

COMPORTEMENT DES SPORES DE BACTÉRIES ANAÉROBIES FERMENTANT LE LACTATE DANS LE TRACTUS DIGESTIF DU RUMINANT

I. — VARIATIONS AVEC LE RÉGIME DE LA CONCENTRATION EN SPORES DANS LE RUMEN ET LES FÈCES

Ph. GOUET¹ et M. CONTREPOIS¹

avec la collaboration technique de Marie-France DORBE et J.-P. DELPORTE

*Laboratoire de Recherches sur la Conservation et l'Efficacité des Aliments,
Centre national de Recherches zootechniques, I. N. R. A.,
78 - Jouy-en-Josas*

RÉSUMÉ

On s'est proposé de suivre l'évolution du nombre de spores des bactéries fermentant le lactate dans le rumen et les fèces de deux bœufs munis d'une fistule du rumen et recevant des régimes à base de foin (R₁), d'herbe (R₂) ou d'ensilage (R₃) et d'établir des bilans entre les quantités de spores ingérées avec l'aliment puis excrétées avec les fèces. Pour chaque régime, quelques souches sont isolées des aliments, du jus de rumen et des fèces, puis identifiées.

Nos résultats montrent que la concentration en spores dans les fèces est généralement faible (10⁴/g) lorsque les animaux consomment du foin ou de l'herbe et que les espèces dominantes isolées ne fermentent pas le lactate.

Lorsque les animaux consomment de l'ensilage (10⁵-10⁶ spores/g) la concentration en spores dans le jus de rumen s'accroît de 10²-10³ spores/ml à 10⁶/ml en quelques heures alors que dans les fèces, elle passe de 10²-10³ à 10⁵-10⁶ spores/g. Dès que la consommation cesse, le nombre de spores diminue dans les fèces pour revenir au taux initial après une centaine d'heures. Les deux bilans effectués traduisent une légère augmentation du nombre de spores au cours du transit (2 fois plus dans un cas, 7 fois plus dans l'autre). La précision des techniques utilisées est discutée.

On conclut que, chez le ruminant sain, le degré de contamination des fèces par des spores de bactéries anaérobies est étroitement lié à celui de l'aliment et que cette microflore ne s'implante pas dans le tractus digestif. Enfin, l'espèce *C. tyrobutyricum* domine parmi les espèces anaérobies sporulées fermentant le lactate isolées de l'ensilage, du jus de rumen et des fèces des animaux consommant cet aliment.

(¹) Adresse actuelle : Laboratoire de Microbiologie, Centre de Recherches zootechniques et vétérinaires, 63 - Theix, par Saint-Genès-Champanelle.

INTRODUCTION

L'ensilage est connu pour être à l'origine du gonflement tardif des fromages du type gruyère. On sait aussi que ce défaut plus ou moins accentué selon les cas est provoqué par le métabolisme de bactéries anaérobies fermentant le lactate et identifiées aux espèces *C. butyricum* et surtout *C. tyrobutyricum*. Ces bactéries se multiplient activement dans le gruyère en produisant de l'acide butyrique et d'importantes quantités d'hydrogène et de gaz carbonique qui déforment la pâte et déprécient le fromage. Elles sont également responsables du catabolisme de l'acide lactique en acide butyrique dans les ensilages de mauvaise qualité (ZELTER, 1960) où elles prolifèrent abondamment (10^8 spores/g) ; elles ne sont d'ailleurs pas totalement absentes dans les ensilages de bonne qualité (10^1 à 10^3 spores/g), (J.-L. BERGÈRE, Ph. GOUET, J. HERMIER *et al.*, 1968).

Les spores de ces bactéries ingérées avec l'ensilage sont excrétées dans les fèces qui polluent la mamelle puis le lait au moment de la traite (S. NILSSON, P.-E. NILSSON, ABRAHAMSON, 1956). Pour des conditions d'hygiène identiques, le nombre de spores trouvées dans le lait varie dans le même sens que la qualité bactériologique des ensilages consommés par les animaux (ORTH, G. KOCH, 1961, THOME, SWARTLING, 1953).

