



**HAL**  
open science

## ETUDES SUR LA MYCOFLORE DES ENSILAGES. II. - CROISSANCE D'ESPÈCES FONGIQUES EN ANAÉROBIOSE

L. Escoula, J. Le Bars

► **To cite this version:**

L. Escoula, J. Le Bars. ETUDES SUR LA MYCOFLORE DES ENSILAGES. II. - CROISSANCE D'ESPÈCES FONGIQUES EN ANAÉROBIOSE. Annales de Recherches Vétérinaires, 1973, 4 (2), pp.253-264. <hal-00900762>

**HAL Id: hal-00900762**

**<https://hal.science/hal-00900762v1>**

Submitted on 11 May 2020

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

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



HAL Authorization

## ETUDES SUR LA MYCOFLORE DES ENSILAGES

### II. — CROISSANCE D'ESPÈCES FONGIQUES EN ANAÉROBIOSE

L. ESCOULA et J. LE BARS

Station de Pharmacologie-Toxicologie, I. N. R. A.,  
180, Chemin de Tournefeuille,  
31300 Toulouse

---

#### RÉSUMÉ

Sur quarante-neuf espèces fongiques isolées des fronts de coupe d'ensilages, vingt-six subissent un effet biostatique, une un effet fongicide et vingt-deux sont capables de croître en anaérobiose (+ 10 p. 100 CO<sub>2</sub>) à 30°C ; parmi ces dernières, neuf appartiennent à la famille des Mucoracées, trois sont des Ascomycètes et dix des Adélomycètes.

En absence d'oxygène, les espèces des genres *Mucor* et *Absidia* se présentent essentiellement sous la forme de cellules sphériques bourgeonnantes ; les autres moisissures conservent une structure filamenteuse le plus souvent stérile. Leur croissance n'est jamais supérieure au quart de celle obtenue en aérobiose et semble davantage dépendre de la température que de la teneur en CO<sub>2</sub>.

Il ressort de ces observations qu'un certain nombre de moisissures sont susceptibles de se développer au sein d'un bon ensilage.

---

Une étude systématique de la mycoflore des fronts de coupe d'ensilages de graminées fourragères nous a permis d'isoler 52 espèces réparties en 22 genres (ESCOULA *et al.*, 1972).

Nous en avons conclu que cette contamination pourrait provenir de spores présentes lors de la confection de l'ensilage et susceptibles de se développer soit pendant la conservation, soit seulement à l'ouverture du silo.

Or, pour la plupart des auteurs (BURMEISTER *et al.*, 1965 ; LYNCH *et al.*, 1970 ; GOUET (1) 1970 ; FARAG, ABDOU EL FADI, 1968) l'anaérobiose, qui se réalise habituellement en 5 heures dans les ensilages (LANGSTON, 1958) et s'accompagne d'une teneur en gaz carbonique atteignant assez rapidement 10 à 20 p. 100 du volume gazeux

(1) Communication personnelle.

total (DEXTER, 1966), empêcherait la croissance des champignons au centre du silo. Dans ces conditions, on comprend mal comment des spores préexistant dans la masse pourraient donner naissance, à l'ouverture du silo, à un développement fongique aussi abondant que celui généralement observé sur des fronts de coupe de 24 heures.

Nous nous sommes donc proposés dans un premier temps de considérer le devenir, en absence d'oxygène et *in vitro*, des espèces fongiques habituellement isolées d'ensilages, en précisant l'influence de la teneur en gaz carbonique et de la température sur la croissance de ces champignons.

## MATÉRIEL, ET MÉTHODE

Les souches testées proviennent d'ensilages de Maïs, de Sorgho ou de Graminées prairiales. Les champignons sont ensemencés sur le milieu naturel suivant :

- 1 000 ml d'une décoction aqueuse de Maïs (15 g de grains entiers + 15 g de grains brisés), à laquelle sont ajoutés :
- 5 g de malt
- 4 g d'extrait de levure
- 20 g d'agar

Le pH du milieu est maintenu entre 5,5 et 6. On ensemence environ  $10^4$  germes au centre de la boîte.

Les boîtes de Pétri sont alors placées dans une jarre pour culture de germes anaérobies (1). Ce procédé permet d'obtenir en 4 heures une absence totale d'oxygène, contrôlée par décoloration du bleu de méthylène ( $rH \leq 14$ ) et une teneur en  $CO_2$  de 10 p. 100 ou 15 p. 100 selon le dispositif retenu (BREWER et ALLGEIER, 1966).

La température maximum variant selon la nature du fourrage de 21 à 41°C pour un bon ensilage (LANGSTON, 1958), nos essais sont effectués à 23°C, 30°C et 40°C. L'incubation se fait à l'obscurité pendant 15 jours.

D'après COCHRANE (1958), il existe une bonne corrélation entre la croissance radiale sur agar et le poids sec des champignons. Aussi à l'ouverture de la jarre, la croissance des champignons est-elle appréciée par la mesure du diamètre de la colonie suivie d'une observation microscopique.

Pour l'essai comparatif des croissances respectives en anaérobiose et en aérobiose, les ensemencements ont été faits à la périphérie de la boîte de Pétri et nous avons mesuré alors le rayon du thalle.

La croissance des champignons a été codifiée de la façon suivante :

de 0 à 2 mm de diamètre :	o	(croissance non décelable)
de 3 à 15 mm	—	+
de 16 à 30 mm	—	++
de 31 à 45 mm	—	+++
de 46 à 60 mm	—	++++

L'aspect morphologique est représenté par les symboles suivants :

- L : cellules sphériques, bourgeonnant dans certains cas (forme levure) ;
- F : forme filamenteuse (avec éventuellement formation de blastospores et arthrospores) ;
- FL : aspect mixte avec prédominance de la forme filamenteuse ;
- LF : aspect mixte avec prédominance de la forme levure.

