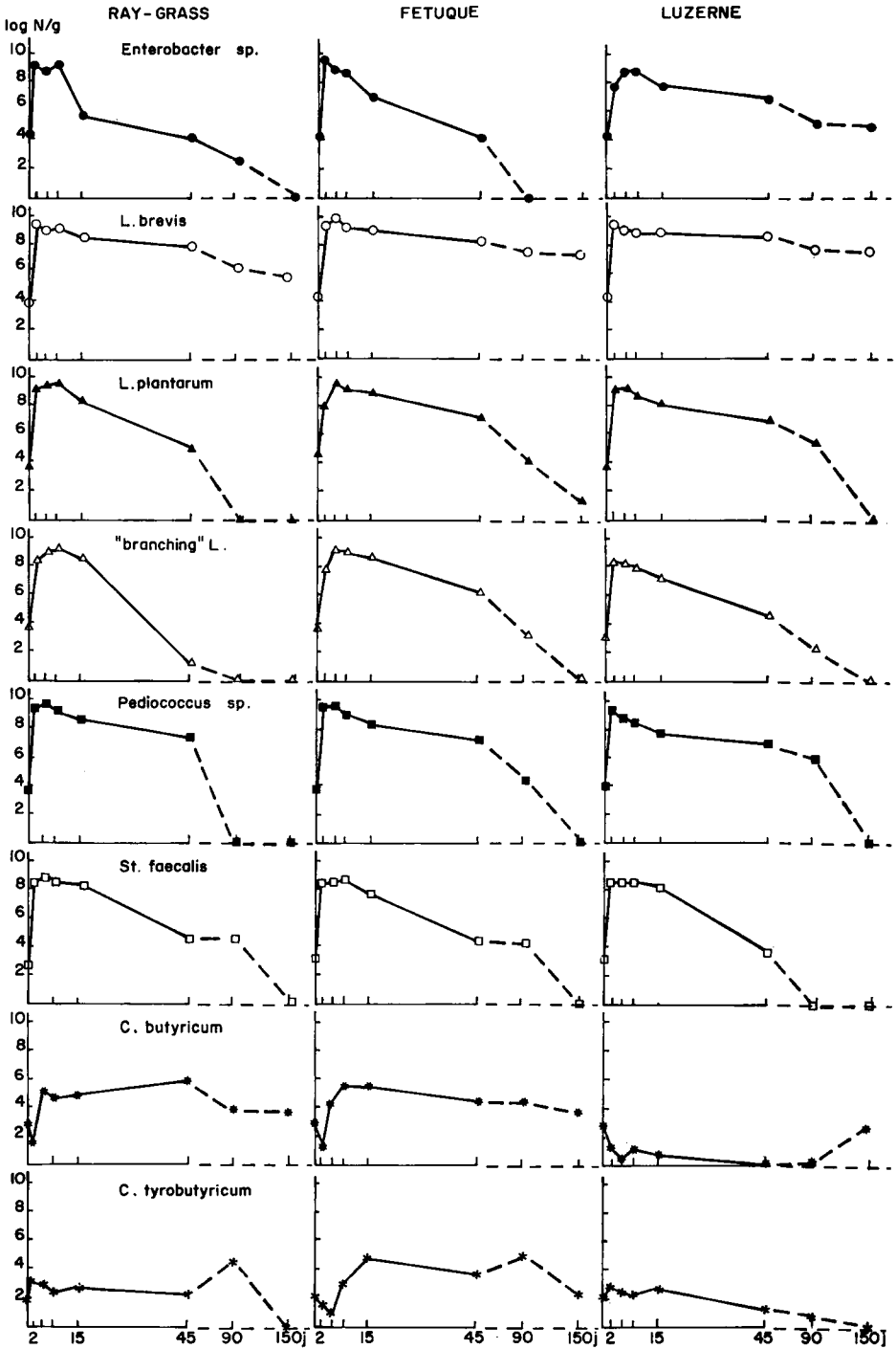