Malgré ce rôle déterminant des fèces, on ignore encore si leur concentration en spores est le seul reflet d'un transit passif des spores de *Clostridium* ingérées avec l'ensilage, ou au contraire le résultat d'une multiplication et d'une sporulation dans le tractus digestif. Alors que pour ANKERSMIT (1905), KURSTEINER (1926) RICHARD, HEINZL (1946), il n'y a pas de prolifération, DELLA TORRE (1926), SCHEUNERT, SCHIEBLICH (1927) concluent à l'opposé. Pour notre part (GOUET, non publié), nous avons souvent observé une concentration en spores environ dix fois plus grande dans les fèces que dans les ensilages ingérés. Il est difficile de comparer ces résultats contradictoires compte tenu de la diversité de la qualité des ensilages employés dans ces expériences et de l'insuffisance des techniques et des milieux de dénombrement utilisés. De plus, dans ces essais, seules des concentrations en spores dans les ensilages et les fèces ont été mesurées, sans tenir compte de la digestibilité et de la vitesse du transit.

Cette étude se propose dans un premier temps de suivre l'évolution du nombre de spores de ces populations bactériennes fermentant le lactate dans le rumen et les fèces des bovins recevant des régimes à base d'herbe, foin, ou ensilage et d'établir des bilans entre les quantités de spores ingérées avec l'aliment puis excrétées dans les fèces. Dans un deuxième temps, des identifications de bactéries sporulées fermentant le lactate (lactate +) sont faites dans des ensilages, du jus de rumen et des fèces.

PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL

Deux bœufs de race *Normande*, âgés de 5 ans (n° 893 et 899) porteurs d'une fistule de rumen sont maintenus en cage individuelle à bilan pour mesurer les quantités d'aliments ingérés et la cinétique de leur excrétion fécale.

Régimes

Les trois régimes suivants sont expérimentés :

- R₁ = foin à volonté.
- R₂ = herbe (25 kg) + foin (3 kg).
- R₃ = ensilage de luzerne (20 kg) + foin (3 kg).

Pour chaque régime, on institue une période d'accoutumance de 10 jours au moins. Dans le cas du régime R₃ (ensilage) on distribue à l'animal au cours de cette période, de l'ensilage chauffé pendant 30 mn à 130°C. Ce traitement supprime l'apport de spores par l'aliment avant la période expérimentale.

Prélèvements

1° Le jus du rumen est prélevé à travers la fistule à raison de 100 ml par prise au moyen d'une seringue raccordée à une crépine.

2° Chaque récolte de fèces est pesée, puis malaxée pendant 10 mn. Des échantillons de 25 à 30 g sont prélevés dans des ballons de 500 ml stériles.

3° Sur les aliments on prélève pour le foin 10 g environ pour une ration journalière de 10 kg et 30 g dans les cas de l'herbe et de l'ensilage. Pour améliorer la précision des dénombrements de spores dans l'ensilage, deux échantillons différents sont analysés pour chaque repas.

Tous les échantillons frais qui ne peuvent être analysés immédiatement sont conservés à — 20°C.

Dénombrement des spores

Avec les régimes R₁ et R₂ on compare seulement les concentrations en spores entre aliments, jus de rumen et fèces prélevées au niveau du rectum.

Avec le régime R₃ on établit un bilan entre spores ingérées et excrétées.

Dans le régime R₁, on dénombre les microflores anaérobies sporulées totales et lactate +, et dans le régime R₂, la microflore anaérobie sporulée totale seulement. Pour le régime ensilage R₃, les mesures portent uniquement sur la microflore anaérobie sporulée lactate + qui est dominante.