Au bout de 24 et 48 heures à l'air ambiant et à 25°C, les cultures sont de nouveau observées et leur croissance notée, afin d'établir si l'anaérobiose a eu un effet fongistatique ou fongicide.

(1) B.-D. MÉRIEUX, 69, Marcy-l'Étoile.

## RÉSULTATS

I. — *Croissance en anaérobiose*I. 1. *Croissance et aspect morphologique* (tabl. 1).

Sur 49 espèces testées, 22 se sont avérées capables de croître en anaérobiose en présence de 10 p. 100 de CO<sub>2</sub> à 30°C.

Toutes les espèces appartenant à la famille des Mucoracées ainsi qu'au genre *Fusarium* se sont développées, alors que nous n'avons pas décelé de croissance chez les espèces appartenant au genre *Penicillium*.

Si l'on effectue un classement des champignons en fonction du diamètre de leur thalle, on trouve :

- ++++ : *Mucor mucedo* ; *Rhizopus arrhizus*.
- +++ : *M. hiemalis*, *M. racemosus* ; *Fus. oxysporum*.
- ++ : *Byssoschlamys nivea*, *Absidia corymbifera* ; *Rhizopus nigricans* ; *Cephalosporium acremonium* ; *Geotrichum candidum* ; *Fusarium poae*.
- + : *Absidia butleri* ; *Absidia ramosa* ; *Mucor circinelloides*...

Un examen microscopique permet d'observer de nombreuses modifications morphologiques par rapport à une croissance normale. On constate en particulier, d'une part, une diminution du nombre de chlamydospores pour certains champignons et l'absence de formes de multiplication végétative, d'autre part l'apparition de cellules sphériques bourgeonnant à la manière de levures.

Les structures filamenteuses ont, pour la plupart, des contours très irréguliers avec fragmentation des hyphes conduisant à la formation d'arthrospores ou de blastospores. Nous voyons que les espèces des genres *Mucor* et *Absidia* se présentent surtout sous une forme levure alors que les cultures d'Ascomycètes et d'Adélomycètes apparaissent sous une forme filamenteuse le plus souvent stérile et hyaline.

I. 2. *Étude comparative de la croissance en aérobie et en anaérobiose.*

Dans le tableau 2, nous avons présenté la croissance de 6 moisissures, d'une part dans les conditions de l'expérience (0 p. 100 O<sub>2</sub> + 10 p. 100 CO<sub>2</sub> à 30°C) et, d'autre part en aérobie à 30°C (témoins).

Du fait de l'envahissement très rapide des boîtes de Pétri en aérobie et de la présence de cellules sphériques en anaérobiose, les Mucoracées se prêtaient difficilement à cette étude comparative ; aussi avons-nous retenu six espèces à croissance moyenne en aérobie et conservant une structure filamenteuse en anaérobiose.

La première constatation que l'on peut faire à la lecture de ce tableau est la forte diminution de croissance des champignons en absence d'oxygène. Pour une espèce donnée, le rayon de la colonie n'est jamais supérieur au quart de celui observé sur la culture témoin ; en outre, la densité du thalle y est moins importante et les formes filamenteuses sont pour la plupart stériles avec, pour les *Fusarium*, une diminution du nombre de chlamydospores.

TABLEAU I. — Croissance relative des champignons en présence de 10 p. 100 de CO<sub>2</sub> au départ et en absence d'oxygène (rH ≤ 14) pendant toute la durée de la culture

A. — Champignons présentant une croissance en anaérobiose	Aspect morphologique (1)	Importance de la croissance	B. — Champignons ne présentant pas de croissance en anaérobiose
I. — <i>Phycomycètes</i>			
Mucorales			
1. <i>Absidia corymbifera</i> (COHN) SACC. et TROTTER <i>Absidia ramosa</i> (LINDT) LENDNER <i>Absidia butleri</i> LENDNER 2. <i>Mucor circinelloides</i> VAN TIEGHEM <i>Mucor hiemalis</i> WEHMER <i>Mucor mucedo</i> (L.) FRES. <i>Mucor racemosus</i> FRES. <i>Rhizopus arrhizus</i> FISHER. <i>Rhizopus nigricans</i> EHRENBERG	LF L FL L FL L FL FL F	++ + + + ++ ++ ++ ++ ++	
II. — <i>Ascomycètes</i>			
<i>Byssoclammys nivea</i> WESTLING <i>Neurospora Crassa</i> SHEAR. <i>Gymnoascus</i> sp.	F FL F	++ ++ +	<i>Gymnoascus</i> sp.
III. — <i>Adélomycètes</i>			
1. <i>Aspergillus clavatus</i> DESM. 2. <i>Penicillium</i> sp. 3. <i>Fusarium moniliforme</i> SHELD <i>Fusarium oxysporum</i> <i>Fusarium poae</i> <i>Fusarium solani</i> 4. <i>Trichoderma longibrachiatum</i> RIFAI	FL F F F FL FL	+ ++ ++ ++ ++ ++	<i>A. flavus</i> LINK ; <i>A. fumigatus</i> FRES. ; <i>A. niger</i> VAN TIEGHEM <i>A. versicolor</i> (VUILLEMIN) TIRABOSCHI ; <i>P. canescens</i> SOPP. ; <i>P. citrinum</i> THOM. ; <i>P. cyclospium</i> WEST ; <i>P. granulatum</i> BAINIER ; <i>P. rubrum</i> STOLL. ; <i>P. chrysoyenum</i> THOM ; <i>P. roquefortii</i> THOM ; <i>P. brevicompactum</i> DIERCKX ; <i>P. purpurogenum</i> STOLL ; <i>P. solitum</i> WESTLING. <i>T. viride</i> PER. ex. FR. ; <i>T. polysporum</i> (LINK ex PERS.) RIFAI ; <i>T. harzianum</i> RIFAI ; <i>T. koningii</i> OUDEMANS.
5. Autres formes imparfaites : <i>Cephalosporium acremonium</i> CORDA <i>Geotrichum candidum</i> LINK ex. PERS. <i>Graphium</i> sp. <i>Paecilomyces variotii</i> BAIN	FL L F F	++ ++ ++ ++	<i>Cladosporium herbarum</i> LINK ex FR. ; <i>Cladosporium cladosporioides</i> (FRES.) DE VRIES ; <i>Epicoccum nigrum</i> LINK ; <i>Graphium</i> sp. ; <i>Isaria</i> sp. ; <i>Scopulariopsis brevicaulis</i> SACC. ; <i>Scopulariopsis fusca</i> ZACH. ; <i>Trichothectum roseum</i> LINK.

