

RECHERCHE DES NITRATES DANS LES FOURRAGES ET LES ENSILAGES

II. — ORIGINE DU CATABOLISME DES NITRATES DANS LES ENSILAGES ET INTENSITÉ DE LEUR DÉGRADATION EN FONCTION DU TRAITEMENT TECHNOLOGIQUE

Nathalie BOUSSET-FATIANOFF, Ph. GOUET, J. BOUSSET et M. CONTREPOIS
avec la collaboration technique de Nadine MOUHOUS

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

RÉSUMÉ

Dans une première expérience, des ensilages de luzerne et de Ray Grass holoxéniques, axéniques et gnotoxéniques sont préparés. Pour ces derniers, les fourrages sont stérilisés par irradiation gamma (2 Mrad) puis ensemencés ou non, avec une ou plusieurs souches bactériennes isolées parmi les espèces qui dominent dans la microflore des ensilages. La réduction des nitrates est totale, pour les deux fourrages, en présence d'une souche de *Lactobacillus plantarum*, d'une souche de « branching *Lactobacillus* », d'une souche d'*Enterobacter* sp. et de *Clostridium tyrobutyricum*; par contre, les souches de *Lactobacillus brevis*, *Streptococcus faecalis*, *Pediococcus* sp. *Clostridium butyricum* ainsi que les enzymes végétales seules n'ont aucun effet dans cette réaction.

Dans une deuxième expérience, divers traitements technologiques (acidification minérale AIV, addition de Kofa, préfanage) sont appliqués à une Luzerne et un Ray-Grass ensilés en silos de 1 m³. Les résultats montrent que les taux de dégradation des nitrates dans les ensilages qui ont reçu un conservateur, sont extrêmement variables et, pour le moment, imprévisibles car ils varient avec le fourrage, sa concentration initiale en nitrates, le développement bactérien et ses facteurs limitants.

INTRODUCTION

Des recherches sur le catabolisme des nitrates dans les ensilages ont été entreprises par PETERSON *et al.* (1958), SCALETTI *et al.* (1960 et 1965), MEISKE *et al.* (1965) à la suite d'accidents, parfois mortels pour les humains, constatés dans des exploitations agricoles, et dus à une intoxication par des oxydes d'azote (méthémoglobinémie). Ces auteurs ont montré que les oxydes d'azote qui s'échappent du silo, proviennent de la réduction rapide des nitrates du fourrage par la microflore, mais

ils n'ont pas cherché à préciser les espèces bactériennes en cause. Par ailleurs, ils ont constaté que l'addition de métabisulfite de sodium, qui modifie les orientations fermentaires, inhibe partiellement cette réaction.

Or, la conservation des nitrates dans l'ensilage peut présenter un danger, cette fois-ci pour le ruminant, en raison de leur réduction en nitrites par plusieurs espèces bactériennes du rumen (HOLTENIUS, 1957). On peut se demander dans quelle mesure des risques d'accidents peuvent apparaître pour les animaux avec une alimentation à base d'ensilage, si l'on tient compte de ce que la fertilisation azotée ne cesse actuellement de s'intensifier et peut, dans certaines conditions, provoquer l'accumulation de nitrates dans les fourrages verts (ALBERDA, 1965 ; HEDIN et DUVAL, 1963). De plus, l'emploi de silos étanches et de divers traitements technologiques tend à améliorer la qualité des ensilages, tout en modifiant l'activité de la microflore et, probablement aussi, l'intensité du catabolisme des nitrates pendant la conservation.

Par contre, les nitrites, qui représentent le premier stade du catabolisme des nitrates dans les ensilages (BARNETT, 1953), pourraient avoir un effet bénéfique sur la qualité du produit conservé, en inhibant la prolifération de plusieurs espèces de *Clostridium* (DUNCAN et FOSTER, 1968). Toutefois, leur incorporation dans certains conservateurs a conduit à des résultats variables et aucune preuve de leur efficacité *in situ* n'a encore été nettement rapportée (HELLBERG, 1967 ; WIERINGA, 1966).