La microflore anaérobie sporulée totale est dénombrée sur milieu liquide RCM à pH 7,3 (HIRSCH, GRINSTED, 1954) et celle qui fermente le lactate sur milieu liquide de ROSENBERGER (1951).

Trente grammes de fèces, de fourrages (verts ou conservés) ou 10 g de foin sont agités mécaniquement pendant 10 mn dans 9 fois leur poids d'eau physiologique stérile ; le jus de rumen est dilué de la même façon. Ces échantillons sont ensuite dilués selon une gamme décimale.

Les tubes de culture, une fois inoculés, sont entièrement immergés pendant 10 mn dans un bain-marie à 75°C de façon à sélectionner les spores et activer leur germination. Un bouchon de paraffine assure l'anaérobiose. Les dénombrements sont effectués selon la méthode du nombre le plus probable (MPN) à raison de 5 tubes par dilution. Les tables utilisées pour la détermination du MPN sont celles de MAC CRADY (1918). Les résultats sont rapportés au millilitre pour le jus de rumen et en grammes de poids brut pour les aliments et les fèces.

Isolements et Identifications

Quelques souches d'anaérobies sporulées sont identifiées dans les fèces des animaux soumis au régime R₁. Avec le régime R₃ les souches identiques proviennent de l'ensilage, du jus de rumen et des fèces. L'isolement des souches anaérobies présumées lactate + se fait après 6 repiquages successifs sur milieu au lactate (ROSENBERGER, 1951). Le premier inoculum a pour origine un tube nettement positif de la dernière dilution du dénombrement provenant d'un aliment, de jus de rumen ou d'un excrément. Après le 6^e repiquage, les bactéries sont disséminées sur milieu VL glucosé en tubes de Veillon. Les critères d'identification sont ceux préconisés par BEERENS, CASTEL PUT (1962). Le caractère protéolytique est observé par liquéfaction de la gélatine dans le milieu de ROSENBERGER (1951). La métabolisation de l'acide lactique est notée par l'alcalinisation du milieu au lactate (ROSENBERGER, 1951).

RÉSULTATS

Les régimes R₁ et R₂ sont des régimes classiques qui constituent ici, seulement des éléments de référence permettant de souligner l'effet de l'ensilage.

I. — *Effet du foin*

La concentration en spores du foin distribué dans le régime R_1 est irrégulière durant les dix-huit premiers jours (fig. 1 a), où elle se situe entre 10^2 - 10^4 /g (microflore anaérobie sporulée totale) avec un pic dépassant 10^5 . Du 18^e au 38^e jour, cette concentration est plus régulière, plus faible et ne varie qu'entre 10^2 et 10^3 . Dans les fèces, elle oscille entre $5 \cdot 10^2$ et $5 \cdot 10^4$ (totale) et entre 10^2 et 10^3 (lactate +). Elle est supérieure à celle du foin sauf du 12^e au 18^e jour où elle est inférieure et à partir du 36^e jour où elle est semblable.

Il n'existe pas de relation entre la microflore anaérobie sporulée totale et la microflore lactate +. Dans les fèces, ce rapport peut aller de 1 (29^e jour) à plus de 100 (23^e jour). Il en est sensiblement de même pour la microflore du foin.

Une dizaine de souches de bactéries anaérobies sporulées isolées de fèces d'animaux nourris au foin ont toutes un caractère protéolytique et sont apparentées à l'espèce *C. sporogenes*.

