

RECHERCHES SUR LE DEVENIR DE L'ÉTHANOL AU NIVEAU DU RUMEN⁽¹⁾

I. — ÉTUDE EN RUMEN ARTIFICIEL

Françoise LEROY

Avec la collaboration technique de Marguerite NAVILLE

Laboratoire de Recherches sur la Conservation et l'Efficacité des Aliments,
16, rue Claude Bernard — Paris (V^e)

SOMMAIRE

Certains aliments des Ruminants peuvent contenir de l'éthanol à l'état préformé (cossettes de betteraves fermentées, ensilages de pommes et de marc de pommes). En raison du rôle important que peuvent jouer ces sous-produits il est intéressant de se préoccuper du sort de ce métabolite.

Une étude a été entreprise en rumen artificiel, afin de rechercher si l'éthanol était utilisé par les microorganismes du rumen.

Il a été constaté que la micropopulation du rumen paraît dépourvue, même après une longue accoutumance, d'équipement enzymatique lui permettant de dégrader rapidement l'alcool éthylique. Si l'alcool demeure en rumen artificiel, pendant longtemps (24 ou 48 h), il est partiellement oxydé par la microflore, mais ne semble pas servir de source calorique aussi adéquate que l'amidon ou le cérélose à la prolifération de celle-ci.

Le taux de dégradation de l'alcool est d'autant plus élevé que sa concentration dans le milieu est plus faible. La présence d'alcool semble exercer un effet stimulant sur l'activité métabolique des microorganismes, car un accroissement significatif des acides gras volatils et en particulier de l'acide acétique a été enregistré. Les recherches sont poursuivies *in vivo*.

INTRODUCTION

Nos travaux sur le devenir de l'alcool éthylique au niveau du rumen ont pour origine une étude de LEROY et ZELTER (1955) sur l'efficacité alimentaire des marcs de pommes ensilés, signalant que des vaches ingéraient de 0,9 g à 1,6 g d'éthanol

(¹) Ce travail a fait l'objet de deux notes préliminaires ; voir Annales de la Nutrition et de l'Alimentation, a) 1958, **12**, 6, 283-287

b) 1961, **15**, 6, 280-287

par kilogramme de poids vif, sans troubles apparents et semblaient l'utiliser avec le même « rendement biologique » que les autres constituants énergétiques de la ration. Ces doses sont proportionnellement semblables à celles qui sont tolérées par l'homme adulte, lequel ne devrait pas absorber en 24 heures plus d'1,7 g d'éthanol par kilo de poids corporel.

La valeur nutritive de l'alcool éthylique, son lieu de dégradation, ses modalités d'utilisation et les troubles physiologiques, qu'il peut engendrer en cas d'absorption excessive, ont été longuement étudiés chez l'homme et les animaux de laboratoire. (LE BRETON et TRÉMOLIÈRES, 1957).

Par contre, chez les ruminants, qui consomment fréquemment des aliments dont la fermentation est capable de produire de l'éthanol, aucune observation ne figurait dans la bibliographie au moment où nous avons entrepris nos recherches. (F. LEROY, 1958).

La quantité de calories nécessaires à la couverture des besoins métaboliques d'entretien d'une vache est théoriquement de l'ordre de 1 225 calories pour 100 kg de poids vif. Comme d'après LE BRETON (1937) et DONTCHEFF (1955), l'alcool peut couvrir 50 p. 100 du métabolisme basal, les données citées correspondraient à une utilisation possible aux fins de l'entretien de 90 g d'alcool ou de 630 calories (1 g d'alcool apportant 7 Calories O. M. S. 1954) pour 100 kg de poids vif chez une femelle bovine adulte.

Dans le cas du ruminant, le problème de l'utilisation de l'alcool se situe à la fois sur le plan théorique (lieu de dégradation, sort de l'énergie libérée, implications physiologiques) et sur le plan pratique (ce corps doit-il être pris en considération pour l'estimation de la valeur énergétique des aliments en renfermant ?)

Il semblait intéressant de savoir si l'alcool était dégradé par les microorganismes du rumen comme les autres aliments ou au contraire s'il échappait à leur action pour être utilisé dans un autre lieu.

Nous avons expérimenté à l'aide de deux techniques différentes pour essayer d'éclaircir ce point : d'une part en rumen artificiel pour faire une étude approchée du problème et ensuite sur moutons fistulés pour vérifier *in vivo* les phénomènes observés *in vitro*.

