

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

II. — ÉVOLUTION DU NOMBRE DE SPORES DE *C. TYROBUTYRICUM*
INTRODUITES AU NIVEAU DU RUMEN,
AU COURS DU TRANSIT DIGESTIF CHEZ LE RUMINANT

M. CONTREPOIS (1), Ph. GOUET (1) et D. SAUVANT
avec la collaboration technique de Marie-France DORBE, J.-P. DELPORTE
et Nadine RROU-MOUHOUS

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

Dans une première partie on a montré que le nombre de spores de *C. tyrobutyricum* ingérées par les ruminants qui consomment de l'ensilage n'augmente ni ne diminue au cours du transit digestif. Dans le présent travail, des spores de *C. tyrobutyricum* sont introduites en nombre connu dans le rumen de bœufs fistulés qui reçoivent un régime à base d'ensilage stérilisé. La vitesse d'excrétion de ces spores est mesurée par comparaison à celle d'un traceur bactérien (spores de *Bacillus subtilis*, thermophile, aérobie strict). L'évolution du nombre de spores est mesurée en présence de régimes différents :

Foin = R₁, Ensilage de luzerne + foin = R₂,
Ensilage de luzerne + foin + concentré = R₃,
Ensilage de maïs + foin = R₄.

In vitro, on étudie la germination des spores dans du jus de rumen stérilisé ainsi que l'action des enzymes digestives (pepsine, trypsin) sur cette germination.

Quels que soient le régime, l'animal, le nombre d'injections dans le rumen et l'espèce bactérienne injectée, les bilans spores ingérées/spores excrétées sont toujours négatifs. Les taux de spores de *Bacillus* retrouvées (65p. 100) sont significativement supérieurs à ceux de *Clostridium* (45 p. 100). On note aussi des variations importantes dans le taux de récupération entre régimes pour un même animal.

La vitesse de transit des spores dans le rumen et l'ensemble du tractus digestif est plus grande pour *Clostridium* que pour *Bacillus*. Par ailleurs, l'effet du régime sur la vitesse de transit des spores est très net.

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

Les injections de spores renouvelées pendant 4 jours se traduisent par des variations assez importantes du nombre de spores dans les fèces, mais n'entraînent pas d'implantation et les spores disparaissent dans le même délai que lors d'une seule inoculation.

L'introduction de cellules végétatives dans le rumen augmente légèrement et passagèrement la concentration en spores dans le rumen.

On n'observe pas de sporulation ou de germination des spores dans du jus de rumen stérilisé et placé en boyaux de dialyse et dans nos conditions expérimentales la pepsine et la trypsine n'ont pas d'action sur la viabilité des spores.

En conclusion, les résultats obtenus montrent que les spores qui traversent rapidement le rumen et la caillette sont susceptibles de germer. Cette possibilité de germination offerte aux spores par les conditions écologiques régnant dans le tube digestif du ruminant est le fait essentiel puisqu'il détermine la multiplication ultérieure.

INTRODUCTION

Au cours d'une première étude (GOUET, CONTREPOIS, 1971) on a montré que parmi les bactéries anaérobies sporulées qui se multiplient dans l'ensilage, une espèce (*C. tyrobutyricum*) fermentant le lactate domine dans les fèces des animaux nourris avec cet aliment. Les bilans entre spores ingérées avec l'ensilage et excrétées dans les fèces n'ont cependant pas permis de conclure de façon certaine que cette espèce se multiplie dans le tube digestif.

Pour éclaircir ce point, la méthode d'investigation adoptée ici consiste à introduire à travers une fistule, dans le rumen, des spores ou des cellules végétatives d'une souche connue de *C. tyrobutyricum* et à suivre son comportement dans le tube digestif de l'animal. L'étude se propose deux objectifs :

1° Mesurer l'augmentation ou la diminution du nombre de spores de *C. tyrobutyricum* en établissant un bilan $\frac{\text{spores excrétées}}{\text{spores ingérées}}$.

2° Localiser les sites de prolifération éventuelle dans et après le rumen en mesurant la vitesse d'excrétion des spores de *C. tyrobutyricum* comparativement à un traceur bactérien.

MÉTHODES

On utilise deux bœufs fistulés (n° 893 et 899) maintenus en cage individuelle pour permettre une récupération séquentielle et totale des fèces.

Les 4 régimes suivants sont expérimentés :

- R₁ = Foin à volonté.
- R₂ = Ensilage de luzerne stérilisé (25 kg) + Foin (6 kg).
- R₃ = Ensilage de luzerne stérilisé (25 kg) + Foin (6 kg) + concentré (2 kg).
- * R₄ = Ensilage de maïs (25 kg) + Foin (6 kg).

Les mesures ont été effectuées après 15 jours d'accoutumance. Pour éviter un apport de spores important par l'aliment, les ensilages de luzerne qui sont le plus souvent fortement contaminés sont stérilisés à l'autoclave pendant 30 mn à 130°C. L'ensilage de maïs contenant peu de spores n'est pas stérilisé.

* L'ensilage de maïs était broyé pour le bœuf 893 qui ne le consommait que sous cette forme.

1. — Mesure de la vitesse de transit et du bilan $\frac{\text{spores ingérées}}{\text{spores excrétées}}$

La vitesse de transit des spores de *C. tyrobutyricum* dans le tractus digestif est mesurée en la comparant à celle d'un traceur constitué par des spores d'un *Bacillus subtilis* thermophile. Deux particularités physiologiques de ce *Bacillus* lui interdisent de se multiplier dans le tube digestif : il est aérobic strict et ne se développe pas à 39°C. On peut le séparer aisément des autres espèces présentes dans le rumen ou les fèces en dénombrant les spores en aérobiose et à 55°C.