(1) Pour la signification des abréviations, cf. Matériel et Méthode.

TABLEAU 2

Comparaison de la croissance thallique en aérobiose et en anaérobiose à 30°C sur milieu gélosé  
(R : rayon de la colonie en mm)

	Croissance en anaérobiose (0 % O <sub>2</sub> + 10 % CO <sub>2</sub> ) R <sub>1</sub> (mm)	Croissance en aérobiose (témoins) R <sub>2</sub> (mm)	$\frac{R_1}{R_2} \times 100$
<i>Fusarium oxysporum</i> .	18	90	20
<i>Fusarium moniliforme</i>	10	80	12
<i>Fusarium poae</i> . . . . .	9	100	9
<i>Graphium</i> sp. . . . .	6	60	10
<i>Byssochlamys nivea</i> . . .	15	100	15
<i>Paccilomyces varioti</i> . .	4	100	4

### 1. 3. Variabilité de la croissance en anaérobiose de souches d'une même espèce.

L'essai porte sur trois espèces : *Mucor hiemalis*, *Absidia corymbifera*, *Mucor racemosus*. Ce choix a été guidé par leur fréquence de rencontre dans les ensilages. Pour chacune d'entre elles, nous avons introduit dans l'essai une souche (M) en provenance du laboratoire de Cryptogamie du Muséum national d'Histoire naturelle de Paris ; l'identification des autres souches (E), isolées d'ensilages, a été confirmée par ce même laboratoire.

Dans le tableau 3, on constate que pour les trois espèces retenues toutes les souches éprouvées peuvent croître en anaérobiose avec une intensité plus ou moins grande.

Une observation microscopique permet de voir également des différences dans les proportions des formes levures, blastospores et arthrospores pour les souches d'*Absidia corymbifera* et de *Mucor racemosus*.

TABLEAU 3

Croissance comparative en anaérobiose de différentes souches de trois espèces de Mucoracées sur milieu gélosé à 30°C

(M : souches du Muséum national d'Histoire naturelle de Paris ;  
E : souches isolées d'ensilages)

Espèces	Souches	Croissance	Espèces	Souches	Croissance	
<i>Mucor hiemalis</i>	M	++++	<i>Absidia corymbifera</i>	M	+	
	E 6	+++		—	E 23	++
	E 13	++		—	E 24	+++
	—	+++	<i>Mucor racemosus</i>	M	++++	
	—	+++		—	E 10	++++
—	+++	—		E 34	+++	
—	E 31	++++	—	E 35	++	

2. — Influence en anaérobiose de la teneur en CO<sub>2</sub>

Douze espèces fongiques, parmi les plus représentatives de la flore des ensilages, furent mises en incubation pendant 15 jours en anaérobiose et en présence de 15 p. 100 de CO<sub>2</sub>.

Par rapport aux essais précédents effectués en présence de 10 p. 100 de CO<sub>2</sub> (tabl. 1), la croissance des moisissures (tabl. 4) ne semble pas très affectée par cette augmentation de la teneur en gaz carbonique. Nous avons toutefois pu remarquer une augmentation du diamètre du thalle pour *Absidia butleri* et un développement plus luxuriant de *Byssoschlamys nivea* et de *Trichoderma longibrachiatum*; on observe aussi des différences morphologiques et en particulier la présence presque exclusive dans ce cas de cellules sphériques bourgeonnantes chez *Mucor hiemalis*.

TABLEAU 4

Croissance des champignons avec 0 p. 100 et 15 p. 100 CO<sub>2</sub> à 30°C

Espèces fongiques	Aspect morphologique (1)	Croissance
<i>Absidia butleri</i> .....	LF	++
<i>Mucor hiemalis</i> .....	L	++
<i>Mucor racemosus</i> .....	LF	++
<i>Rhizopus arrhizus</i> .....	FL	+++
<i>Byssoschlamys nivea</i> .....	F	++
<i>Neurospora crassa</i> .....	FL	+
<i>Aspergillus clavatus</i> .....	FL	+
<i>Trichoderma longibrachiatum</i> .....	FL	+
<i>Fusarium poae</i> .....	F	+
<i>Fusarium oxysporum</i> .....	F	++
<i>Fusarium moniliforme</i> .....	F	+
<i>Paecilomyces varioti</i> .....	F	+

(1) Pour la signification des abréviations, cf. Matériel et Méthode.