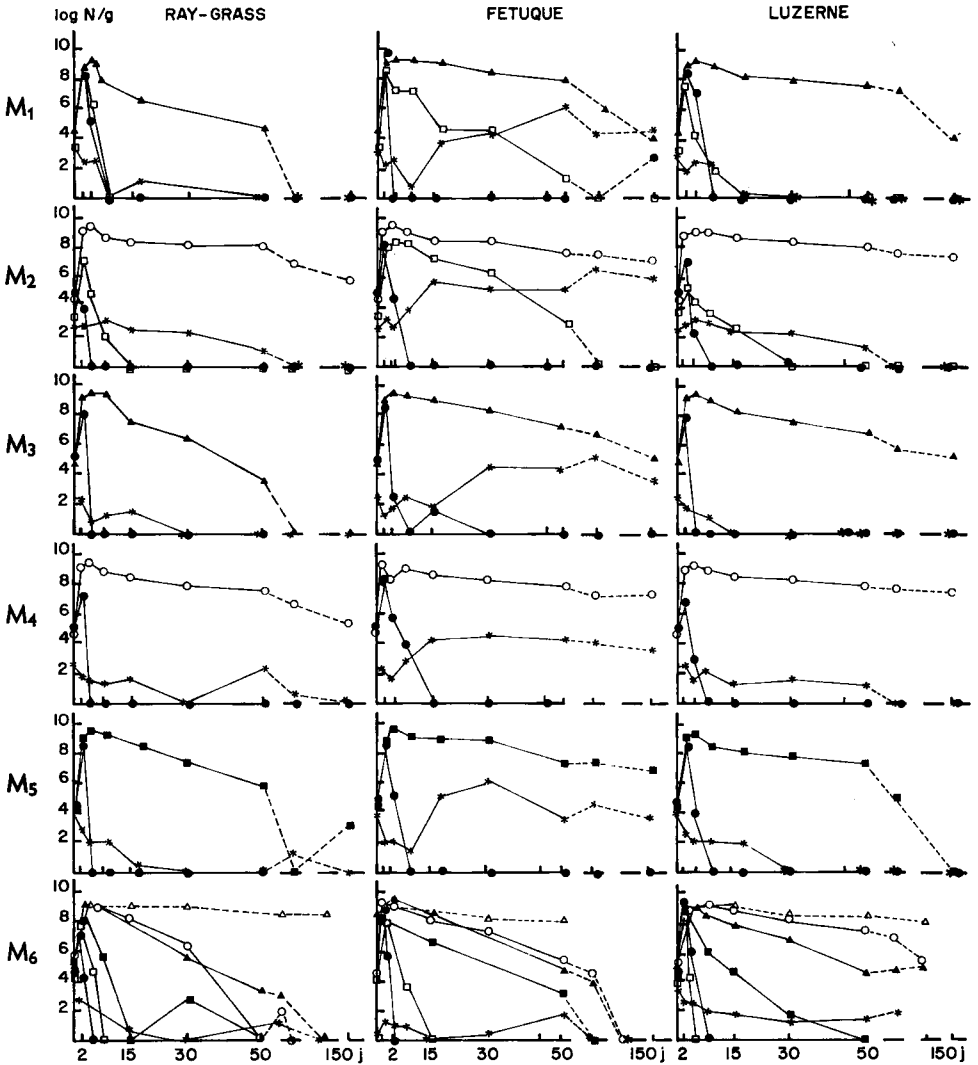