Les spores de *Clostridium* et de *Bacillus* sont mises en suspension à des concentrations voisines (10^{10} spores de *Bacillus* pour $5 \cdot 10^{10}$ *Clostridium* dans un litre de sérum physiologique) puis introduites simultanément dans le rumen. Chaque injection (10^{10}) correspond à une contamination de 10^6 spores environ par gramme M. S. d'ensilage ingéré, soit celle d'un ensilage de médiocre qualité pour une ration journalière de 10 kg de matière sèche.

En se plaçant ainsi à ce niveau élevé de contamination, *C. tyrobutyricum* devient l'espèce anaérobie sporulée lactate + dominante dans le tube digestif, ce qui permet de la dénombrer sélectivement.

Pour chaque régime, on procède à une seule injection 1 heure après le début du repas. Dans l'hypothèse où une implantation ne pourrait se produire qu'après une ingestion prolongée d'ensilage, on a renouvelé dans un seul essai l'injection pendant 4 jours consécutifs.

Les prélèvements de jus de rumen (100 ml) sont effectués à des intervalles d'une heure jusqu'à la 10^e heure, de 2 ou 3 heures entre la 10^e et la 24^e heure, de 4 heures entre 24 heures et 48 heures, de 6 heures entre 48 et 72 heures, de 12 heures entre 72 et 110 heures et de 24 heures entre 110 et 136 heures.

Pour les fèces, la collecte est opérée toutes les 2 ou 3 heures de 8 heures à 24 heures, puis à une fréquence identique à celle du jus de rumen.

La récolte de la totalité des fèces pendant 200 heures après l'introduction des spores dans le rumen permet ainsi d'établir un bilan entre spores ingérées et spores excrétés.

Le même protocole expérimental est suivi lorsqu'on introduit dans le rumen des cellules végétatives de *C. tyrobutyricum*.

2. — Techniques bactériologiques

Les techniques d'échantillonnage, de dénombrement de spores dans le jus de rumen, les fèces, les aliments, sont celles décrites dans la partie I (GOUET, CONTREPOIS, 1971).

Les spores de *Bacillus* sont produites et dénombrées selon une méthode déjà rapportée (CONTREPOIS, GOUET, 1969). Les spores de *C. tyrobutyricum* sont produites en sac de dialyse (CERF, BERGÈRE, HERMIER, 1967) et les cellules végétatives sont récoltées après 20 heures d'incubation à 37°C à partir d'un litre de milieu RCM (HIRSCH, GRINSTED, 1954) ensemencé avec 1 ml d'une culture de 16 heures sur RCM.

La sporulation et la germination des spores de neuf souches de *C. tyrobutyricum* dans le jus de rumen sont suivies de la façon suivante : après filtration et stérilisation à 120°C pendant 20 minutes, du jus de rumen est réparti dans des boyaux de dialyse que l'on ferme en évitant d'emprisonner des bulles d'air. Protégés par une crépine métallique recouverte d'une gaze de nylon, ils sont alors introduits dans le rumen. On les laisse séjourner ainsi pendant 8 heures, pour abaisser le potentiel d'oxydo-réduction au niveau de celui du rumen. Le contenu du boyau de dialyse est alors ensemencé avec les spores ou les cellules végétatives de *C. tyrobutyricum* (10^7 à 10^8 /ml), puis incubé dans le rumen pendant 40 heures. L'apparition de formes végétatives et leur sporulation éventuelle est observée par un examen microscopique en contraste de phase.

3. — Techniques biochimiques

a) Les spores étant exposées à l'action de la pepsine en milieu acide dans la caillette puis à celle de la trypsine dans l'intestin grêle, on a contrôlé *in vitro* leur résistance à l'attaque de ces deux enzymes protéolytiques. A cet effet, on incube à 39°C en milieu HCl à pH 1,65 100 ml d'une suspension contenant 10^7 spores/ml et 50 mg de pepsine. La même solution sans pepsine sert de témoin. Les spores sont dénombrées à partir d'un ml de suspension pepsique prélevé après 4 heures d'incubation.

Deux autres suspensions de même concentration subissent l'attaque de la pepsine pendant 4 heures puis sont neutralisées par de la soude, et tamponnées à pH 7 par un tampon phosphate. L'une reçoit 20 mg de trypsine et l'autre constitue le témoin. L'action de la trypsine est mesurée par un dénombrement des spores aux temps 0 et 20 heures.

Comme pour tous les dénombrements, un chauffage de 10 mn à 75°C permet de sélectionner et d'activer les spores.

b) Les analyses d'ensilage se font sur un échantillon cumulé tout au long de la période de distribution de l'aliment. On mesure le pH et on analyse l'azote total (Kjeldahl), l'azote ammoniacal (CONWAY, 1960), les acides gras volatils (JAMES MARTIN, 1951 mod. ZELTER-LEROY, 1958) et l'acide lactique (BARNETT, 1951).

RÉSULTATS

La luzerne qui a servi aux essais a subi un préfanage avant d'être ensilée et son taux de MS est d'environ 30 p. 100 (tabl. 1). Les concentrations en acide butyrique et azote ammoniacal de l'ensilage sont faibles mais le nombre de spores de *Clostridium* avant stérilisation est élevé (10⁵/g). Le maïs ensilé à un stade végétatif avancé a un taux de MS variant de 30 à 34 p. 100. Le pH est élevé et supérieur à celui de l'ensilage de luzerne alors que les taux d'acide acétique et lactique sont plus faibles. Le nombre de spores est d'environ 10³ par g.

La stérilisation des ensilages de luzerne à la vapeur pendant 30 mn à 130°C ne détruit pas la totalité des spores mais abaisse leur concentration à un niveau inférieur à 10² par g, éliminant le risque d'interférence avec les spores introduites par la fistule. Les concentrations en acides gras volatils, acide lactique, azote ammoniacal, ne sont pas affectées, mais le taux de matière sèche diminue de 15 p. 100 (tabl. 1).