## 3. — Influence de la température sur la croissance en anaérobiose

Douze espèces fongiques sont incubées en anaérobiose (+ 10 p. 100 de CO<sub>2</sub>) pendant 15 jours à 23°C, 30°C et 40°C.

A 30°C, on obtient une meilleure croissance pour l'ensemble des espèces testées (tabl. 5).

A 23°C, la croissance est pratiquement identique pour certaines espèces (*Absidia corymbifera*; *A. ramosa*; *Neurospora crassa*; *Asp. clavatus*; *Fus. oxysporum*...) alors que le diamètre du thalle est plus faible pour d'autres (*M. hiemalis*; *M. racemosus*; *Rhizopus arrhizus*...)

Par contre, à 40°C, mis à part *Absidia corymbifera*, le diamètre du thalle n'excède pas 5 mm pour l'ensemble des espèces; il y a même inhibition de croissance pour *Aspergillus clavatus* et *Trichoderma longibrachiatum*.

Quelle que soit la température, l'aspect morphologique des moisissures ayant cultivé reste sensiblement le même.

TABLEAU 5

Influence de la température sur la croissance en anaérobiose de 12 moisissures isolées d'ensilages

	23°C	30°C	40°C
<i>Absidia corymbifera</i> .....	++	+-	++
<i>Absidia ramosa</i> .....	+	+	+
<i>Mucor hiemalis</i> .....	++	+++	++
<i>Mucor racemosus</i> .....	++	+++	+
<i>Rhizopus arrhizus</i> .....	+++	+++	++
<i>Byssoschlamys nivea</i> .....	+-	++	+
<i>Neurospora crassa</i> .....	+	+	+
<i>Aspergillus clavatus</i> .....	+	+	0
<i>Fusarium oxysporum</i> .....	+++	+++	+
<i>Fusarium moniliforme</i> .....	++	+++	+
<i>Fusarium poae</i> .....	+	+	+
<i>Trichoderma longibrachiatum</i> .....	+	+	0

## 4. — Effet fongistatique ou fongicide de l'anaérobiose

Parmi les 27 espèces qui n'ont pas présenté de croissance en anaérobiose (tabl. 1), seul *Cladosporium herbarum* a subi un effet germicide. Les 26 autres espèces ayant repris une croissance normale après la mise à l'air, on peut dire que l'effet de l'anaérobiose ne fut, pour la durée de l'expérience, que biostatique pour ces moisissures.

## DISCUSSION

## 1. — Croissance en anaérobiose

## 1. 1. Croissance et aspect morphologique.

Nous avons vu (tabl. 1) que sur quarante-neuf espèces fongiques testées, vingt-deux sont capables de croître en anaérobiose (+ 10 p. 100 CO<sub>2</sub>) à 30°C ; neuf appartiennent à la famille des Mucoracées, trois sont des Ascomycètes et dix des Adélmycètes.

La croissance en absence d'oxygène a déjà été rapportée pour certaines de ces moisissures : *Mucor racemosus* et *Rhizopus nigricans* (BARTNICKI-GARCIA et NICKERSON, 1962) ; *Mucor circinelloides*, *Cephalosporium acremonium*, *Geotrichum candidum*, *Fusarium moniliforme* et *Fusarium oxysporum* (CURTIS, 1969), *Fusarium solani* (GUILLEMAT et MONTÉGUT, 1956).

De même pour certaines espèces telles que *Penicillium brevicompactum*, *Scopulariopsis brevicaulis*, *Aspergillus fumigatus*, *A. niger* et *A. flavus*, *A. versicolor*, *Epicoccum nigrum*, subissant un effet biostatique en anaérobiose, nos résultats confirment respectivement ceux de CURTIS (1969) et de STOTZKY et GOOS (1964).

Toutefois, une étude comparative des travaux effectués par ces auteurs permet

de constater un certain nombre de divergences quant aux espèces fongiques capables de croître en anaérobiose. Ainsi pour *Geotrichum candidum*, nos résultats confirment ceux de CURTIS (1969), infirment ceux de STOTZKY et GOOS (1964), tandis que pour *Mucor hiemalis* nous sommes dans une situation diamétralement opposée. Pour *Trichoderma viride*, seuls STOTZKY et GOOS (1964) ont obtenu une croissance en absence d'oxygène. Pour les autres espèces testées, leur faculté de se développer en anaérobiose n'a pas été définie jusqu'alors ; ceci nous permet d'ajouter un certain nombre de moisissures à celles déjà reconnues comme possédant ces potentialités (tabl. 1). Les divergences observées peuvent être rapportées à trois causes principales : les différentes méthodes employées pour obtenir l'anaérobiose, la composition des milieux de culture et la variabilité des souches au sein d'une même espèce.

— En ce qui concerne l'obtention de l'anaérobiose, on peut regrouper les différents procédés de la façon suivante : d'une part des prélèvements effectués à différentes profondeurs dans le sol (GUILLEMAT et MONTÉGUT, 1956), d'autre part l'utilisation de mélanges gazeux variant entre 100 p. 100 de CO<sub>2</sub> et 100 p. 100 de N<sub>2</sub> (STOTZKY et GOOS, 1964 ; BARTNICKI-GARCIA et NICKERSON, 1961) sans que l'absence totale d'oxygène soit toujours vérifiée par un indicateur d'anaérobiose.