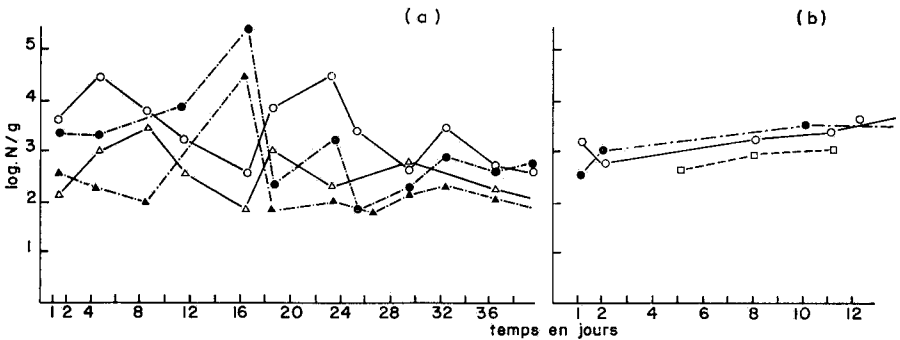


FIG. 1. — Nombre N de spores trouvées dans l'herbe, le foin et les fèces au cours de la distribution des régimes R_1 (a) et R_2 (b)

- ● Microflore anaérobie sporulée totale dans le foin
- ▲ ▲ Microflore anaérobie sporulée Lactate + dans le foin
- △ △ Microflore anaérobie sporulée Lactate + dans les fèces
- ○ Microflore anaérobie sporulée totale dans les fèces
- □ Microflore anaérobie sporulée totale dans l'herbe.

2. — *Effet de l'herbe*

Dans le régime R_2 , la concentration en spores de l'herbe (microflore anaérobie totale) ne dépasse pas 10^3 /g et celle du foin $5 \cdot 10^3$ /g (fig. 1 b). Dans les fèces, le nombre de spores est sensiblement le même qu'avec le régime R_1 et les variations entre les prélèvements plus réduites.

3. — *Effet de l'ensilage*

La concentration en bactéries anaérobies sporulées lactate + de l'ensilage est irrégulière et varie de 10^3 à 10^6 /g. Deux échantillons prélevés sur une même ration donnent des nombres dont le rapport va de 1 à 6. Cette dispersion ne suffit toutefois pas à masquer l'effet de l'ensilage qui apporte selon les repas 10 à 10 000 fois plus de

spores que le foin de la ration (10^2 à 10^3 spores/g). Les bilans montrent en effet que le foin apporte approximativement 2×10^6 spores au bœuf 899 et 16×10^6 au bœuf 893 contre $5,4 \times 10^9$ et $12,2 \times 10^9$ respectivement avec l'ensilage.

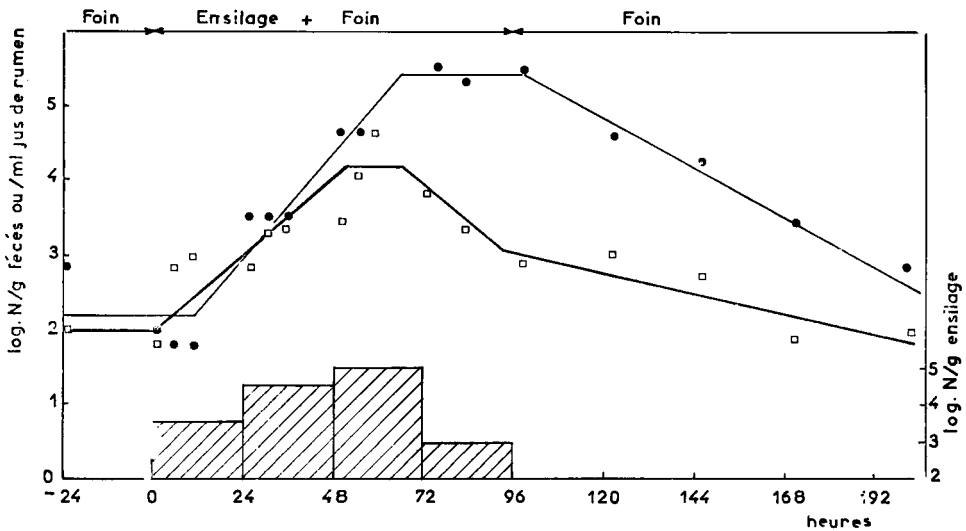


FIG. 2. — Influence de l'introduction d'ensilage dans le régime (R₃) sur la concentration en spores Lactate + dans le jus de rumen et les fèces (Bœuf 893)