1. — Bilan spores excrétées/spores ingérées

Quels que soient le régime, l'animal, le nombre d'injections dans le rumen et l'espèce bactérienne employée, les bilans se soldent régulièrement par une perte de spores au cours du séjour dans le tube digestif (tabl. 2).

Une analyse de variance à trois facteurs (animaux, types de spores, et régimes) montre que :

— les taux de récupération des spores de *Bacillus* sont supérieurs à ceux de *Clostridium* de manière hautement significative (niveau 0,01) et leurs variations moins importantes. On récupère de 50 à 77 p. 100 de spores de *Bacillus* avec une moyenne de 65 p. 100, alors qu'on retrouve entre 15 et 82 p. 100 de spores de *Clostridium* avec une moyenne de 45 p. 100 ;

— à régime identique et d'un animal à l'autre, les pourcentages de récupération de *C. tyrobutyricum* peuvent être très variables (25 p. 100 avec le bœuf 893 et 80 p. 100 avec le bœuf 899 dans le cas du régime 3) mais ces différences ne sont pas significatives ;

— pour un même animal et d'un régime à l'autre, des écarts très importants sont également enregistrés dans la récupération des spores de *C. tyrobutyricum* : pour le bœuf 893, 82 p. 100 avec le régime R₁, 15 p. 100 avec le régime R₃, mais ici également les écarts observés ne sont pas significativement différents.

2. — Vitesse de transit des spores

Compte tenu qu'aucune différence significative n'est observée dans les taux de récupération des spores, selon le régime ou l'animal, les résultats du transit des spores peuvent être interprétés à partir des moyennes des dénombrements obtenus avec chaque espèce bactérienne pour l'ensemble des régimes et les deux animaux.

TABLEAU I
Caractéristiques biochimiques des ensilages expérimentés

Ensilage expérimenté	Echantillon	MS (%)	pH	Acide acétique (1)	Acide propionique (1)	Acide butyrique (1)	Acide lactique (1)	N-NH ₃ (%) N total	Alcool (1)
Ensilage de luzerne non stérilisé	1	30,4	4,74	3,16		0,46	5,41	10,1	
	2	29,5	4,85	2,19	0,08	0,66	6,04	9,5	
	3	29,4	4,89	2,94	0,08	0,67	4,88	10,9	
	4	28,8	4,89	2,70	0,16	0,73	5,19	11,7	
Ensilage de luzerne après stérilisation (30 mn, 130°C)	1	25,0	4,72	3,50	0,21	1,16	4,09	10,25	
	2	25,4	4,70	3,29	0,41	0,59	3,88	10,80	
Ensilage de maïs non stérilisé	1	30,4	5,10	1,08			4,23		1,03
	2	30,8	5,25	1,51			4,51		0,62
	3	34,3	5,10	1,16	0,07		4,03		0,90
	4	31,3	5,30	0,96	0,02		4,59		1,38
	5	34,6	5,25	1,91			4,78		0,88

(1) Les concentrations sont exprimées en p. 100 de la MS.

TABLEAU 2

Taux de récupération des spores après introduction de $5 \cdot 10^{10}$ spores de *C. tyrobutyricum* et 10^{10} de *B. subtilis*

Nombre d'injections	Régime	Bœuf 893		Bœuf 899	
		<i>Clostridium</i> (%)	<i>Bacillus</i> (%)	<i>Clostridium</i> (%)	<i>Bacillus</i> (%)
1	R ₁	82	50		
1	R ₂	15	75	27	71
1	R ₃	25	76	80	71
1	R ₄	50	77	35	50
4 *	R ₃	45	50		

* Injections faites pendant 4 jours, toutes les 24 heures.

a) *Vitesse de transit dans le rumen.*

La vitesse de transit des spores dans le rumen est suivie avec les régimes R₂, R₃, R₄ pour chaque animal et avec le régime R₁ pour le bœuf 893 seulement. La figure 1

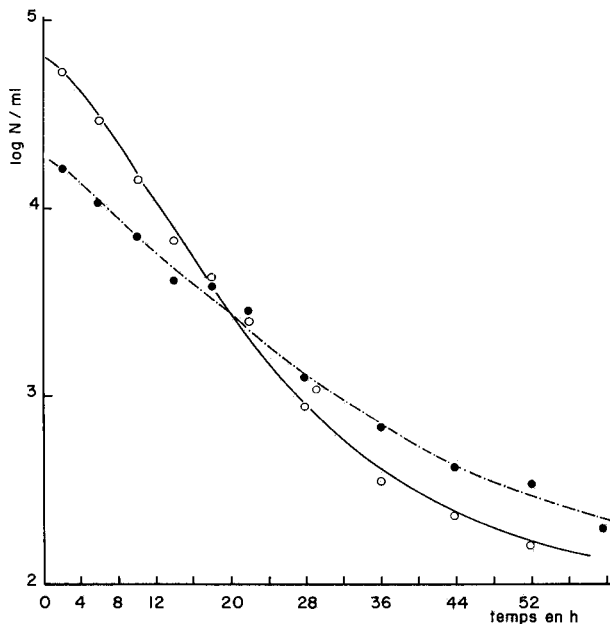


FIG. 1. — Évolution de la concentration moyenne en spores dans le jus de rumen avec les régimes R₁, R₂, R₃, R₄

○—○ *C. tyrobutyricum* ●— · — · — ● *Bacillus*

représente les courbes moyennes de disparition des deux types de spores, obtenues à partir des sept expériences avec injection unique.

On constate que la concentration en spores de *Clostridium* dans le jus de rumen, est, dès le départ, supérieure à celle de *Bacillus*, ce qui correspond au fait que les inoculums de *Clostridium* sont environ 5 fois plus concentrés que ceux de *Bacillus*.