Cette étude se propose de préciser les espèces bactériennes qui réduisent les nitrates dans les ensilages en recourant à des fourrages axéniques, gnotoxéniques et holoxéniques (la terminologie utilisée ci-dessous est celle proposée par RAIBAUD *et al.*, 1966) ; on évalue aussi l'intensité de cette réaction en fonction de divers traitements technologiques appliqués à une Luzerne et un Ray-Grass.

MATÉRIEL, ET MÉTHODES

1. — *Espèces bactériennes responsables de la réduction des nitrates*

Une luzerne (stade boutons floraux — 1 semaine avant floraison) et un Ray-Grass (épiaison non commencée) de première coupe, sont hachés puis ensilés dans des bocaux de 0,7 litre hermétiquement fermés. Les numéros de référence des bocaux et les traitements correspondants figurent dans le tableau 1. L'ensilage n° 1 sert de témoin holoxénique ; le contenu des autres bocaux est irradié sitôt après remplissage, la dose stérilisante (2 Mrad) étant déterminée par des essais préliminaires. Cette stérilité est contrôlée par des examens microscopiques en début et fin de conservation. L'ensilage n° 2 sert de témoin axénique et l'on inocule dans chacun des autres une souche bactérienne pure (ensilages n° 3 à 11 inclus) ou un mélange (n° 12) de chacune des espèces figurant au tableau 1. Les souches ont été isolées parmi les espèces qui dominent dans la microflore des ensilages, puis identifiées (la souche n° 5 correspond au « branching *lactobacillus* » décrit par LANGSTON et BOUMA, 1960). L'inoculum introduit 10^4 à 10^5 cellules ou 10^2 à 10^3 spores par gramme de fourrage, dans le cas des anaérobies sporulées (ensilages n° 9, 10, 11).

Après 100 jours de conservation à 22°C, le contenu de chaque bocal est vidé et soumis à l'échantillonnage en vue des analyses.

2. — *Influence du traitement technologique sur l'intensité de la dégradation des nitrates d'une Luzerne et d'un Ray-Grass*

Une Luzerne de 2^e coupe au stade début floraison et un Ray-Grass de 1^{re} coupe au stade épiaison, récoltés et hachés à l'ensileuse, sont tassés par piétinement dans des silos en béton, drainés, de 1 m³. Une doublure en plastique plaquée en surface par un couvercle en bois et une charge de 300 kg/m² assurent une parfaite couverture.

Pour le Ray-Grass, on emploie les traitements suivants : néant (ensilage témoin) ; acidification minérale par une solution AIV et par SO_4H_2 (7 éq. g/100 kg de fourrage) ; addition d'un mélange de nitrite de sodium et de formiate de calcium (Kofa) à raison de 0,3 et 0,7 p. 100 du poids brut, préfanage à un taux de matière sèche (MS) de 43 p. 100. A l'exception du préfanage, tous ces traitements sont appliqués simultanément à 3 lots de fourrage provenant de la même parcelle et récoltés l'un après l'autre.

L'échantillonnage du fourrage vert est effectué au fur et à mesure du remplissage des silos, alors que les échantillons d'ensilage sont prélevés à la sonde après 5 mois de conservation.

Les traitements expérimentés avec la Luzerne sont les suivants : néant (ensilage témoin) ; acidification par une solution AIV (17 éq. g/100 kg de fourrage) ; addition de Kofa et de Kofa avec chlorure de sodium à raison de 0,7 p. 100 du poids brut ; préfanage à un taux de matière sèche de 42 p. 100. A l'exception du préfanage, tous les traitements sont appliqués simultanément à un seul lot de fourrage.

Dans les deux expériences les nitrates sont dosés par la méthode décrite dans la partie I du présent mémoire, dans le fourrage initial et dans les ensilages ; ces derniers échantillons servent aussi aux analyses qui permettent de juger de la qualité des ensilages : pH, acides lactique, acétique et butyrique, azote ammoniacal. Les méthodes utilisées ont été décrites par GOUET *et al.*, 1965.