— Quant aux milieux de culture, BARTNICKI-GARCIA et NICKERSON (1961) ont remarqué que *Mucor Rouxii* ne répondait positivement en anaérobiose que dans la mesure où le substrat contenait de la thiamine et de l'acide nicotinique, ce qui laisse supposer qu'en absence d'oxygène les champignons ont certaines exigences qui ne sont pas toujours satisfaites par les milieux synthétiques habituellement employés par les auteurs précédents. Enfin, la variabilité entre souches peut toujours être invoquée ; nous verrons plus loin ce qu'il y a lieu d'en penser.

#### *Aspect morphologique.*

Nous avons vu qu'en anaérobiose les moisissures se présentent essentiellement sous forme de cellules sphériques bourgeonnantes (*Absidia* ; *Mucor*) ou de structures filamenteuses généralement stériles (Adélomycètes) avec formation en plus ou moins grand nombre d'arthrospores et de blastospores suivant les espèces et les conditions de culture.

Pour les structures filamenteuses, nous avons noté une régression des formes de multiplication ; on observe toutefois dans certains cas la présence de bourgeons, dont il paraît délicat de préciser la genèse et le rôle dans la survie des champignons.

Par contre, l'induction de la formation des cellules sphériques a fait l'objet d'un certain nombre de travaux et leur apparition peut être la conséquence de l'intervention de différents facteurs. Ainsi les acides aminés à groupement -SH favorisent le développement de la phase levure d'*Histoplasma capsulatum* et de *Candida albicans* (NICKERSON, 1948) ; pour *Sporotrichum schenki*, DROUHET et MARIAT (1952) ont confirmé l'action déterminante du CO<sub>2</sub>, puisque la présence de 5 p. 100 de CO<sub>2</sub> entraîne d'emblée la phase levure quelle que soit la nature de la source azotée ; il est néanmoins possible d'obtenir cette phase sur un milieu liquide agité contenant un hydrolysât de caséine ou divers acides aminés qui, par décarboxylation, seraient une source de CO<sub>2</sub> ; l'agitation favoriserait dans ce cas l'accumulation d'anhydride carbonique dans le milieu.

En résumé, il semblerait donc que l'apparition de la forme levure dépende essentiellement de la nature de la source azotée ou de la teneur en CO<sub>2</sub> suivant

les espèces fongiques. Compte tenu de la présence d'acides aminés à groupement -SH dans notre milieu de culture et de la croissance filamenteuse en aérobiose de nos champignons, nous avons été amenés à envisager l'influence de la teneur en  $\text{CO}_2$  dont nous parlerons plus loin.

### 1. 2. *Étude comparative de la croissance en aérobiose et en anaérobiose.*

La croissance des champignons en anaérobiose n'est jamais supérieure au quart de celle observée en présence d'oxygène. Cette estimation selon le rayon de la colonie est critiquable puisqu'il n'est pas tenu compte de la densité mycélienne et de l'importance du développement au-dessus du milieu de culture. Il semble toutefois que notre appréciation du phénomène reste valable puisque CURTIS (1969) arrive sensiblement aux mêmes résultats avec la technique des poids secs.

Ceci peut s'expliquer par le fait qu'en anaérobiose le rendement énergétique est nettement inférieur à celui obtenu en aérobiose.

### 1. 3. *Variabilité de la croissance en anaérobiose de souches d'une même espèce.*

Toutes les souches testées (*M. hiemalis*, *M. racemosus*, *A. corymbifera*), y compris celles provenant du Muséum national d'Histoire naturelle de Paris, ont répondu positivement. Aussi, malgré une certaine variabilité dans l'intensité de la réponse, les résultats contradictoires obtenus par les différents auteurs cités plus haut paraissent être difficilement imputables à l'origine des souches.

## 2. *Influence en anaérobiose de la teneur en $\text{CO}_2$*

Bien que limité par la technique mise en jeu pour obtenir d'importantes variations en  $\text{CO}_2$ , nous avons été amenés à enregistrer une certaine augmentation du nombre de formes levures en passant de 10 à 15 p. 100 de  $\text{CO}_2$ , surtout chez les espèces des genres *Mucor* et *Absidia*. Par contre, il ne nous a pas été possible de déceler une différence significative quant à l'intensité de la croissance. Une appréciation subjective nous a permis néanmoins d'observer une augmentation de la densité mycélienne pour *Byssoschlamys nivea* et *Trichoderma longibrachiatum*.

Lors de l'étude des différents facteurs influençant l'apparition de la phase levure nous avons déjà envisagé le rôle du gaz carbonique. En anaérobiose, il semble qu'il en soit de même, compte tenu de nos observations et des résultats acquis par BARTNICKI-GARCIA et NICKERSON (1962). Ces deux auteurs obtinrent en effet une croissance filamenteuse du *Mucor Rouxii* avec 100 p. 100  $\text{N}_2$  alors que l'adjonction de  $\text{CO}_2$  permettait d'induire la forme levure chez ce champignon.

## 3. — *Influence de la température*

Nous avons observé une croissance du *Mucor racemosus* et une inhibition du développement de l'*Aspergillus clavatus* en absence d'oxygène à 40°C alors que leur température maximale de croissance en aérobiose est respectivement de 30-33°C et 42°C (PANASENKO, 1967). On ne peut donc pas transposer en anaérobiose les résultats obtenus en aérobiose, du moins pour les températures maximales ; ceci serait d'autant plus risqué que l'écart entre ces deux températures peut-être d'intensité variable et de signe contraire puisqu'on observe en anaérobiose une valeur

supérieure pour *Mucor racemosus* et inférieure pour *Aspergillus clavatus*. Il en est de même pour les températures optimales qui sont pour *Mucor racemosus* et *Rhizopus arrhizus* proches de 30°C en anaérobiose et respectivement de 20-25°C, 35-36°C en aérobiose.