Le rapport $\frac{\text{spores } Clostridium}{\text{spores } Bacillus}$ supérieur à 1 au départ devient inférieur à 1 après 20 heures et traduit donc une diminution plus rapide des spores de *Clostridium* dans le jus de rumen. Ce résultat moyen est observé pour chacune des sept expériences.

b) *Vitesse de transit dans l'ensemble du tube digestif.*

La figure 2 présente la vitesse moyenne d'excrétion des spores dans les fèces pour les deux animaux avec les différents régimes. La courbe pointillée représente l'élimination théorique des spores de *C. tyrobutyricum* par les fèces dans le cas où le transit serait purement passif, comme l'est celui du *Bacillus*.

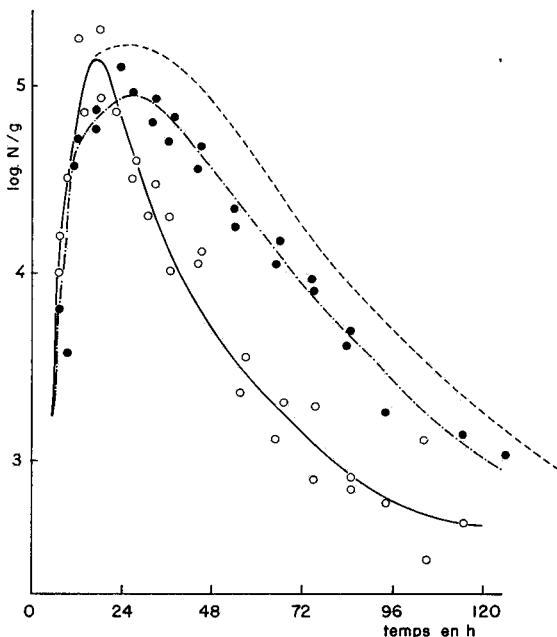


FIG. 2. — Évolution de la moyenne des concentrations en spores dans les fèces lorsque 5×10^{10} spores de *C. tyrobutyricum* et 10^{10} de *Bacillus* sont introduites dans le rumen au temps 0
 ○—○ *C. tyrobutyricum* ●—● *Bacillus* — — — — — Courbe théorique

Dans cette hypothèse, où nous faisons abstraction de l'animal et du régime, le pic d'excrétion est fonction de la quantité de marqueur et se situe toujours entre 24 et 36 heures quelle que soit cette quantité. Quant à l'élimination totale du marqueur elle se fait toujours à la même vitesse quelle que soit la quantité introduite.

Pour *Clostridium* le pic est plus élevé et apparaît environ 15 heures après l'injection alors que pour *Bacillus* on l'observe seulement après 24 heures. Cet écart augmente encore par la suite pour atteindre 40 heures vers la fin de l'élimination des

spores. De plus, la plus grosse partie des spores de *Clostridium* retrouvée dans les fèces, l'est dans les vingt premières heures (tabl. 3). Ce même résultat est observé pour chacune des 7 expériences.

TABLEAU 3

Pourcentage de spores excrétées en vingt heures par rapport au total excrété

Régime	Bœuf 893		Bœuf 899	
	<i>B. thermophilus</i> (%)	<i>C. tyrobutyricum</i> (%)	<i>B. thermophilus</i> (%)	<i>C. tyrobutyricum</i> (%)
1	7	40		
2	10	53	23	31
3	15	64	23	63
4	41	82	20	80

Ces différences, dans la « durée apparente » du transit des spores apparaissent plus nettement lorsqu'on exprime la cinétique de l'excrétion en p. 100 du total des spores excrétées (fig. 3 (1) et 3 (2)). Pour chaque régime et pour chaque animal le transit de *Bacillus* est plus lent que celui des spores de *Clostridium*. Ainsi pour le régime R₁, 95 p. 100 des spores de *Clostridium* excrétées apparaissent en 50 heures

TABLEAU 4

Temps de rétention moyen (R) et Taux d'excrétion horaires pour Bacillus et Clostridium

Animal	Régime	<i>B. thermophilus</i>		<i>Cl. tyrobutyricum</i>	
		R	Taux d'excrétion 5-95 %	R	Taux d'excrétion 5-95 %
893	1	47,3	1,17	25,5	2,5
893	2	37	1,55	23,7	2,73
893	3	34,3	1,66	20,5	3,21
893	4	25,9	2,43	16,4	3,75
899	2	33	1,58	25,9	2,25
899	3	34	1,55	19,8	2,37
899	4	36	1,38	16,9	3,6

et *Bacillus* en 95 heures. Avec de l'ensilage de maïs (broyé pour le 893 qui ne le consommait pas autrement) le même résultat est atteint en 40 heures pour *Clostridium* et 50 heures pour *Bacillus*.

L'effet régime, mesuré avec les spores de *Bacillus* apparaît bien chez le bœuf 893 (fig. 3 (2)) : avec un foin long, le transit est nettement moins rapide qu'avec un ensilage de maïs broyé. Le même ordre est respecté avec les spores de *Clostridium*.

Pour le bœuf 899 (fig. 3 (1)) l'excrétion de *Clostridium* se fait selon le régime dans le même ordre que pour le bœuf 893 bien que le maïs n'ait pas été broyé. Par contre, le transit de *Bacillus* est nettement différent. Les courbes qui correspondent aux régimes R₂ et R₃ se superposent et celle de R₄ est légèrement décalée. Ainsi pour 50 p. 100 du total excrété, l'écart maximum pour *Bacillus* est de 2 heures avec 899 et de 10 heures avec 893.