FIG. 2. — Évolution du nombre de bactéries appartenant à diverses espèces dans les ensilages « monoxéniques » (piluliers)



	Enterobacter sp.	L. plantarum	L. brevis	"branching" L.	Str. faecalis	Pediococcus sp.	C. tyrobutylicum
M 1	●—●	▲—▲			□—□		*—*
M 2	●—●		○—○		□—□		*—*
M 3	●—●	▲—▲					*—*
M 4	●—●		○—○				*—*
M 5	●—●					■—■	*—*
M 6	●—●	▲—▲	○—○	△—△	□—□	■—■	*—*

FIG. 3. — Évolution du nombre de bactéries appartenant à diverses espèces dans les ensilages « polygnotoxéniques » (piluliers)



lages « monoxéniques » ; dans les ensilages « polygnotoxéniques » (mélange M<sub>6</sub>), il persiste nettement mieux dans la Fétuque que dans les deux autres fourrages. Dans le mélange M<sub>6</sub>, où la compétition est plus importante, il diminue beaucoup plus rapidement que *L. plantarum* et *L. brevis*, le nombre maximum ne dépassant pas 10<sup>8</sup>/g. Le Ray-Grass est, là encore, l'ensilage où la disparition est la plus rapide.

*Str. faecalis* (homofermentaire) a une croissance moins importante que les souches précédentes. En ensilages « monoxéniques » il n'atteint jamais 10<sup>8</sup>/g et contrairement aux autres *Lactobacillaceae* homofermentaires qui disparaissent plus rapidement dans le Ray-Grass, c'est ici la Luzerne qui constitue le milieu le moins favorable, puisque *Str. faecalis* n'y est plus retrouvé au 90<sup>e</sup> jour alors qu'il est encore présent entre le 90<sup>e</sup> et le 150<sup>e</sup> jour dans le Ray-Grass et la Fétuque. Associé à *L. brevis* ou *L. plantarum* dans les mélanges M<sub>1</sub> et M<sub>2</sub> il reste très nettement sous-dominant, en particulier dans la Luzerne (6 × 10<sup>7</sup>/g et 2 × 10<sup>6</sup>/g respectivement au maximum). Dans ces mélanges il disparaît entre 50 et 90 jours dans la Fétuque et entre 8 et 30 jours dans le Ray-Grass et la Luzerne. Dans le mélange M<sub>6</sub> l'infériorité numérique vis-à-vis des autres bactéries lactiques est plus nette et se traduit par une disparition en moins de 15 jours dans la Fétuque et en moins d'une semaine dans le Ray-Grass de *Str. faecalis*.

« Branching » *Lactobacillus* présente une cinétique d'implantation identique aux autres espèces de *Lactobacillus*. La Luzerne ne semble toutefois pas constituer pour cette souche un substrat particulièrement favorable puisque le nombre maximum n'atteint que 3 × 10<sup>8</sup>/g. Comme les autres bactéries lactiques homofermentaires, cette espèce disparaît du Ray-Grass entre le 45<sup>e</sup> et le 90<sup>e</sup> jour et entre le 90<sup>e</sup> et le 150<sup>e</sup> jour dans la Fétuque et la Luzerne. Dans le mélange M<sub>6</sub>, où le dénombrement par immunofluorescence inclut les bactéries mortes, on constate que la phase d'apparition de ce *Lactobacillus* est identique à celle des autres bactéries et que le nombre maximum atteint est voisin de 10<sup>9</sup>/g sur Ray-Grass et Fétuque et un peu inférieur sur Luzerne.

Pour les *Clostridium*, anaérobies stricts, les techniques employées ne permettent pas de dénombrer les cellules végétatives, mais seulement les spores. Toutefois les variations des nombres de spores peuvent être interprétées, leur diminution étant la conséquence de leur germination et leur augmentation celle de la multiplication végétative.

*C. butyricum* s'est développé, en pilulier, dans les ensilages « monoxéniques » de Ray-Grass et Fétuque mais pas dans celui de Luzerne. La diminution du nombre de spores dès le 2<sup>e</sup> jour d'incubation (fig. 2) nous montre que la germination a déjà commencé (perte de la thermorésistance) ; la multiplication végétative suivie de la sporulation est déjà très prononcée au 5<sup>e</sup> jour. Le nombre de spores persiste ensuite à des niveaux compris entre 10<sup>4</sup> et 10<sup>6</sup>/g. Il faut noter que cette espèce, qui semble avoir germé mais n'a pas sporulé dans l'ensilage de Luzerne en piluliers a, par contre, sporulé dans le bocal, où l'on trouve 5 × 10<sup>5</sup> spores/g au 100<sup>e</sup> jour (tabl. 3). Le dénombrement en pilulier du 150<sup>e</sup> jour sur Luzerne traduit cependant une légère sporulation de *C. butyricum*.