- Nombre de spores dans l'ensilage
 □—□ Nombre de spores dans le jus de rumen
 ●—● Nombre de spores dans les fèces

Dès l'ingestion de l'ensilage, on note une rapide et nette augmentation de la concentration en spores dans le jus de rumen (fig. 2 et 3). Vingt heures environ après le premier repas, le nombre de spores s'accroît aussi dans les fèces et se maintient plus élevé que dans le jus de rumen autant que dure la consommation d'ensilage.

Avec le bœuf 893 (fig. 2) la concentration en spores dans les fèces s'élève au cours des trois premiers jours, suivant en cela les taux croissants dans l'ensilage. A partir du 4^e repas qui est nettement moins contaminé que les précédents, le niveau commence à diminuer dans les fèces.

Avec le bœuf 899 (fig. 3) la concentration dans les fèces suit aussi les variations en paliers de l'ensilage : aux deux premiers repas d'ensilage à niveau de spores voisins (10^3 - 10^4 /g) correspondent 10^4 - 10^5 spores/g de fèces et le troisième repas, cent fois plus riche en spores (10^6 /g) entraîne 5×10^6 spores/g dans les fèces.

Dans les deux cas, dès que la distribution d'ensilage cesse, la concentration en spores dans les fèces diminue et retrouve son niveau initial quatre jours environ après l'arrêt de la consommation. Le bilan des spores excrétées/ingérées est positif dans les deux mesures : 2 fois plus pour le bœuf 899 et 7 fois plus pour le bœuf 893.

Identification des anaérobies sporulées isolées des ensilages, rumen, fèces.

Le tableau 1 groupe les caractères principaux des bactéries anaérobies sporulées isolées des ensilages puis du rumen et des fèces. Dans le rumen et les fèces seule l'espèce *C. tyrobutyricum* a été trouvée alors que deux souches de *C. butyricum* l'ont

été dans l'ensilage. Les caractères biochimiques des *C. tyrobutyricum* sont identiques à ceux observés par BRYANT et BURKEY (1956) pour des souches isolées de l'ensilage, à l'exception de la réduction des nitrates, qui est effective pour la majorité de nos souches.

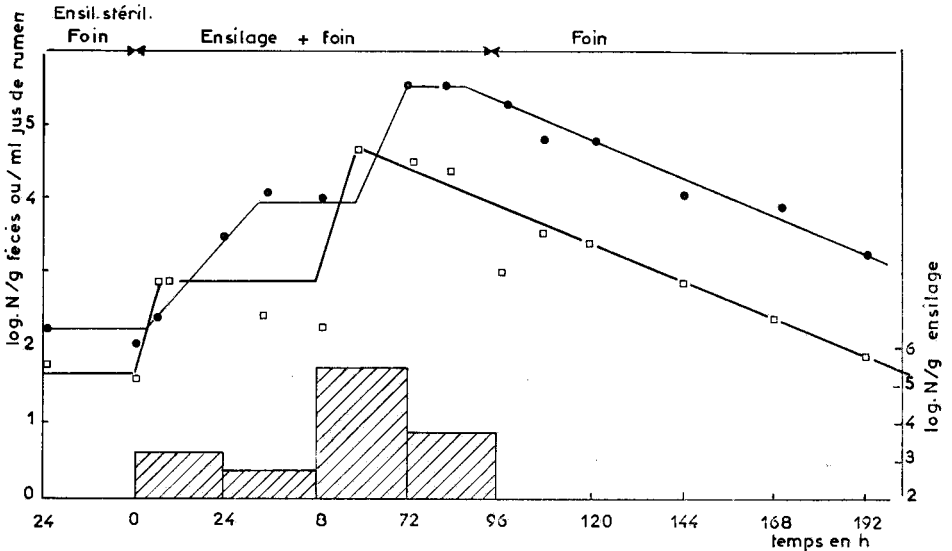


FIG. 3. — Influence de l'introduction d'ensilage dans le régime (R_3) sur la concentration en spores Lactate + dans le jus de rumen et les fèces (Bœuf 899)