#### 4. — Effet fongistatique ou fongicide de l'anaérobiose

Parmi les vingt-sept espèces fongiques qui ne se sont pas développées en absence d'oxygène, vingt-six ont subi un effet biostatique et une, un effet fongicide.

Des travaux récents (CLARK-WALKER, 1972) ont montré que la reprise de la croissance normale d'un champignon après un séjour en anaérobiose dépend essentiellement du temps nécessaire aux mitochondries pour retrouver une activité normale. Ce temps est de l'ordre de quatre heures pour *Mucor genevensis*. Aussi, on peut se demander si cette activité mitochondriale ne serait pas en relation avec la durée d'incubation en absence d'oxygène et si, de ce fait, l'action inhibitrice de l'anaérobiose ne pourrait pas devenir irréversible.

En résumé, nous rappellerons que parmi les moisissures isolées des ensilages, un certain nombre sont capables de croître en anaérobiose alors que d'autres subissent soit un effet biostatique, soit un effet fongicide. D'autre part, en absence d'oxygène, la croissance des champignons bien que n'étant jamais supérieure au quart de celle obtenue en aérobiose, semble davantage dépendre de la température (tabl. 5) que de la teneur en CO<sub>2</sub> (tabl. 4). Ce dernier facteur paraît, par contre, prépondérant en ce qui concerne l'importance du dimorphisme surtout chez les espèces des genres *Mucor* et *Absidia*.

Compte tenu des conditions écologiques qui sont susceptibles de régner au sein d'un bon ensilage, il semblerait que, pour les champignons capables de croître en anaérobiose, ce soit la température qui puisse avoir un effet sélectif et limiter l'importance du développement fongique du fait qu'une valeur de 40°C peut s'établir, du moins pendant un certain temps, dans un silo. Par ailleurs, il convient de ne pas oublier que la température optimale de développement d'une moisissure déterminée en culture pure n'est certainement pas la même lorsqu'elle se trouve associée à d'autres moisissures et à des bactéries dans les conditions naturelles ; ainsi, d'après GUILLEMAT et MONTÉGUT (1956), si cette température est de l'ordre de 25-30°C pour une espèce en culture pure, elle serait de 20-22°C dans le cas d'une flore complexe. Il convient donc de rester très prudent dans toute extrapolation de nos résultats obtenus *in vitro*.

Il semble cependant que l'on puisse raisonnablement penser que dans un bon ensilage, suivant la nature du cortège floristique de départ, il existe au moins trois types de moisissures. Tout d'abord, celles qui peuvent croître dans la masse du silo et auxquelles nous nous sommes attachés dans la présente étude (tabl. 1 A) ; puis celles qui subissent sous l'influence de l'anaérobiose un effet biostatique (tabl. 1 B) et enfin celles pour lesquelles l'anaérobiose a un effet fongicide.

Pour les espèces appartenant à la seconde catégorie telles que *P. cyclopium*, *P. granulatum*, leur abondance sur les fronts de coupe (ESCOULA *et al.*, 1972) paraît peu compatible avec une culture même optimale de vingt-quatre heures. Aussi il semblerait qu'il y ait autre chose qu'un effet biostatique de l'anaérobiose et que ces champignons seraient capables d'acquérir, peut-être lors du stockage, certaines potentialités qui s'extérioriseraient lorsque les conditions deviendraient plus favo-

rables. Des travaux en cours permettront peut-être de confirmer cette hypothèse.

De toute façon, ces espèces de première contamination méritent certainement plus d'intérêt du point de vue de la toxicologie que les éventuels contaminants secondaires dont l'intervention reste sporadique juste avant utilisation des fourrages par les animaux consommateurs.

*Recu pour publication en janvier 1973.*

## REMERCIEMENTS

Il nous est agréable de remercier M<sup>me</sup> J. NICOT du Muséum national d'Histoire naturelle de Paris, qui nous a aimablement fourni des souches de référence, et Messieurs C. MONTANT, Professeur à la faculté des Sciences de Toulouse, et J. PELHATE Maître de Conférences à la faculté des Sciences de Brest, pour l'attention qu'ils ont bien voulu porter à notre travail. Nos remerciements s'adressent aussi à M. J. MORE, pour la réalisation des photographies.

## SUMMARY

### STUDIES ON THE MYCOFLORA OF SILAGE

#### II. — ANAEROBIC GROWTH OF SPECIES OF FUNGI

Of forty-nine species of fungi isolated from samples of ensilage, twenty-six underwent a biostatic effect, one a fungicidal effect and twenty-two were able to grow anerobically (+ 10 p. 100 CO<sub>2</sub>) at 30°C; in this last group, nine belong to the Mucoraceae, three are Ascomycetes and ten are Adelomycetes.

In the absence of oxygen the species from the genus *Mucor* and genus *Absidia* appear essentially as round cells with buds; the other moulds maintain a filamentous form, mostly sterile. Their growth is never above a quarter of that gained aerobically and seems to depend more on temperature than the content of CO<sub>2</sub>.

The observations show that a number of moulds can grow deep on good ensilage.

## РЕЗЮМЕ

Микофлора силоса. Развитие видов грибов в анаэробных условиях.