*C. tyrobutyricum* s'est développé dans les ensilages « monoxéniques » de Fétuque où la phase de germination des spores se situe entre le 2<sup>e</sup> et le 5<sup>e</sup> jour. Dans le Ray-Grass il ne semble pas y avoir eu de croissance végétative avec sporulation ; on observe seulement la survie des spores et peut-être une légère croissance au 90<sup>e</sup> jour. Dans la

TABLEAU 3

*Dénombrements bactériens dans les ensilages « holoxéniques »  
et « gnotoxéniques » en bocaux au 100<sup>e</sup> jour (N/gramme)*

Fourrages		Ray Grass (N/g)	Fétuque (N/g)	Luzerne (N/g)			
Ensilages « holoxéniques »							
Microflore Gram négative	c (*)	0	(—)	0			
	nc (**)	0	0	10 <sup>2</sup>			
Microflore Gram positive	c (*)	2 · 10 <sup>5</sup>	(—)	1,6 · 10 <sup>6</sup>			
	nc (**)	6,6 · 10 <sup>4</sup>	6 · 10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>			
<i>Clostridium</i> lactate +	c (*)	8 · 10 <sup>4</sup>	(—)	2,5 · 10 <sup>3</sup>			
	nc (**)	1,4 · 10 <sup>5</sup>	8 · 10 <sup>3</sup>	6 · 10 <sup>5</sup>			
<i>Clostridium</i> protéolytique	c (*)	2 · 10 <sup>1</sup>	(—)	5 · 10 <sup>3</sup>			
	nc (**)	1,3 · 10 <sup>3</sup>	1,6 · 10 <sup>4</sup>	2,5 · 10 <sup>2</sup>			
<i>Clostridium</i> totaux	c (*)	1,4 · 10 <sup>5</sup>	(—)	5 · 10 <sup>5</sup>			
	nc (**)	6 · 10 <sup>5</sup>	3,5 · 10 <sup>4</sup>	1,7 · 10 <sup>4</sup>			
Ensilages « gnotoxéniques »		(M <sub>1</sub> ) ***	(M <sub>g</sub> ) ***	(M <sub>1</sub> ) ***	(M <sub>g</sub> ) ***	(M <sub>1</sub> ) ***	(M <sub>g</sub> ) ***
<i>Enterobacter</i> sp .....		0	(—)	0	0	0	0
<i>L. plantarum</i> .....		30	(—)	3 · 10 <sup>4</sup>	6,6 · 10 <sup>5</sup>	4 · 10 <sup>6</sup>	3,3 · 10 <sup>6</sup>
<i>L. brevis</i> .....		2 · 10 <sup>6</sup>	(—)	1,5 · 10 <sup>8</sup>	4,6 · 10 <sup>5</sup>	2 · 10 <sup>7</sup>	8 · 10 <sup>6</sup>
« branching » <i>Lactobacillus</i> ....		3 · 10 <sup>3</sup>	(—)	10 <sup>4</sup>	(—)	0	(—)
<i>Pediococcus</i> sp .....		2 · 10 <sup>5</sup>	(—)	1,3 · 10 <sup>6</sup>	8 · 10 <sup>5</sup>	2 · 10 <sup>6</sup>	5 · 10 <sup>3</sup>
<i>Str. faecalis</i> .....		20	(—)	0	0	8 · 10 <sup>2</sup>	0
<i>C. butyricum</i> .....		7 · 10 <sup>4</sup>	(—)	5 · 10 <sup>5</sup>	(—)	5 · 10 <sup>5</sup>	(—)
<i>C. tyrobutyricum</i> .....		1,3 · 10 <sup>6</sup>	(—)	1,3 · 10 <sup>5</sup>	8 · 10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	0

(\*) = témoin « holoxénique » congelé (c).

(\*\*) = témoin « holoxénique » non congelé (nc)

(\*\*\*) = ensilages « monoxéniques » (M<sub>1</sub>)  
ensilages « polygnotoxéniques » (M<sub>g</sub>)

0 = absence de bactéries à l'analyse

(—) = analyse non effectuée.

Luzerne en pilulier, ce *Clostridium* ne s'est pas développé, alors qu'on le retrouve dans tous les bocaux ( $10^8$ - $10^9$ /g).

Dans les ensilages « gnotoxéniques », mélanges M<sub>1</sub> à M<sub>6</sub>, seule la Fétuque permet une germination des spores avec multiplication végétative. On y observe également la phase d'éclipse qui correspond à la germination des spores entre le 2<sup>e</sup> et le 8<sup>e</sup> jour puis la phase de multiplication végétative avec sporulation.