- ▨ Nombre de spores dans l'ensilage
- Nombre de spores dans le jus de rumen
- Nombre de spores dans les fèces

Le glucose et le fructose sont toujours fermentés et le mannitol le plus souvent. Quelques souches utilisent le D-xylose ou L-arabinose.

Dans l'ensilage et les fèces d'animaux qui en ont consommé, les *Clostridium* protéolytiques sont souvent en nombre aussi important que *C. tyrobutyricum*; la croissance rapide des premiers ne permet pas d'obtenir des colonies isolées de *C. tyrobutyricum* en milieu gélosé. Malgré 6 repiquages successifs sur milieu au lactate effectués à partir d'un tube positif de la dernière dilution, il n'a pas toujours été possible d'éliminer totalement les espèces protéolytiques.

DISCUSSION

La présence permanente dans le tube digestif du ruminant sain de différentes espèces de *Clostridium* est connue (BUTTIAUX, 1958). Celles-ci constituent généralement une flore sous-dominante dont on ignore si elle est établie ou si elle reflète seulement le transit des spores apportées en quantité plus ou moins importante par les aliments.

Dans nos expériences, la concentration en spores de *Clostridium* dans les fèces

TABLEAU I
 Caractères d'identification des souches isolées de l'ensilage,
 du jus de rumen et des fèces chez les bœufs nourris au régime R₃

Origine	Nombre de souches	Lait Cystéine	Gélatine	H ₂ S	Glucose	Saccharose	Lactose	Saline	Glycérol	Mannitol	Amidon	Fructose	L-Arabinose	D-Xylose	Nitrates	Utilisation du Lactate	Espèce
Ensilage Fèces — Jus de rumen	13	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>C. sporogenes</i>
	106	-	-	-	+	2/106	-	-	-	78/106	-	+	5/42	7/42	95/106	+	<i>C. tyrobutyricum</i>
	2	Coagulé	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	<i>C. butyricum</i>

+ = Toutes les souches positives — = Toutes les souches négatives.
 Les chiffres indiquent le nombre de souches positives par rapport au nombre de souches testées.

est généralement faible ($10^3/g$) lorsque les animaux consomment du foin. Toutefois, l'ingestion de foin récolté par temps humide et souillé par de la terre entraînerait vraisemblablement une concentration comparable à celle observée avec des ensilages de qualité médiocre ($10^6/g$). On notera cependant que les espèces bactériennes sporulées qui dominent dans les fourrages secs ne fermentent pas le lactate ; elles ne risquent donc pas de provoquer d'accident dans les fromages de type gruyère, contrairement à celles qui s'implantent dans l'ensilage (BERGÈRE *et al.*, 1968).

Quand les animaux consomment des ensilages contenant 10^4 à 10^6 spores/g, ce qui est le cas le plus courant, les bilans, traduisent, après transit, une faible augmentation des espèces lactate +. Mais il faut tenir compte de la précision limitée de ces résultats, liée à celle des techniques de dénombrement (intervalle de confiance 0,26 à 2,6, selon TAYLOR, 1962) et à la difficulté d'effectuer un échantillonnage représentatif de l'ensilage consommé car on peut observer des variations de 1 à 500 dans le degré de contamination des lots d'ensilage extraits de secteurs voisins d'un silo. Cependant, le double échantillonnage d'une même ration limite les variations entre 1 et 6 ce qui permet de supposer que la précision obtenue est de cet ordre. Quoi qu'il en soit le fait d'enregistrer dans les deux cas des bilans positifs n'implique pas nécessairement une implantation dans le tractus digestif car lorsque l'ensilage est supprimé, les spores disparaissent à une vitesse correspondant sensiblement à celle de microparticules inertes (CONTREPOIS, GOUET, 1969).