Из сорока девяти видов грибов, выделенных из передних слоев силоса, двадцать шесть выдерживают биостатический эффект, один вид — фунгоцидный эффект и двадцать два способны размножаться в анаэробных условиях (+ 10 % CO<sub>2</sub>) при 30° С; между этими последними, девять принадлежат к семейству Mucoraceae три являются Ascomycetes и десять Adélomycetes.

В отсутствии кислорода, виды родов *Mucor* и *Absidia* представлены в основном бугристыми сферическими клетками; другие плесневые, сохраняющие нитевидную структуру, обычно стерильны. Их развитие никогда не превышает четверти тех, которые осуществляются в аэробных условиях и зависят в большей степени от температуры, нежели от содержания CO<sub>2</sub>.

Из этих наблюдений можно сделать вывод, что некоторое количество плесеней способны развиваться в условиях хорошего силоса.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BARTNICKI-GARCIA S., NICKERSON W. J., 1961. Thiamine and nicotinic acid : anaerobic growth factors for *Mucor Rouxii*. *J. Bacteriol.*, **82**, 142-148.
- BARTNICKI-GARCIA S., NICKERSON W. J., 1962. Induction of yeastlike development in *Mucor* by carbon dioxide. *J. Bacteriol.*, **84**, 829-840.
- BREWER J. H., ALLGEIER D. L., 1966. Safe self-contained carbon dioxide. Hydrogen anaerobic system. *Appl. Microbiol.*, **14**, 985-988.
- BURMEISTER H. R., HARTMAN P. A., SAUL R. A., 1966. Microbiology of ensiled high-moisture corn. *Appl. Microbiol.*, **14**, 31-34.
- CLARK-WALKER G. D., 1972. Development of respiration and mitochondria in *Mucor genevensis* after anaerobic growth : absence of glucose repression. *J. Bacteriol.*, **109**, 399-408.
- COCHRANE V. W., 1958. *Physiology of Fungi*, 5-18, New York John Wiley and Sons, Inc., London.
- CURTIS P. J., 1969. Anaerobic growth of Fungi. *Trans. brit. mycol. Soc.*, **53**, 299-302.
- DEXTER S. T., 1966. Gas evolution from silages as a diagnostic tool for chemical reaction and energy losses. *Agron. J.*, **58**, 383-387.
- DROUHET E., MARIAT F., 1952. Étude des facteurs déterminant le développement de la phase Levure de *Sporotrichum schenckii*. *Ann. Inst., Pasteur*, **83**, 506-514.
- ESCOULA L., LE BARS J., LARRIEU G., 1972. Études sur la mycoflore des ensilages. Mycoflore des fronts de coupe d'ensilages de graminées fourragères. *Ann. Rech. vétér.*, **3**, 469-481;
- FARAG F. A., ABOU EL FADL, 1968. Studies on some factors influencing the production of good silage from clover. *Agr. res. Rev.*, **46**, 75-95.
- GUILLEMAT J., MONTÉGUT J., 1956. Contribution à l'étude de la microflore fongique des sols cultivés. *Ann. Épiphyties*, **3**, 471.
- LANGSTON C. W., 1958. Microbiologie and chemistry of grass silage, U. S. *Dept. Agric. tech. Bull.*, **1187**, 1-73.
- LYNCH G. P., JACOBY M. M., BENJAMIN C. R., SHALKOP W. T., CHANCE C. M., 1970. Feeding high moisture, ensiled, moldy shelled corn. *J. dairy Sci.*, **53**, 1292-1295.
- NICKERSON W. J., 1948. *Nature*, **162**, 241. (Abstr.)
- PANASENKO V. T., 1967. Ecology of microfungi. *Bot. Rev.*, **3**, 189-215.
- STOTZKY G., GOODS R. D., 1964. Effect of high CO<sub>2</sub> and low O<sub>2</sub> tensions on the soil Microbiota. *Canad. J. Microbiol.*, **11**, 853-867.

## PLANCHE I

FIG. 1

Aspect morphologique du *Trichoderma longibrachiatum* RIFAI  
(× 980) (milieu : maïs, malt, extrait de levure, agar).

A. en aérobiose.

B. en anaérobiose (0 p. 100 O<sub>2</sub>, 10 p. 100 CO<sub>2</sub>) avec absence de phialides vraies.

FIG. 2

Aspect morphologique du *Byssochlamys nivea* WESTLING  
(× 630) (milieu : maïs, malt, extrait de levure, agar).

A. en anérobiose.

B. en anaérobiose (0 p. 100 O<sub>2</sub>, 10 p. 100 CO<sub>2</sub>) : a) aleuries

b) phialides ; c) asques.