Dans le mélange M<sub>6</sub> il n'y a pas d'augmentation du nombre des spores même sur Fétuque. Toutefois, dans les bocaux on observe un accroissement au 100<sup>e</sup> jour ( $8 \times 10^4$ /g) sur Fétuque (tabl. 2) mais pas sur Luzerne où la multiplication en souche pure a pourtant été observée.

Le *C. protéolytique* n'est pas représenté sur les figures car il ne s'est développé ni en bocaux ni en piluliers.

## DISCUSSION ET CONCLUSION

Les souches bactériennes retenues pour ces expériences ne représentent certes pas la totalité de celles que l'on peut rencontrer dans les ensilages « holoxéniques » et il faudrait y ajouter *L. casei*, *L. arabinosus*, *Leuconostoc mesenteroides* et *Str. liquefaciens*. Toutefois, la persistance de ces trois dernières, en particulier, y est souvent éphémère et leur rôle peut être considéré, dans un premier temps, comme secondaire.

Les associations que nous avons réalisées constituent quelques-unes des principales combinaisons que l'on peut imaginer entre les trois espèces lactiques dominantes (*L. plantarum*, *L. brevis*, *Pediococcus* sp.) et les deux espèces dont le développement doit être inhibé (*Cl. tyrobutyricum* et *Enterobacter* sp.). En effet, ces dernières sont gazogènes et leur métabolisme entraîne les pertes les plus importantes d'éléments nutritifs (BOUSSET *et al.*, 1971) en détournant une partie des glucides fermentescibles de l'acidification lactique. Par ailleurs, la fermentation butyrique en élevant le pH, permet le développement des bactéries putréfiantes. La température de 22°C a été retenue dans ces essais car en favorisant la croissance des lactobacilles, elle procure des ensilages « holoxéniques » directs généralement de meilleure qualité ; toutefois le rôle de la température dont on sait l'importance (LANIGAN, 1965) reste à étudier dans ce cadre.

Les résultats obtenus au cours de cette première étude, où le développement de la microflore a pu être analysé par l'emploi d'ensilages « gnotoxéniques », confirment les observations faites à partir d'ensilages « holoxéniques » (STIRLING, 1953; LANGSTON *et al.*, 1958; LANGSTON et BOUMA, 1960, LANIGAN 1963, GOUET *et al.*, 1965). Ainsi, dans des ensilages « polygnotoxéniques » placés en anaérobiose permanente et à 22°C, la microflore Gram négative se développe aussi vite que la microflore lactique mais la première disparaît rapidement alors que la seconde s'établit en flore dominante. On enregistre la même évolution dans les ensilages « holoxéniques » mais la microflore Gram négative y persiste plus longtemps (principalement dans la Luzerne et la Fétuque) et les *Clostridium* fermentant le lactate se multiplient dans le Ray-Grass et la Fétuque mais pas dans la Luzerne. Ce dernier point est en contradiction avec les résultats couramment admis d'après lesquels le Ray-Grass riche en glucides fermentescibles (BOUSSET *et al.*, 1971) constitue un milieu défavorable au développe-

ment des *Clostridium* alors que la Luzerne, pour la raison contraire, le favorise. Par ailleurs il est intéressant de souligner que dans le Ray-Grass et la Luzerne les associations M<sub>1</sub> à M<sub>6</sub> inhibent *C. tyrobutyricum* alors que dans la Fétuque seule l'association M<sub>6</sub> a cet effet.

Enfin on notera que le *Clostridium* protéolytique ne s'est jamais développé, conséquence probable d'une température d'incubation trop faible ; HUHTANEN et PENSACK (1963) ont aussi remarqué que *C. sporogenes* en ensilages « monoxéniques » ne se développait pas dans la Luzerne et le Maïs entre 20° et 25°C.