ÉTUDE « IN VITRO » SUR L'UTILISATION DE L'ÉTHANOL AU NIVEAU DU RUMEN

Les bactéries du sol, qui sont aérobies, utilisent l'éthanol directement et sans période de latence (STEVENSON et KATZNELSON, 1958). *Escherichia Coli* dégrade l'alcool plus rapidement en anaérobiose (de LEON, CREASER, 1958). On peut donc se demander si la micropopulation du rumen, qui est strictement, anaérobie est douée de propriétés analogues. Dans l'affirmative, ce fait pourrait acquérir une grande importance nutritionnelle, étant donné le rôle primordial des microorganismes dans la physiologie digestive du ruminant. Cette hypothèse implique une détermination de l'optimum de temps et de concentration en alcool pour obtenir la plus forte dégradation et la nécessité de savoir si la nature du substrat a une action sur le

taux de disparition de ce métabolite. En outre, il importe également de rechercher si l'éthanol influence l'intensité et l'orientation des activités métaboliques de la micro-population de la panse (cellulolyse, glycolyse, production d'acides gras volatils et d'ammoniaque, protéinogenèse bactérienne).

MATÉRIEL ET TECHNIQUES

1^o) *Rumen artificiel*

Les rumens artificiels étaient constitués par des Erlenmeyers de 250 cm³ pourvus d'une tubulure permettant l'introduction et l'évacuation de gaz.

L'inoculum provenait de moutons mâles castrés, maintenus constamment au foin de luzerne, les uns inaccoutumés à l'alcool et les autres accoutumés à ce produit depuis 45 jours. Il était prélevé par tubage gastrique pratiqué 18 heures après le dernier repas. Après filtration sur 6 couches de gaze, une partie aliquote du liquide de panse était introduite dans chaque rumen artificiel contenant 10 g de substrat et 100 ml de salive artificielle, préparée selon la formule de MAC DOUGALL (1948) et complétée par les micro-éléments conseillés par HUBBERT et al (1958).

Les milieux étaient maintenus à la température de 39,5°C ± 0,1 dans un bain-marie à thermostat. Un courant continu de gaz carbonique sous très faible pression assurait l'agitation et l'anaérobiose. Des fioles de garde étaient placées à l'issue de chacun des rumens artificiels pour contrôler des pertes éventuelles d'alcool :

2^o) *Doses d'alcool et temps d'incubation*

Des doses croissantes (0,292 — 0,438 — 0,584 — 0,803 — et 1,095 g pour 100 ml de milieu de rumen) d'éthanol pur ont été expérimentées en présence d'un substrat de foin de luzerne. La cinétique de la dislocation de ce métabolite a été suivie pendant 3, 8, 24 et 48 h d'incubation. Ces deux dernières durées ont été adoptées pour l'établissement de certains bilans : cellulolyse, glycolyse, formation d'acides gras volatils et d'ammoniaque, protéinogenèse bactérienne.

Des milieux témoins négatifs (inoculum seul, substrat sans alcool) ont été incubés dans les mêmes conditions.

3^o) *Substrats*

Pour étudier le rôle du substrat, nous avons suivi la disparition de l'alcool en présence du seul inoculum, d'un substrat pauvre en N protéique (paille de blé) enrichi de N indifférencié (urée) et d'un aliment riche en azote protéique (foin de luzerne).

TABLEAU I
Composition des milieux de rumen artificiel
p. 100 ml de milieu

Essais n ^o	Salive artificielle (ml)	Substrats						Composition chimique		
		Inocu- lum (ml)	Foin de luzerne (g)	Paille (g)	Urée (mg)	Amidon de P. de terre (mg)	Céré- lose (mg)	N. Total (mg)	Cellulose KURS- CHNER (mg)	Glucides réducteurs (mg)
1 a ...	50	50	5	0	0	0	0	166	924	865
2 b ...	50	50	0	5	150	0	0	115	1 950	1 320
3 b ...	50	50	0	5	150	500	0	115	1 950	1 752
4 b ...	50	50	0	5	150	250	0	115	1 950	1 536
5 b ...	50	50	0	5	150	0	500	115	1 950	1 770
6 b ...	50	50	0	5	150	0	250	115	1 950	1 545

Pour savoir si l'alcool est utilisé comme source d'énergie par les bactéries du rumen, nous l'avons comparé par substitution isocalorique partielle ou totale à du cérélose et à de l'amidon de pomme de terre, en présence de paille et d'urée. L'alcool éthylique était compté comme apportant 7 calories (recommandations de l'Œ. M. S., 1954). L'amidon et le cérélose apportaient 4 calories par gramme. Dans chaque essai figurait un milieu témoin sans alcool.