RÉSULTATS

1. — *Espèces bactériennes responsables de la réduction des nitrates* (tabl. 1)

La stérilité des ensilages axéniques (n° 2) a été confirmée par les examens microscopiques effectués en début et en fin de conservation. A l'exception de la souche n° 9 (*Clostridium* protéolytique), toutes les bactéries inoculées ont proliféré dans les deux fourrages, comme en témoignent les examens microscopiques et les pH en fin de conservation. Par ailleurs, une étude cinétique effectuée parallèlement (résultats non publiés) a confirmé que le développement bactérien était identique entre gnotoxéniques et holoxéniques et atteignait au stade de croissance maximum (2^e au 5^e jour) $5 \cdot 10^8$ à $5 \cdot 10^9$ bactéries/g de matière fraîche.

A la récolte, les concentrations en nitrates sont faibles et particulièrement dans le Ray-Grass (1 mg N-NO₃ p. 100 sec) ; elles sont cependant suffisantes pour mettre en évidence l'effet caractéristique de la souche bactérienne sur leur réduction. En fin de conservation, on retrouve dans les ensilages axéniques (n° 2) des concentrations de nitrates identiques à celles du fourrage vert. Dans les témoins holoxéniques (n° 1) la quasi-totalité des nitrates a disparu et les très faibles concentrations résiduelles sont inférieures à la sensibilité de la méthode de dosage utilisée. Il en est de même dans les ensilages monognotoxéniques de Luzerne et de Ray-Grass inoculés avec *Lactobacillus plantarum*, « branching *Lactobacillus* », *Enterobacter* sp., *Clostridium tyrobutyricum* et pour leur association dans l'ensilage polygnotoxénique (n° 12) de Luzerne. Par contre, *Lactobacillus brevis*, *Pediococcus* sp., *Streptococcus faecalis* et *Clostridium butyricum* n'ont aucune action sur les nitrates des deux fourrages.

Notons enfin que les nitrites n'ont jamais été trouvés en quantités suffisantes pour être dosés.

2. — *Intensité du catabolisme des nitrates en fonction des traitements technologiques appliqués à une Luzerne et un Ray-Grass* (tabl. 2 et 3)

Les concentrations en nitrates dans les deux espèces végétales étudiées sont faibles et des variations assez importantes sont observées entre lots de fourrage provenant d'une même parcelle. Pour les deux fourrages, 97 à 99,9 p. 100 des nitrates

ont disparu au cours de la conservation dans les ensilages témoins ; l'acidification minérale (AIV et SO_4H_2) réduit ces pertes en moyenne à 70 p. 100. Par contre, dans le cas du préfanage, les pertes sont beaucoup plus importantes pour le Ray-Grass (60 à 70 p. 100) que pour la Luzerne (11 à 40 p. 100), malgré des taux de matière

TABLEAU I

Espèces bactériennes responsables de la réduction des nitrates
pH et concentrations en nitrates de la Luzerne et du Ray-Grass
avant et après conservation par ensilage

	N° de référence des ensilages	Luzerne Taux initial de matière sèche 19,9 %		Ray-Grass Taux initial de matière sèche : 20,5%	
		pH	N- NO_3 mg % g sec	pH	N- NO_3 mg % g sec
Fourrage à la récolte.....	—		12,4		1,0
Ensilages :					
Holoxénique (témoin non traité) ..	1	6,30	0,1*	4,80	0,3*
Axénique (stérile)	2	5,50	13,4	5,85	0,9
Monoxéniques, inoculés avec :					
<i>Lactobacillus plantarum</i>	3	4,10	0,1*	3,80	0,3*
<i>Lactobacillus brevis</i>	4	4,50	11,4	4,10	0,9
« branching <i>Lactobacillus</i> »	5	4,20	0,1*	3,75	0,2*
<i>Streptococcus faecalis</i>	6	4,70	10,8	4,60	1,2
<i>Pediococcus</i> sp.	7	4,20	11,0	3,90	n.d.**
<i>Enterobacter</i> sp.	8	5,40	0,2*	5,30	0,5
<i>Clostridium</i> protéolytique	9	5,40	10,6	5,40	n.d.**
<i>Clostridium butyricum</i>	10	5,30	11,3	5,30	n.d.**
<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	11	5,10	0,2*	5,00	0,4*
Polygnotoxénique, ensemené avec les souches des ensilages n° 3 à 11 inclus	12	4,30	0,1*		

* Concentrations à la limite de la sensibilité de la méthode de dosage.