FIG. 1 A



FIG. 1 B

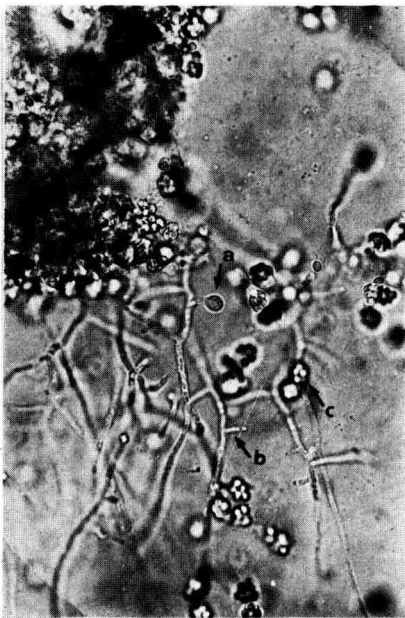


FIG. 2 A

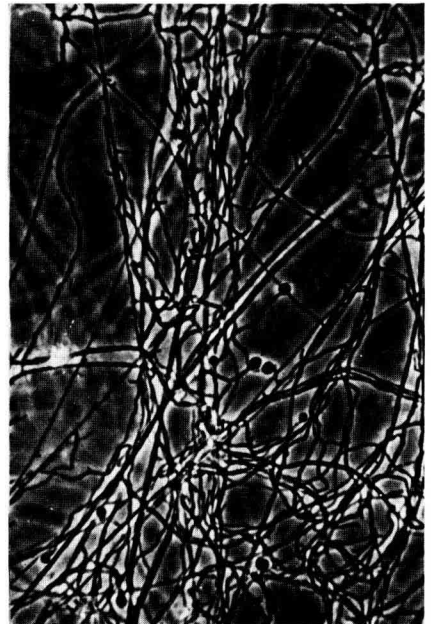


FIG. 2 B

## PLANCHE II

### FIG. 3

Aspect morphologique du *Mucor hiemalis* WEHMER (milieu : maïs, malt, extrait de levure, agar). — A : ( $\times 630$ ) en aérobiose : forme filamenteuse avec sporocystes. — B : ( $\times 980$ ) en anaérobiose : (0 p. 100 O<sub>2</sub>, 10 p. 100 CO<sub>2</sub>) cellules sphériques bourgeonnantes.

### FIG. 4

Aspect morphologique d'*Absidia corymbifera* (COHN) SACC et TROTTER (milieu : maïs, malt, extrait de levure, agar). — A : ( $\times 630$ ) en aérobiose : forme filamenteuse avec sporocystes. — B : ( $\times 980$ ) en anaérobiose (0 p. 100 O<sub>2</sub>, 10 p. 100 CO<sub>2</sub>) cellules sphériques.

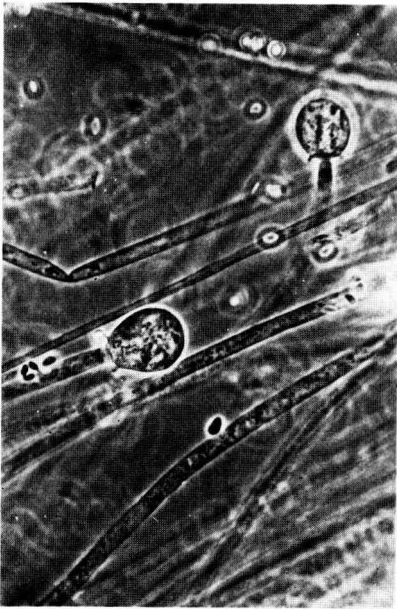


FIG. 3 A



FIG. 3 B

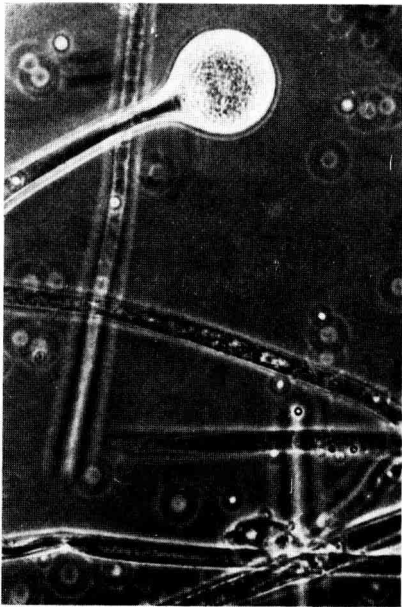


FIG. 4 A

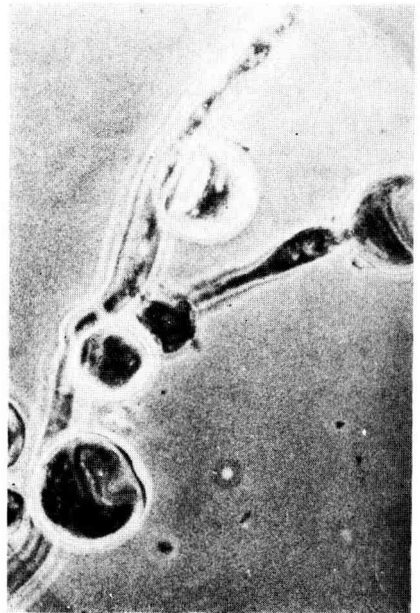


FIG. 4 B

### PLANCHE III

FIG. 5

Aspect morphologique du *Rhizopus arrhizus* Fisher ( $\times 630$ ) (milieu : maïs, malt, extrait de levure, agar). — A : en aérobiose : forme filamenteuse avec sporocystes. — B : en anaérobiose (0 p. 100 O<sub>2</sub>, 10 p. 100 CO<sub>2</sub>) forme filamenteuse stérile.

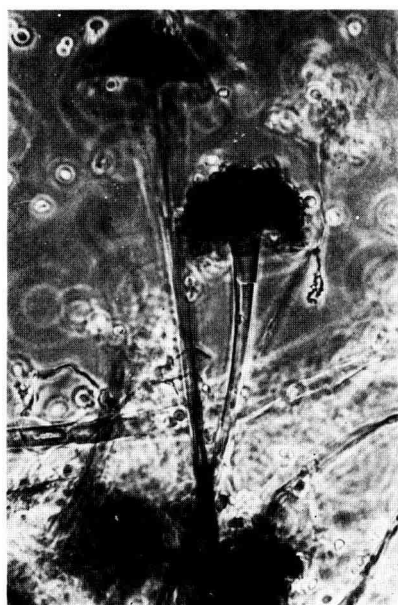


FIG. 5 A



FIG. 5 B