Enfin, l'expression des vitesses de transit sous la forme d'un taux d'excrétion horaire (tabl. 4) montre que celui-ci est toujours plus faible pour *Bacillus* que pour

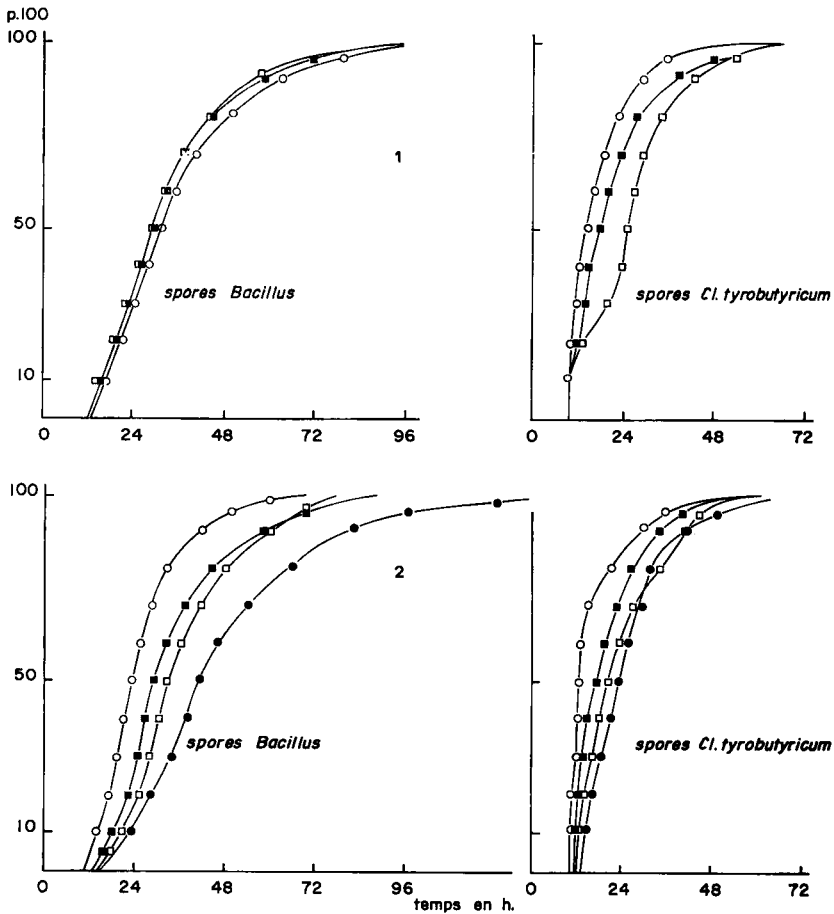


FIG. 3. — Pourcentage de récupération des spores en fonction du temps

1 : Bœuf 899 2 : Bœuf 893
Régimes ● R₁ □ R₂ ■ R₃ ○ R₄

Clostridium ; pour l'ensemble des résultats la différence est hautement significative. A régime identique, les écarts entre les taux d'excrétion sont beaucoup plus réduits entre animaux qu'entre espèces bactériennes. Le temps de rétention moyen (R) selon CASTLE (1956) est plus important pour *Bacillus* que pour *Clostridium*.

c) *Comparaison du comportement des spores, observé dans le rumen et les fèces.*

On représente sur la figure 4 la variation, en fonction du temps, du rapport des logarithmes des nombres des spores (*Clostridium*/*Bacillus*) dans le rumen et dans les fèces. Dans le rumen, ce rapport baisse de 1,12 au moment de l'injection à 0,9 au bout de 48 heures, sur la moyenne des 7 mesures effectuées. Ce phénomène s'accroît dans les fèces où l'on passe d'un rapport supérieur à 1,2 à 0,85 après 48 heures. La disparition des spores de *Clostridium*, plus rapide que celle des *Bacillus* (phénomène déjà observé dans le rumen) s'accroît donc encore dans les parties postérieures du tube digestif.

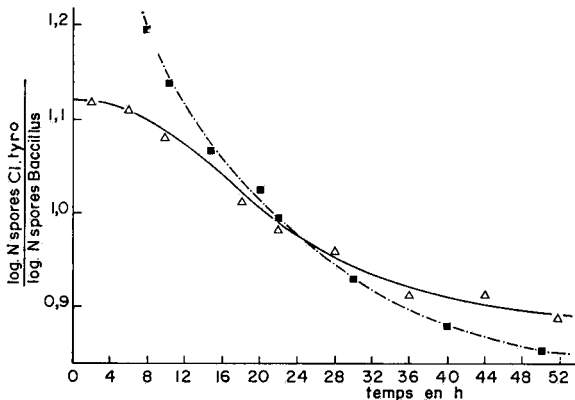


FIG. 4. — Évolution du rapport $\frac{\log N \text{ spores } C. \text{ tyrobutyricum}}{\log N \text{ spores } Bacillus}$ dans le jus de rumen et les fèces

△ — △ Jus de rumen ■ — · — · — ■ Fèces

d) *Effet des injections répétées.*

Les injections de spores renouvelées successivement durant 4 jours (fig. 5) simulent une ingestion prolongée d'ensilage de médiocre qualité. Elles permettent d'enregistrer des oscillations assez importantes liées à l'injection quotidienne et massive de spores. Elles n'entraînent pas toutefois l'implantation de *Clostridium* dans le tube digestif et le temps d'élimination après la dernière inoculation est comparable à celui obtenu avec une seule injection.

e) *Effet de l'introduction de cellules végétatives de C. tyrobutyricum dans le rumen.*

L'introduction de 10^{11} à 10^{12} cellules végétatives de *Clostridium* dans le rumen simule l'ingestion d'un ensilage en cours de fermentation butyrique. On ne remarque pas d'augmentation durable de la concentration en spores dans le rumen alors que