L'action de l'inoculum provenant d'un mouton accoutumé à l'alcool a été étudiée avec un substrat composé d'une partie d'orge pour deux parties de foin de luzerne.

La composition des différents milieux est donnée dans le tableau 1.

4°) *Techniques analytiques*

Après incubation, les milieux de rumen ont été centrifugés à basse vitesse (environ 30 g) pendant 3 minutes.

Dans le surnageant additionné des eaux de lavage du culot, ont été dosés quantitativement : l'alcool résiduel après distillation (à l'état de substances réductrices) par oxydation en milieu sulfochromique selon la microtechnique de NICLOUX, (1931) ; les acides gras volatils par la méthode de chromatographie de partage gaz-liquide de JAMES et MARTIN (1952), modifiée (ZELTER et F. LEROY, 1958) après distillation et titrage de l'acidité volatile totale par la méthode de FRIEDMANN (1938). Des dosages d'ammoniaque par la méthode de CONWAY (1950) et d'urée résiduelle selon SCHRAM et AINES (1959) ont été effectués lorsque les milieux comportaient de l'urée.

Sur le culot de centrifugation ont été dosés : la cellulose par la méthode de KURSCHNER et HOFER (1929), modifiée (FAUCONNEAU et *al*, 1953), les glucides réducteurs (après une hydrolyse à l'ébullition par une solution d'acide sulfurique à 2 p. 100 V/V/ pendant 4 heures) par la méthode colorimétrique de NELSON (1944).

Dans les milieux composés de paille et d'urée, nous avons également dosé l'azote Kjeldahl du culot bactérien isolé comme suit : une partie aliquote du surnageant de la centrifugation à 30 g, a été centrifugée à 12 500 g pendant 20 minutes, lavée avec une solution de sérum physiologique et recentrifugée à la même vitesse et pendant le même temps.

RÉSULTATS

Les fuites d'alcool hors du rumen artificiel ont été négligeables, d'après le dosage effectué sur le contenu des fioles de garde. Conventionnellement, tous les résultats ont été corrigés en tenant compte des substances réductrices présentes dans le témoin sans alcool (le maximum observé a été de 0,040 g par 100 ml en 48 h).

A. — VITESSE ET TAUX DE DÉGRADATION DE L'ALCOOL

1°) *Influence de la dose d'alcool sur la cinétique et le taux de disparition*

En présence de foin de luzerne, substrat riche en azote complexe, l'étude cinétique (graph. 1) montre que la dislocation de l'alcool éthylique dans le rumen artificiel est lente : 3 p. 100 après 3 h, elle s'élève à 6 p. 100 après 8 h, 23 p. 100 après 24 h, elle atteint 56 p. 100 après 48 h, pour la plus faible dose introduite (0,292 g pour 100 ml de milieu). Pour une quantité d'alcool de 0,584g pour 100 ml, la dégradation est respectivement de 5, 20 et 30 p. 100 après 8, 24 et 48 heures d'incubation. L'utilisation est encore moins bonne avec 1,095 g : 3 p. 100 disparaissent en 24 h et 11 p 100 en 48 h.

Au bout de 48 heures, moment où l'on enregistre le maximum de dégradation *in vitro*, en présence de foin de luzerne (55 p. 100 pour 0,292 g), le taux d'oxydation de l'éthanol est inversement proportionnel à sa concentration dans le milieu (tabl. 2)

2°) Influence de substrat sur la disparition de l'éthanol

L'alcool éthylique, incubé en la seule présence des éléments nutritifs apportés par l'inoculum, est utilisé très faiblement par les bactéries du rumen : en moyenne 9,0 p. 100 de la quantité introduite (0,292 g pour 100 ml de milieu) disparaissent après 24 heures (tabl. 2). Quand de l'urée est ajoutée à l'inoculum, la dégradation de l'éthanol est identique.