Compte tenu des résultats précédents, on peut penser que les divergences enregistrées entre différents auteurs (ANKERSMIT, 1905 ; KURSTEINER, STAUB, 1921 ; Richard HEINZL, 1946 ; DALLA TORRE, SCHEUNERT, SCHIEBLICH, 1927) sur la présence ou l'absence de multiplication du nombre de spores de *Clostridium* fermentant le lactate, au cours du transit digestif, sont liées aux qualités extrêmement hétérogènes et d'ailleurs mal précisées des ensilages expérimentés par ces chercheurs. C'est ainsi que l'ingestion d'un ensilage de très bonne qualité (10^3 spores/g) ne pourrait élever la concentration en spores dans les fèces au-dessus de son seuil habituel (10^3 à 10^4 pour un régime de foin), que s'il y avait une multiplication d'au moins 100 fois, ce qui est peu probable.

Seuls, l'emploi de milieux très sélectifs dont on ne dispose pas actuellement et l'identification d'un plus grand nombre de souches pourraient indiquer des modifications dans la répartition des espèces bactériennes dans les différentes parties du tube digestif.

Par contre, avec un ensilage fortement contaminé (10^6 spores/g) l'accroissement du nombre de spores dans les fèces apparaît très nettement et peut faire croire à une multiplication en l'absence de bilan. Le seuil de $10^4/g$ est rapidement dépassé par les espèces fermentant le lactate comme *C. tyrobutyricum* mais aussi par des espèces protéolytiques.

Bien que la signification des bilans positifs obtenus dans nos conditions expérimentales et avec les techniques de dénombrement précédemment décrites reste dans le domaine d'incertitude de nos mesures, trois faits sont cependant certains :

1° Chez le ruminant sain, le degré de contamination des fèces par des anaérobies sporulés est étroitement lié à celui de l'aliment et l'on retrouve au moins autant de spores excrétées que de spores ingérées.

2° Cette microflore ne s'implante pas dans le tube digestif du ruminant ou du moins, si des cellules végétatives apparaissent, elles ne sporulent pas ou très peu.

3° L'espèce *C. tyrobutyricum* domine largement parmi les bactéries anaérobies sporulées lactate + isolées de l'ensilage, du jus de rumen et des fèces des animaux consommant cet aliment.

Reçu pour publication en octobre 1970.

SUMMARY

BEHAVIOUR OF THE LACTATE-FERMENTING SPORES

OF THE ANAEROBIC BACTERIA IN THE RUMINANT DIGESTIVE TRACT.

I. — VARIATIONS OF THE CONCENTRATION OF SPORES ACCORDING TO DIETS

The purpose of the present trial was to study the change in the number of spores of the lactate-fermenting bacteria in the rumen and faeces of two steers with rumen fistula which received diets containing hay (R_1), grass (R_2) or silage (R_3) and to establish the balances between the amounts of spores ingested with the feed and excreted with the faeces. For each diet, some strains were isolated from the feed, the rumen liquor and the faeces and then identified.

Our results show that generally the concentration of spores in the faeces was low ($10^4/g$) when the animals were fed hay or grass and that the dominant species isolated were not lactate-fermenting.

When the animals were fed silage (10^5-10^6 spores/g), the concentration of spores in the rumen liquor increased after few hours from 10^2-10^3 spores/ml to $10^6/ml$, whereas the number of spores in the faeces increased from 10^2-10^3 to $10^5-10^6/g$. As soon as the food intake ceased, the number of spores in the faeces decreased and returned to the initial rate after about hundred hours. The two balances established showed a slight increase of the number of spores during their transit (twice as much in one case, and 7 times as much in the other case). The accuracy of the techniques used is discussed in the paper.