Parmi les bactéries lactiques, *L. brevis* (hétérofermentaire) est bien l'espèce la plus persistante lorsque la durée de conservation augmente, en raison sans doute de sa résistance aux bas pH ; *L. plantarum* arrive sur le même plan que *L. brevis* ou seulement après, suivi de « branching » *Lactobacillus* et de *Pediococcus* sp. *Streptococcus faecalis* qui n'a qu'une croissance limitée et une existence éphémère, ce qui est en contradiction avec l'importance qui semble lui avoir été parfois accordée dans les ensilages « holoxéniques » (LANGSTON, BOUMA, 1960 a ; WHITTENBURY, McDONALD, BRYAN, JONES, 1967).

En conclusion, le recours à des ensilages « gnotoxéniques » permet de mettre clairement en évidence l'évolution des espèces bactériennes au cours de la conservation. Bien que l'extrapolation de ces résultats à des ensilages « holoxéniques » ne soit pas encore possible, on peut cependant penser que des associations bactériennes judicieusement choisies et sans doute différentes selon les fourrages pourraient permettre d'inhiber les fermentations butyriques et, partant, de diminuer les pertes de substances nutritives et améliorer l'appétibilité des ensilages directs.

Reçu pour publication en août 1971.

## SUMMARY

### KINETIC INVESTIGATION ON BACTERIAL DEVELOPMENT IN « GNOTOXENIC » ALFAFA, FETUCA AND RAY GRASS SILAGES

This investigation was undertaken on alfafa, fetuca and ray grass silages in order to study the development, maintenance and occasional antagonistic effect of bacterial species, viz: *L. plantarum*, *L. brevis*, « branching » *Lactobacillus*, *Str. faecalis*, *Pediococcus* sp., *Enterobacter* sp., *C. butyricum*, *C. tyrobutyricum*, proteolytic *Clostridium*.

The three forages, minced and ensiled in 0.7 litre jars or 50 millilitres tubes, were sterilized by gamma-irradiation. The bacterial strains were inoculated either separately or in combination (M<sub>1</sub> to M<sub>6</sub>). They were counted individually after 2, 5, 8, 15, 30, 50, 90 and 150 days of storage at 22°C. With the De Man, Rogosa and Sharpe medium (MRS), selective counting was performed by the following means : temperature for *Pediococcus* sp. (42°C) ; labelling with antibiotics for *L. plantarum* (bacitracin) and *L. brevis* (penicillin) ; pH for *Str. faecalis* (9.6) ; immunofluorescence for « branching » *Lactobacillus*. Other selective culture media were used for *Enterobacter* sp. (Violet Red Bile Difco), *C. tyrobutyricum* and *C. butyricum* (lactate medium) proteolytic *Clostridium* (gelatin medium).

Parallel to this experiment, the evolutive kinetics of gram-negative and gram-positive (« lactic ») microflora (anaerobic sporulated or lactate-fermenting bacteria) were investigated from « holoxenic » silage of the same forages.

Our results show that with « polygnotoxenic » silages, gram-negative and gram-positive (« lactic ») microflora grow at the same speed, but the former soon disappears whereas the latter remains dominant. A similar developmental pattern was noticed with « holoxenic » silages, but

the gram-negative bacteria remain longer, particularly in alfafa and fetuca, and the lactate positive *Clostridium* develops in fetuca and ray grass. In « gnotoxenic » fetuca silages, the M 6 combination alone inhibits the development of *C. tyrobutyricum*.