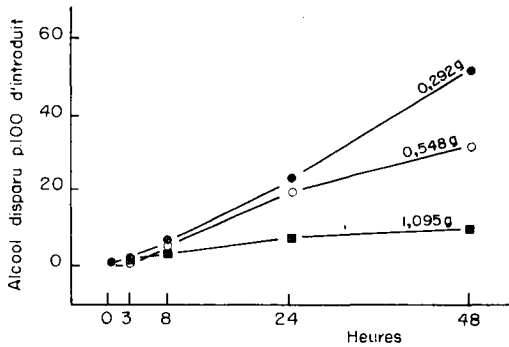


FIG. 1. — Cinétique de disparition en rumen artificiel de l'éthanol en présence de foin de luzerne

TABLÉAU 2

Influence du substrat et de la dose d'éthanol sur la disparition de celui-ci après 24 ou 48 heures d'incubation en rumen artificiel

Substrats	Alcool introduit (% ml de milieu)	Alcool disparu après 24 h (g % g d'alcool introduit)	Alcool disparu après 48 h (g % g d'alcool introduit)
Inoculum seul	0,292	9,0	
Inoculum + urée	0,292	9,5	
Inoculum + paille + urée (b)	0,292	50,7	97,2
Inoculum + paille + urée + amidon (b) ..	0,146	51,4	88,8
Inoculum + paille + urée + cérélose	0,146	29,5	94,9
Inoculum + foin de luzerne	0,292	23,0	55,7 ± 3,5 (a)
Inoculum + foin de luzerne	0,438		45,5 ± 5,8
Inoculum + foin de luzerne	0,584	20,0	30,1 ± 7,1
Inoculum + foin de luzerne	0,803		21,2 ± 6,2
Inoculum + foin de luzerne	1,095	8,0	10,8 ± 3,1

(a) Écart-type $\sqrt{\frac{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}{n-1}}$ calculé sur 6 essais.

(b) L'amidon de pomme de terre ou le cérélose remplace isocaloriquement la moitié de l'éthanol.

Quand l'alcool est la seule source d'énergie, supposée immédiatement disponible, en présence d'un substrat pauvre en N protéique (paille) enrichi en N non protéique sous forme d'urée, il en disparaît environ 50 p. 100 après 24 h et 97 p. 100 après 48 h. Lorsque du cérélose ou de l'amidon viennent remplacer isocaloriquement la moitié de la dose d'éthanol (tabl. 2), il semble que l'utilisation de ce dernier soit légèrement favorisée par le cérélose, car on enregistre 95 p. 100 de dégradation après 48 h contre 89 p. 100 si l'amidon est substitué au cérélose.

3^o) Effets de l'accoutumance

Avec un inoculum provenant d'un mouton accoutumé, en présence d'un substrat d'orge et de foin de luzerne, la disparition d'éthanol (introduit à la dose de 688 mg pour 100 ml de milieu) est nulle après 4 h, de 4,7 p. 100 après 7 h et 29,8 p. 100 après 24 h. Ce dernier résultat est peu supérieur à celui obtenu sans accoutumance (20. p 100) en présence de foin de luzerne, pour une même durée et pour une dose d'alcool relativement voisine (584 mg).

B. — EFFET DE L'ÉTHANOL SUR L'ACTIVITÉ MÉTABOLIQUE DE LA MICROPOPULATION DU RUMEN

Pour juger de l'effet de l'alcool sur l'activité métabolique de la micropopulation du rumen, nous avons utilisé comme critère : la cellulolyse, la disparition des glucides (cellulose + glucides réducteurs) et la formation d'acides gras volatils, exprimés en pourcentage des données obtenues dans les mêmes milieux sans alcool, pris comme témoins.

a) Glycolyse

L'action de l'alcool éthylique sur le métabolisme de la micropopulation du rumen semble dépressive au cours des premières 24 h (tabl. 3) avec un substrat pauvre en N protéique (paille + urée) : tous les résultats de glycolyse sont très inférieurs à ceux du milieu sans alcool. Entre 24 et 48 h, la dégradation des glucides s'intensifie, l'alcool paraît même la favoriser, en particulier, en présence d'amidon (117 p. 100).