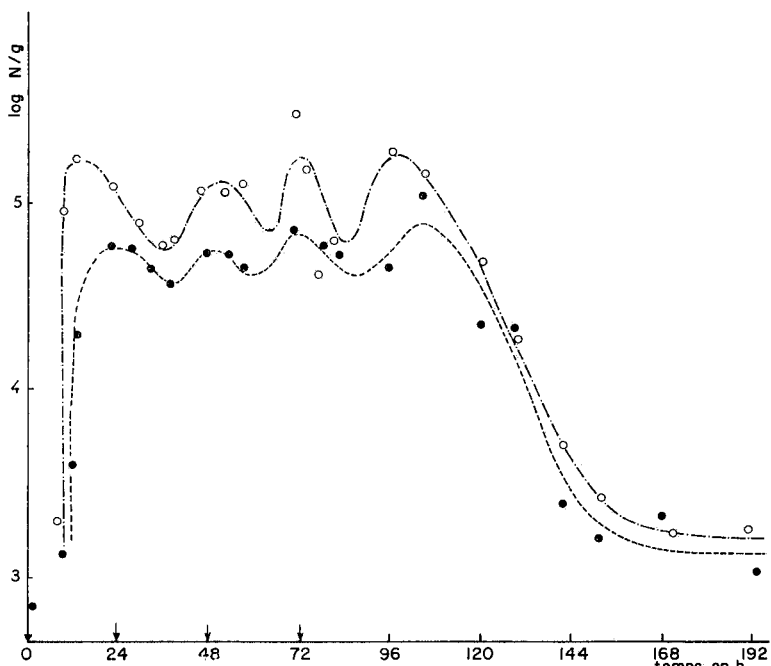


FIG. 5. — Évolution de la concentration en spores de *C. tyrobutyricum* et de *Bacillus* dans les fèces après injections dans le rumen aux temps : 0, 24, 48, 72 heures. Régime R₃

○ — · — · — ○ *C. tyrobutyricum* ● — — — ● *Bacillus* ↓ Injection des spores

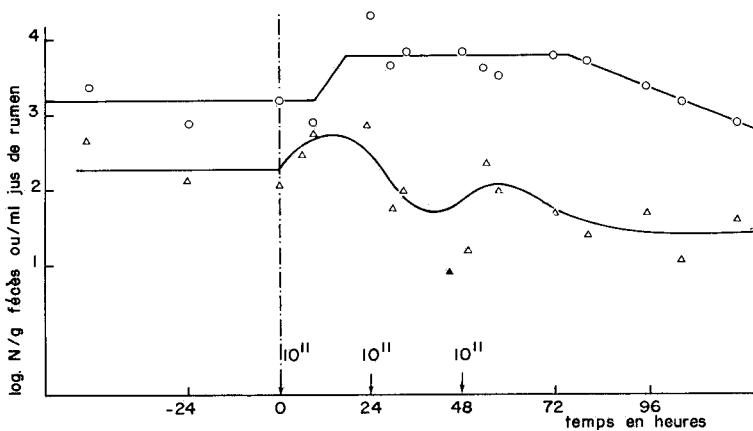


FIG. 6. — Évolution du nombre (N) de spores de *C. tyrobutyricum* dans le jus de rumen et les fèces après introduction dans le rumen de cellules végétatives de cette espèce aux temps 0, 24, 48 heures

○ — ○ Fèces △ — △ Jus de rumen ↓ Injection de cellules

dans les fèces, elle s'accroît légèrement (fig. 6). Ceci est probablement dû à ce qu'une très faible proportion (1 p. 1 000) de cellules végétatives a sporulé au cours de la culture. Ainsi l'inoculum aurait apporté 10⁸ à 10⁹ spores.

f) *Phénomènes observés dans les boyaux de dialyse.*

Des cellules végétatives de la souche de *C. tyrobutyricum* utilisés dans les expériences précédentes, ainsi que de trois autres isolées de l'ensilage, quatre des fèces et une du jus de rumen ont été introduites dans des boyaux de dialyse contenant un jus de rumen stérile, régénéré. Après 40 heures d'incubation dans le rumen, l'observation microscopique de ces cultures n'a montré ni multiplication des cellules végétatives, ni apparition de cellules végétatives à partir des spores, ni celle de spores à partir des cellules végétatives.

g) *Action de la pepsine et de la trypsine.*

On ne décèle aucune action de la pepsine et de la trypsine sur la viabilité des spores (tabl. 5). En effet, une perte de 50 à 70 p. 100 des spores est observée, mais ce résultat est également vrai pour le témoin à 39°C en milieu acide (pH 1,65).

TABLEAU 5
Action de la pepsine et de la trypsine

Temps (heures)	Action de la pepsine		Action de la trypsine		
	0	4		0	20
+ pepsine	8 . 10 ⁶	2,5 . 10 ⁶			
Sans pepsine	8 . 10 ⁶	2,5 . 10 ⁶			
+ pepsine	5 . 10 ⁶	3,5 . 10 ⁶	+ trypsine	2,5 . 10 ⁶	2,5 . 10 ⁶
+ pepsine	5 . 10 ⁶	3,5 . 10 ⁶	Sans trypsine	1,3 . 10 ⁶	1,7 . 10 ⁶

DISCUSSION

La présence quasi permanente d'une microflore sporulée anaérobie dans les ensilages est un fait courant et même en l'absence d'acide butyrique on peut y dénombrer 10⁴ spores/g d'espèces fermentant le lactate (BERGÈRE *et al.*, 1968). Les variations importantes que l'on a enregistrées dans la contamination d'un même lot d'ensilage ont nécessité sa stérilisation pour éliminer tout risque d'interférences par les spores sauvages. Un essai préliminaire de stérilisation par l'oxyde d'éthylène s'est avéré efficace à la dose minimum de 1 p. 100 mais ce traitement a rendu l'ensilage inappé- tent. On a donc dû recourir à l'autoclavage qui, seul, est susceptible d'apporter la sécurité requise en réduisant la concentration dans des proportions de 100 à 1 000.

Bien que sans effet sur les éléments volatils ce traitement technologique (130°C, 30 mn) a sûrement modifié certains composés azotés et glucidiques par précipitation ou hydrolyse en raison du pH de l'aliment (4,7-4,9). Toutefois, l'ensilage de maïs qui du fait de sa faible contamination naturelle n'a pas été stérilisé, ne présente pas de différence avec les ensilages de luzerne en regard du transit et de la multiplication des spores de *Clostridium*.