*L. brevis* (heterofermenting) remains the longest of all *Lactobacillaceae* when the duration of storage increases. *L. plantarum* comes next, then branching *Lactobacillus* and *Pediococcus* sp. *Str. faecalis* shows the most limited growth and shortest life span.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BEERENS H., CASTEL M. M., PUT H. M. C., 1962. Caractères d'identification de quelques *Clostridium* du groupe *butyricum*. *Ann. Inst. Pasteur*, **103**, 117-121.
- BOUSSET J., BOUSSET-FATIANOFF Nathalie, GOUET Ph., CONTREPOIS M., 1971. Ensilages « gnotoxéniques » de fourrages. II. Catabolisme des glucides et métabolisme fermentaire dans des ensilages « gnotoxéniques » de Luzerne, Fétuque et Ray-Grass. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.* (sous presse).
- BOUSSET-FATIANOFF Nathalie, GOUET Ph, BOUSSET J, CONTREPOIS M 1971. Ensilages « gnotoxéniques » de fourrages. III. Métabolisme de l'azote dans des ensilages « gnotoxéniques » de Luzerne. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys* (sous presse)
- DE MAN J. C., ROGOSA M., SHARPE E., 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. appl. Bact.*, **23**, 130-135.
- GIBSON T., STIRLING A. C., KEDDIE R. M., ROSENBERGER R. F., 1958. Bacteriological changes in silage made at controlled temperatures. *J. Gen. Microbiol.*, **19**, 112-120.
- GOUET Ph., FATIANOFF Nathalie, 1964. Les bactéries de l'ensilage. I. Tentative de différenciation entre les actions enzymatiques des cellules végétales et des cellules bactériennes dans la glycolyse et la protéolyse d'un ensilage de luzerne. *Ann. Inst. Pasteur*, **107**, 711-723.
- GOUET Ph., FATIANOFF Nathalie, ZELTER S. Z., DURAND Michelle, CHEVALIER R., 1965. Influence du taux de matière sèche sur l'évolution biochimique et bactériologique d'une luzerne conservée par ensilage. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, **5**, 79-100.
- GOUET Ph., CHEVALIER R., 1966. The evolution of Gram negative microflora in direct harvested and wilted alfalfa silages. *Proc. Xth Internat. Grassal. Cong.*, 533-536.
- GOUET Ph., FATIANOFF Nathalie, BOUSSET J., 1970. Métabolisme de l'azote et des glucides dans une luzerne ensilée et stérilisée par irradiation gamma. *C. R. Acad. Sci.*, **270**, 1024-1027.
- HUHTANEN C. N., PENSACK J. M., 1963. Gnotobiotic silage. *Appl. Microbiol.*, **11**, 529-532.
- LANGSTON C. W., BOUMA C., 1960 a. Types and sequence change of bacteria in orchard grass and alfalfa silages. *J. Dairy. Sci.*, **43**, 1575-1584.
- LANGSTON C. W., BOUMA C., 1960 b. A study of the microorganisms form grass silages. I. The cocci. II. The Lactobacilli. *Appl. Microbiol.*, **8**, 212-234.
- LANGSTON C. W., IRVIN H., GORDON C. N., BOUMA C., WISEMAN Z. G., MELIN C. G., MOORE L. A., MAC CALMONT J. R., 1958. Microbiology and chemistry of grass silage U. S. D. A. *Technical Bull.*, n° 1187.
- LANIGAN G. W., 1963. Silage bacteriology. I. Water activity and temperature relationships of silage strains of *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis* and *Pediococcus cerevisiae*. *Austr. J. Biol. Sci.*, **16**, 606-615.
- LANIGAN G. W., 1965. Silage bacteriology. II. Influence of temperature differences on the composition of the lactic microflora. *Austr. J. Biol. Sci.*, **18**, 555-561.
- LUCKEY Th. D., 1963. *Germ free life and gnotobiology*. Acad. Press New York and London.
- MABBITT L. A., 1951. The role of plant cells in the ensilage process : an approach to the problem. *Proc. Soc. Appl. Bact.*, **14**, 147-150.
- MAC CRADY M. H., 1918. Tables for rapid interpretations of fermentation tube results. *Canad. publ. Health J.*, **9**, 201-210.
- MCDONALD P., STIRLING A. C., HENDERSON A. R., WHITTENBURY R., 1964. Fermentation studies on inoculated herbage. *J. Sci. Fd. Agric.*, **7**, 429-436.
- RAIBAUD P., DICKINSON A. B., SAQUET E., CHARLIER M., MOCQUOT G., 1966. La microflore du tube digestif du rat. IV. Implantation contrôlée chez le Rat gnotobiotique de différents genres microbiens isolés du rat conventionnel. *Ann. Inst. Pasteur*, **111**, 193-210.
- ROSENBERGER R. F., 1951. The development of methods for the study of obligate anaerobes in silage. *Proc. Soc. Appl. Bact.*, **14**, 161-164.
- SHARPE E., 1962. Taxonomy of the lactobacilli. *Dairy. Sci. Abst.*, **24**, 109-118.