En 48 h, avec un substrat riche en N protéique, (foin de luzerne), l'attaque des glucides est augmentée par l'éthanol introduit à dose faible ; mais l'action de celui-ci devient nuisible au-delà de 0,584 g p. 100 ml de milieu.

b) Formation d'acides gras volatils

Après 24 h et comparativement aux témoins sans alcool, la quantité d'acides gras volatils formés en présence d'alcool avec un substrat de paille et d'urée est toujours inférieure à 100 p. 100. Par contre, au bout de 48 h, tous les résultats des milieux comportant de l'alcool, quel qu'en soit le substrat, sont supérieurs à 100, excepté quand la moitié de l'éthanol est remplacée isocaloriquement par du cérélose (97,8 p. 100). On peut noter dans tous les cas plus d'acide acétique et dans certains cas moins d'acides propionique et butyrique.

TABLEAU 3

Disparition de glucides et formation d'acides gras volatils après 24 et 48 heures d'incubation en rumen artificiel, en présence d'éthanol

Substrats	Alcool introduit (g. % ml de milieu)	Taux de Cellulolyse	Taux de disparition des glucides (b)	Acides gras volatils totaux	Acide acétique	Somme des acides propionique et butyrique
1°) En 24 heures						
Témoins sans alcool.....	0	100	100	100	100	100
Paille + urée + amidon + alcool	0,146	64,3	66,8	87,3	101,6	60,8
Paille + urée + cérélose + alcool	0,146	64,1	58,4	82,7	105,1	54,0
2°) En 48 heures						
Témoins sans alcool.....	0	100	100	100	100	100
Paille + urée + alcool.....	0,292	76,5	81,2	101,8	100,8	103,8
Paille + urée + 1/2 amidon + 1/2 alcool.....	0,146	116,6	117,0	108,8	105,7	114,6
Paille + urée + 1/2 cérélose + 1/2 alcool.....	0,146	100,3	103,0	97,8	96,3	100,3
Foin de luzerne + alcool.....	0,292	119,8	107,2	107,8	130,1	82,3
Foin de luzerne + alcool.....	0,438	110,7	107,4	104,6	119,3	87,8
Foin de luzerne + alcool.....	0,548	95,0	98,9	110,0	112,1	106,9
Foin de luzerne + alcool.....	0,803	84,4	93,9	106,1	121,1	89,4
Foin de luzerne + alcool.....	1,095	75,5	86,2	108,9	115,5	102,7

(a) Moyenne de 2 essais corrigés par le jus de panse incubé seul.

(b) Somme de la cellulose et des glucides réducteurs dosés par hydrolyse.

TABLEAU 4

Teneurs en N bactérien et ammoniacal d'un milieu riche en N non protéique (Paille + urée) après 24 et 48 h d'incubation en rumen artificiel

Substrat	N Bactérien mg p. 100 ml		N Ammoniacal mg p. 100 ml	
	24 h	48 h	24 h	48 h
Paille + urée.....	14,3	30,5	46,4	39,0
Paille + urée + alcool.....	10,2	29,5	91,0	41,5
Paille + urée + amidon (a).....	18,6	39,9	42,9	33,0
Paille + urée + 1/2 amidon (b) + 1/2 alcool.....	14,6	34,8	48,1	35,0
Paille + urée + cérélose (a).....	30,9	31,6	28,0	41,0
Paille + urée + 1/2 cérélose + 1/2 alcool	23,1	29,3	42,6	44,0
Témoin inoculum.....	15,3	18,2	8,4	14,5

(a) Une quantité isocalorique d'amidon ou de cérélose a été introduite dans le milieu à la place de l'éthanol.

(b) La moitié seulement de l'éthanol a été remplacée par une quantité isocalorique d'amidon de pommes de terre ou de cérélose.

En présence de foin de luzerne, l'alcool, quelle qu'en soit la dose, stimule la formation d'acides gras volatils dans les incubations de 48 h. Cette augmentation porte essentiellement sur l'acide acétique (tabl. 3).

c) Protéinogenèse bactérienne

La comparaison de l'influence de 3 sources d'énergie supposées immédiatement disponibles : cérélose, amidon et éthanol sur la faculté des bactéries du rumen à convertir l'azote uréique en protéines microbiennes, avec un substrat de paille de blé, n'est pas en faveur de l'éthanol. Quand l'alcool est ajouté au milieu, on trouve (tabl. 4) après 24 heures d'incubation, la plus grande quantité d'ammoniaque et la plus faible proportion d'azote bactérien. Ce dernier résultat (10,2 mg de N bactérien pour 100 ml de milieu) est même plus bas que celui du témoin inoculum seul (15,3 mg).