Faute de techniques et de milieux permettant de dénombrer sélectivement les cellules végétatives de *Clostridium* dans le tractus digestif, on a suivi seulement les variations du nombre de spores par une méthode directe (bilan) et par une méthode indirecte (vitesse de transit par comparaison à un traceur).

Les bilans sont la résultante des facteurs qui peuvent influencer sur les caractères physiologiques de la spore au cours du séjour dans le tube digestif : perte de viabilité, germination suivie ou non de multiplication des cellules végétatives et sporulation éventuelle. Cette méthode montre que pour chaque espèce, une partie des spores est perdue. Dans le cas de *Bacillus*, 25 à 50 p. 100 disparaissent, mais les résultats sont homogènes et les pertes sont sans doute liées aux erreurs expérimentales, à la fixation de spores sur les particules végétales alimentaires. Ceci est également vrai pour *C. tyrobutyricum*, mais les différences significatives observées dans l'élimination des *Clostridium* comparée aux *Bacillus* impliquent un processus supplémentaire intervenant à l'encontre des spores de *Clostridium*.

La seconde méthode permet de différencier les phénomènes au niveau du rumen, puis dans l'ensemble du tube digestif. L'emploi de spores de *Bacillus* comme traceur permet de se référer à des particules ayant une taille sensiblement identique (CONTREPOIS, GOUET, 1969), une morphologie voisine et des densités comparables aux spores de *Clostridium*. Compte tenu de ces analogies, on ne peut pas, *a priori*, imaginer de raisons qui expliqueraient les vitesses de transit différentes de ces deux espèces de spores. Toute différence dans la vitesse d'excrétion des deux espèces de spores ne peut être logiquement interprétée que comme une multiplication ou une diminution du nombre des spores de *Clostridium* ou encore la somme de ces deux effets.

En effet, il faut rappeler que durant la phase initiale de la germination, la spore perd sa réfringence et sa thermorésistance. Or le chauffage de 10 mn à 75°C nécessaire pour sélectionner les spores et activer leur germination détruit les spores engagées dans cette phase. Si la germination est restée à ce stade et n'a pas conduit à une multiplication de cellules végétatives qui n'ont donc pas pu elles-mêmes sporuler, la disparition des spores de *Clostridium* doit être plus rapide que celle de *Bacillus*. Or, tous les résultats obtenus *in vivo* concordent dans ce sens et obligent à conclure qu'une partie des spores de *Clostridium* germent au cours de leur séjour dans le tube digestif.

Mais il est aussi intéressant de pouvoir localiser les sites favorables à la germination ou au développement des *Clostridium*. Le rumen constitue à cet égard une niche écologique favorable par son très faible potentiel d'oxydo-réduction, sa température et la présence de certains ions tels que l'acétate et l'ammonium qui favorisent la germination (BERGÈRE, 1969). Toutefois, on y trouve aussi des inhibiteurs comme le butyrate. Le turn-over dans le rumen étant de 12-18 heures, quelques spores le quittent très vite après leur introduction, et d'autres vont y séjourner plusieurs jours pendant que la plupart y resteront une douzaine d'heures. Les premières n'ont pas le temps d'y germer alors que les autres ont celui de s'y multiplier. La disparition plus rapide de *Clostridium* que de *Bacillus* dans le rumen (fig. 1) semble bien prouver que les spores germent, mais ce résultat n'est pas confirmé *in vitro*. Toutefois, la seule observation microscopique ne vaut que si la germination dépasse la phase initiale et aboutit à des cellules végétatives faciles à distinguer des spores (et nous n'en avons pas observées) ou au contraire si les cellules introduites sporulent à un taux minimum de 1 p. 100. Cette technique n'est pas quantitative et ne peut rendre

compte des phénomènes de germination et de sporulation que dans la mesure où ils se manifestent très nettement. En effet, la seule perte de réfringence, surtout si elle se produit à un faible taux est difficile à observer car les lots de spores comprennent toujours à l'origine une part de spores non réfringentes. Après le rumen, les spores réfringentes ou non ainsi que les cellules végétatives passent dans la caillette durant deux à quatre heures. Au pH de cet organe (2,0-3,0) seules les spores intactes peuvent transiter sans être détruites ; toutefois, en milieu acide les spores se déchargent d'une partie de leur calcium et leur thermorésistance diminue mais leur viabilité persiste (ALDERTON, SNELL, 1963). Ce phénomène suffit d'ailleurs à expliquer la destruction partielle en milieu HCl enregistrée par le test pepsique-trypsique.

Au niveau des fèces, les résultats des dénombrements de spores reflètent l'ensemble des phénomènes de destruction, germination, multiplication végétative et (ou) sporulation qui ont pu se produire dans les différents compartiments du tube digestif. Le rapport $\frac{\log N \text{ Clostridium}}{\log N \text{ Bacillus}}$ diminuant plus vite dans les fèces que dans le rumen (fig. 4) prouve qu'il y a encore destruction de spores et par conséquent germination au-delà du rumen. Cette germination pourrait d'ailleurs, dans les 8 à 16 premières heures du transit aller jusqu'à la sporulation, car le rapport $\frac{\log N \text{ Clostridium}}{\log N \text{ Bacillus}}$ est supérieur à ce moment dans les fèces à ce qu'il est dans le rumen au temps 0. Toutefois, nos résultats ne nous permettent pas de conclure définitivement sur ce point.

Enfin, l'introduction de cellules végétatives entraîne une augmentation du nombre de spores dans le rumen car une fraction de ces cellules a déjà sporulé au cours de la culture. Le faible accroissement enregistré dans les fèces correspond à celui dans le rumen et prouve qu'il n'y a pas eu de sporulation *in vivo* dans ces conditions expérimentales. Il faut cependant noter que le comportement physiologique de ces cellules transplantées du milieu RCM dans un rumen est sûrement différent de celui des cellules végétatives formées *in situ*.