It may be concluded that, in healthy ruminants, the degree of contamination of the faeces by the spores of anaerobic bacteria is closely related to that of the feed and that this microflora does not settle in the digestive tract. At last, *C. tyrobutyricum* is a dominant species among the lactate-fermenting sporeforming anaerobes isolated from the silage, rumen liquor and faeces of the animals eating this feed.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ANKERSMIT P., 1905. Untersuchungen über die Bakterien im Verdauungskanal des Rindes. *Inaug. Dissert.*, Lausanne.
- BEERENS H., CASTEL M. M., PUT H. M. C., 1962. Caractères d'identification de quelques *Clostridium* du groupe *butyricum*. *Ann. Inst. Pasteur Lille*, **103**, 117-121.
- BERGÈRE J.-L., GOUET Ph., HERMIER J., MOCQUOT G., 1968. Les *Clostridium* du groupe butyrique dans les produits laitiers. *Ann. Inst. Pasteur, Lille*, **19**, 41-54.
- BRYANT M. P., BURKEY L. A., 1956. The Characteristics of lactate-fermenting sporeforming anaerobes from silage. *J. Bact.*, **71**, 43-46.
- WILSSENS A., BUTTIAUX R. Les bactéries de la flore fécale de la vache saine. *Ann. Inst. Pasteur*, **94**, 332-339.
- CONTREPOIS M., GOUET Ph., 1969. Utilisation d'une technique microbiologique pour la mesure de la vitesse de transit des microparticules dans le tractus digestif des ruminants. *C. R. Ac. Sci., Paris*, **268**, 1757-1759.
- DELLA TORRE G., 1926. La microflora dei foraggi insilati. *Zbl. Bakt.* **11**, Abt 66, 393-395.
- KURSTEINER J., 1926. Emmentaler-Qualitätsproduktion und das kaiservierte. Grünfutter (Silofutter). *Schweiz Land. Monatsch.*, 1-3.
- HIRSCH A., GRINSTED E., 1954. Methods for the growth and enumeration of anaerobic spore formers from cheese, with observations on the effect of nisin. *J. Dairy Res.*, **21**, 101-110.
- MAC CRADY M. H., 1918. Tables for rapid interpretations of fermentation tube results. *Canad. publ. Hlth. J.*, **9**, 201-210.

- NILSSON G., NILSSON P. E., ABRAHAM A., 1956. Origin of spores of anaerobic microorganisms in milk. The influence of feeding practice and hygienic arrangements. *Arch. Mikrobiol.*, **25**, 1-15.
- ORTH A., KOCH G., 1961. Über den Einfluss der Tierhaltung auf die Milchqualität bei Silagefütterung. *Milchwissenschaft*, **16**, 177-184.
- RICHARD O., HEINZL O., 1946. Untersuchungen über das Verhalten des beweglichen Bittersäurebazillus (*Clostridium butyricum*) in Darmstraktus des Rindes. *Landw. Jahrb Schweiz*, **60**, 701-720.
- ROSENBERGER R. F., 1951. The development of methods for the study of obligate anaerobes in silage. *Proc. Soc. Appl. Bact.*, **14**, 161-164.
- SCHEUNERT A., SCHIEBLICH M., 1927. Einfluss des Mikroorganismen auf die Vorgänge in Verdauungstraktus bei Herbivoren. *Hand. of normalen und patholog. Physiol.* 985-990.
- TAYLOR J., 1962. The estimation of numbers of bacteria by tenfold dilution series. *App. Bact.*, **25**, 54-61.
- THOME K. E., SWARTLING P., 1953. Influence of silage quality on cheese-milk and cheese quality. *XIII^e Cong. Int. Laiterie*, La Haye, **2**, 69-75.
- ZELTER S. Z., 1960. Fermentative behaviour of lucerne ensiled by different methods. *Proc. 8th Int Grassl. Congress.*, Paper 3 B/5.
-