Après 48 h la présence d'alcool n'améliore pas la protéinogenèse bactérienne (29,5 mg contre 30,5 mg de N bactérien pour 100 ml de milieu pour le témoin : paille + urée) alors que l'apport d'amidon est très bénéfique (39,9 mg). On ne trouve plus trace d'urée dans aucun des milieux et les quantités d'azote ammoniacal retrouvées après cette incubation sont d'autant plus élevées que les résultats de N bactérien sont plus faibles. Ceci corrobore bien le fait que l'alcool ne stimule pas la protéinogenèse, bien au contraire lorsqu'il remplace la moitié du cérélose ou de l'amidon (tabl. 4), il déprime l'action bienfaisante de ces métabolites.

DISCUSSION

Dans nos expériences, la dégradation de l'éthanol est nulle en présence de liquide de panse de mouton introduit seul dans le rumen artificiel. Quand on y ajoute du foin de luzerne, l'oxydation de l'alcool est très lente à s'instaurer : nulle après 3 h, 6 p 100 après 8 h, elle atteint seulement 23 p. 100 après 24 h. Nos résultats sont en accord avec ceux d'EMERY *et al.* (1959) qui ne trouvent pas d'attaque de l'éthanol après 4 h, à la dose de 500 mg p. 100 ml de milieu, avec un substrat de maïs et de foin de luzerne et un inoculum provenant du rumen d'une vache. La disparition de l'alcool ne paraît pas plus rapide avec un inoculum provenant de la panse d'un mouton qui a reçu quotidiennement 44 g d'alcool pendant 45 jours. Ceci tend à prouver qu'après une longue accoutumance de l'animal, la micropopulation du rumen n'est pas plus capable d'utiliser promptement l'éthanol.

Alors que dans le sol (STEVENSON et KATZNELSON, 1958), l'éthanol est oxydé complètement et sans période de latence, il n'en est pas de même en rumen artificiel. Nos résultats *in vitro* laissent supposer qu'*in vivo* les microorganismes du rumen ne pourraient utiliser l'alcool que si celui-ci demeurerait pendant un temps relativement long dans cet organe (8 h à 24 h).

Nos expériences montrent qu'en rumen artificiel, l'introduction d'éthanol stimule l'activité métabolique des microorganismes, puisque nous avons observé un accroissement de la dégradation des glucides et de la production d'acides gras

volatils, en particulier d'acide acétique. Mais elles ne permettent pas de dire que l'augmentation de ce dernier, provient en partie de l'alcool disparu. Cependant MOOMAW (1963), ayant employé des méthodes manométriques et de l'éthanol — 1 — C¹⁴ a constaté tout récemment que ce métabolite incubé avec du contenu de rumen est très faiblement dégradé et que la quantité catabolisée est retrouvée presque entièrement sous forme d'acide acétique marqué.

Dans un milieu pauvre en N protéique, l'alcool paraît, contrairement à l'amidon et au cérélose, déprimer la protéinogénèse bactérienne qui a lieu à partir de l'ammoniaque provenant de l'urée.

Le problème se pose maintenant de savoir si, *in vivo*, le comportement du ruminant envers l'éthanol est semblable à celui que nous avons constaté en rumen artificiel. Pour répondre à cette question, une expérience sur animaux porteurs de fistules des réservoirs gastriques a été entreprise.

Reçu pour publication en janvier 1964.

SUMMARY

FATE OF ETHANOL IN THE RUMEN OF THE SHEEP — STUDY IN ARTIFICIAL RUMEN

Some foodstuffs can contain preformed ethanol, such as air fermented chopped fodder beets, apple and apple residue silages. A study was undertaken in artificial rumen in the purpose to find out if ethylalcohol is metabolised directly by rumen microorganisms.

The concentrations of ethanol introduced in to the vessels are given in table 2. It was incubated with different substrates isolated or mixed : sheep rumen liquor, corn straw, starch, cerelese, urea, alfalfa hay (table 1).

It has been shown that the rumen micropopulation appears to possess no enzym allowing rapid alcohol degradation (fig. 1). If alcohol remains for a long time in the artificial rumen (24 to 48 h), it is only partly oxydised by the microorganisms (fig. 1), but it does not seem to represent for them a caloric source, as do starch or cerelese (table 3).