En conclusion, il n'y a pas eu, dans nos conditions expérimentales de multiplication de spores. Mais le fait que les spores puissent germer dans le tractus digestif constitue, à notre avis, le résultat essentiel, car il est l'amorce du processus qui conduit à la multiplication végétative et à l'augmentation du nombre des spores. En outre, on peut logiquement admettre que dans certaines conditions où interviendraient des souches sauvages de *C. tyrobutyricum*, de nombreux animaux, des régimes différents, un autre mode de distribution de la ration (libre-service), les cellules végétatives peuvent se multiplier et sporuler ce qui expliquerait les contradictions observées entre auteurs.

Reçu pour publication en octobre 1970.

REMERCIEMENTS

Nous remercions M. BERGÈRE (Station centrale de Recherches Laitières et de Technologie des Produits animaux) ainsi que M. VIROBEN (Laboratoire de Recherches sur la Conservation et l'Efficacité des Aliments) pour l'aide qu'ils ont bien voulu nous apporter au cours de la réalisation de cette étude.

SUMMARY

BEHAVIOUR OF THE LACTATE-FERMENTING SPORES
OF THE ANAEROBIC BACTERIA IN THE RUMINANT DIGESTIVE TRACTII. — VARIATION IN THE NUMBER OF SPORES INTRODUCED INTO THE RUMEN
DURING THE DIGESTIVE TRANSIT IN THE RUMINANT

In the first part of this experiment, we showed that the number of spores of *C. tyrobutyricum* ingested by the ruminants receiving silage neither increased nor decreased during the digestive transit. In the present trial, a known number of spores of *C. tyrobutyricum* was introduced into the rumen of fistulated steers which received a diet containing sterilized silage. The excretion rate of these spores was measured in comparison with that of a bacterial tracer (spores of *Bacillus subtilis*, thermophilic, strict aerobe). The variation in the number of spores was measured in presence of different diets :

$$\begin{aligned} \text{Hay} &= R_1 \\ \text{Alfalfa silage} + \text{hay} &= R_2 \\ \text{Alfalfa silage} + \text{hay} + \text{concentrate} &= R_3 \\ \text{Maize silage} + \text{hay} &= R_4 \end{aligned}$$

The germination of the spores in the sterilized rumen liquor as well as the action of the digestive enzymes (pepsin, trypsin) upon this germination were studied *in vitro*.

Whatever the diet, the animal, the number of injections in the rumen and bacterial species injected, the balances : ingested spores/excreted spores were always negative. The number of spores of *Bacillus* found (65 p. 100) was significantly higher than that of *Clostridium* (45 p. 100). We also noticed, for one and the same animal, important variations of the recovery rate according to the different diets.

The rate of passage of the spores in the rumen and the whole digestive tract was higher for *Clostridium* than for *Bacillus*. Moreover, the effect of the diet upon the rate of passage of the spores was very clear.

The injections of spores repeated during 4 days gave rather important variations of the number of spores in the faeces, but did not result in an implanting of the spores which disappeared in the same laps of time as after one only inoculation.

The concentration of spores in the rumen was slightly and momentarily increased by the introduction of vegetative cells into the rumen.

We did not observe any sporulation or germination of the spores in the sterilized rumen liquor placed in dialysis bags, and under our experimental conditions, pepsin and trypsin did not have any action upon the viability of the spores.

The results obtained show that the spores passing rapidly through the rumen and abomasum are liable to germinate. This possibility of germination given to the spores by the ecological conditions in the ruminant digestive tract constitutes the essential fact hence it determines the further multiplication of these spores.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ALDERTON G., SNELL N., 1963. Base exchange and heat resistance in bacterial spores. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **10**, 139-143.
- BARNETT, 1951. Colorimetric determination of lactic acid in silage. *Biochem. J.*, **49**, 527-540.
- BERGÈRE J.-L., 1969. La germination de la spore de *C. tyrobutyricum*. *Ann. Inst. Pasteur*, **117** 179-195.
- BERGÈRE J.-L., GOUET Ph., HERMIER J., MOCQUOT G., 1968. Les *Clostridium* du groupe butyrique dans les produits laitiers. *Ann. Inst. Pasteur*, Lille, **109**, 41-54.
- CASTLE E. J., 1956. The rate of passage of foodstuffs through the alimentary tract of the goat. *Brit. J. Nutr.*, **10**, 17-23.
- CERF O., BERGÈRE J.-L., HERMIER J., 1967. Thermorésistance des spores de *Clostridium tyrobutyricum* et *Clostridium butyrium*. *J. Dairy Res.*, **34**, 221-922
- GOUET Ph., CONTREPOIS M., 1971. Comportement des spores de bactéries anaérobies fermentant le lactate dans le tractus digestif du ruminant. Variations avec le régime de la concentration en spores dans le rumen et les fèces. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, **11**.

- 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. Acad. Sci. Paris*, **168**, 1757-1759.
- CONWAY E. J., 1960. *Microdiffusion analysis and volumetric error*. 3^e édition, Cd Grosby, London, 15-97.
- HIRSCH A., GRINSTED E., 1954. Methods for the growth and enumeration of anaerobic sporeformers from cheese with observation on the effect of nisin. *J. Dairy Res.*, **21**, 101-110.
- JAMES A. T., MARTIN A. J. P., 1951. Gas liquid partition chromatography : the separation and micro-estimation of volatile fatty acids from formic acid to dodecanoic acid. *Biochem. J.*, **50**, 679-690.
- ZELTER S. Z., LEROY F., 1958. Azote uréique et activité bactérienne *in vitro* au niveau du rumen. *Ann. Zootech.*, **7**, 173-183.
-