The lower is the concentration of alcohol in the artificial rumen, the bigger is its degradation percentage (table 2).

The presence of ethanol in the rumen has, according to our results, a stimulating effect on the metabolic activity of the rumen microorganisms : an increase of the volatile fatty acids, particularly of acetic acid, was registered *in vitro* (table 3). The behaviour of the microorganisms is the same, after sheep has been accustomed to daily alcohol ingestion during a period of 45 days.

In a poor protein nitrogen medium, alcohol seems, opposite to starch and cerelese, to decrease bacterial protein formation occurring from urea nitrogen (table 4).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- CONWAY E. J., 1950. *Microdiffusion analysis and volumetric error*. 95-98, 3^e éd. Crossby-London.
- DONTCHEFF I., 1955. Mise en évidence au moyen de l'éthanol de deux grandes catégories d'oxydations respiratoires. Thèse Doctorat ès Sciences Strasbourg 1953 paru dans *Arch. Sci. Physiol.*, **9**.
- FAUCONNEAU G., FRANÇOIS A. C., LEROY A. M., ZELTER S. Z., 1953. Processus digestifs des ruminants. I. Étude *in vitro* de la digestion du foin de luzerne. *Ann. Zootech.*, **2**, 275-284.
- FRIEDMANN T. E., 1938. Determination of alcohol and acids. *J. Biol. Chem. Vol.*, 123-165.
- HUBBERT F., CHENG E., BURROUGH W., 1958. Mineral requirements of rumen microorganisms for cellulose digestion *in vitro*. *J. Anim. Sci.*, **17**, 559-568.
- JAMES A. T., MARTIN J. P., 1952. Gas liquid chromatography. *Biochem. J.*, **150**, 679-690.

- KURSCHNER, HOFFER A., 1929. Neue methods für die Bestimmung von Holzcellulose. *Tech. Chem. Papier. Zelt. Fab.*, **26**, 125-139.
- LE BRETON E., 1937. Signification physiologique et biochimique de l'oxydation de l'alcool éthylique dans l'organisme. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **19**, 17-43.
- LE BRETON E., TRÉMOLIÈRES J., 1957. L'utilisation de l'alcool par l'homme. Aspect énergétique, physiologique et nutritionnel. *Ann. Rech. Méd.*, **1**, 81-102.
- DE LEON R. P., CREASER E. H., 1958. The utilization of ethanol for biosynthesis in *Escherichia Coli*. *Can. J. Biochem. Physiol.*, **36**, 839.
- LEROY A. M., ZELTER S. Z., 1955. Recherches sur l'efficacité alimentaire des marcs de pommes fermiers IV. Effet de l'ingestion de doses croissantes d'ensilage de marcs sur le niveau des sécrétions lactées et lipidiques de la vache. *Ann. Zootech.*, **4**, 69-92.
- LEROY F., 1958 a). Utilisation de l'alcool au niveau du rumen. *Ann. Nutr.*, **12**, 283-287.
- LEROY F., 1961 b). Métabolisme de l'alcool éthylique au niveau du rumen. *Ann. Nutr.*, **15**, 280-287.
- MAC DOUGALL E. J., 1948. Studies on ruminant saliva. I. The composition and output of sheep's saliva. *Biochem. J.*, **43**, 99-109.
- MOOMAW C. R., HUNGATE R. E., 1963. Ethanol conversion in the bovine rumen. *J. Bacteriol.*, **85**, 721-722.
- NELSON N., 1944. Photometric adaptation of the Somogyi methods for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.*, 153-373.
- NICLOUX M., 1931. Recherches sur l'alcool éthylique. I. Microdosage. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **13**, 857-876.
- O. M. S., 1954. Recommandation du comité des besoins en calories de l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture. *Série rapports techniques*, n° 84.
- SCHRAM G., AINES P. D., 1959. Caloric determination of urease activity in soybean meals. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, **36**, 1-4.
- STEVENSON I. L., KATZNELSON J., 1958. The oxydation of ethanol and acetate in soil. *Canad. J. Microbiol.*, **4**, 73-80.
- ZELTER S. Z., LEROY F., 1958. Azote uréique et activité bactérienne *in vitro* au niveau du rumen. I. Effet de l'urée sur la digestion des glucides d'une paille de blé et d'une farine de luzerne déshydratée. *Ann. Zootech.*, **7**, 173-193.
-