** Non dosés.

sèche très voisins (respectivement 42 et 43 p. 100). Cette différence entre fourrages est inversée et encore plus accentuée pour les ensilages avec 0,7 p. 100 de Kofa : pertes nulles pour le Ray-Grass et totales pour la Luzerne.

Les pertes de nitrates observées dans les ensilages d'une même série de traitements pour un fourrage donné, à l'exception des cas où elles voisinent 100 p. 100, sont très variables. On ne peut relier ces variations ni aux taux de matière sèche, parfois très différents, des fourrages, ni à la qualité des ensilages. Cette dernière est excellente pour le Ray-Grass et varie très peu selon les traitements : acide lactique : 7 à 10 p. 100 sec, acide acétique : 3 à 4 p. 100 sec, absence d'acide butyrique, N- NH_3 : 3 à 9 p. 100 de l'azote total. Les ensilages de Luzerne sont aussi de bonne qualité, mais leurs concentrations en acide lactique sont nettement inférieures à celles du Ray-Grass (2 à 5 p. 100 sec), et les taux d'acide acétique nettement supérieurs (5 à 6 p. 100 sec), à l'exception des ensilages AIV et préfanés (acide acétique :

TABLEAU 2

Intensité du catabolisme des nitrates en fonction des traitements technologiques appliqués à la Luzerne Concentrations en nitrates de la Luzerne à la récolte et ensilée, pertes pendant la conservation et qualité des ensilages

	N° des silos	P. 100 MS	N-NO ₃ mg % g sec	Pertes de N-NO ₃ en % de la quantité ensilés	pH	P. 100 sec		N-NH ₃ % N total
						Acide lactique	Acide acétique	
Fourrage à la récolte		22,3	16,5					
Ensilages								
Témoins non traités	1	19,3	0,2 *	99,9	5,10	1,60	6,40	11,4
AIV	2	20,7	0,2 *	99,9	4,95	3,12	5,44	11,2
Kofa (0,7 %)	3	21,4	6,3	64,8	3,50	2,56	2,64	5,1
Kofa (+ NaCl) (0,7 %)	4	21,5	6,2	65,3	3,20	2,40	1,62	5,9
Fourrage préfané	5	20,5	0,8	99,6	5,00	5,55	5,09	11,5
Ensilages	6	20,7	0,5	99,7	4,90	4,51	5,81	11,3
préfanés	7	20,0	0,2 *	99,9	4,90	2,40	5,71	11,1
préfanés	8	20,4	0,1 *	99,9	4,90	3,71	5,02	9,2
préfanés	9	43,5	28,6					
préfanés	10	40,0	18,8	39,7	4,50	3,90	1,59	7,3
préfanés		39,7	27,6	11,4	4,50	4,28	1,23	7,4

* Concentrations à la limite de la sensibilité de la méthode de dosage.

— Acide butyrique : néant.

TABLEAU 3

Intensité du catabolisme des nitrates en fonction des traitements technologiques appliqués à un Ray-Grass Concentrations en nitrates du Ray-Grass à la récolte et ensilé, pertes pendant la conservation et qualité des ensilages

	N° du lot de fourrage ou d'ensilage	P. 100 MS	N-NO ₃ mg % g sec	Pertes de N-NO ₃ n % de la quantité ensilée	pH	P. 100 sec		N-NH ₃ % N total
						Acide lactique	Acide acétique	
Fourrage à la récolte	1	17,3	7,1					
	2	18,5	8,4					
	3	24,3	14,4					
	a-b	42,7	7,1					
Fourrage préfané à la mise en silo. Ensilages	1	19,8	0,3 *	96,8	3,99	8,32	4,16	9,3
	2	19,4	0,2 *	98,2	4,14	8,51	4,38	7,5
	3	22,7	0,3 *	98,2	4,00	9,57	3,66	7,6
Témoins non traités	1	20,2	2,2	74,8	3,69	8,66	3,20	4,1
	2	20,6	1,8	82,4	3,64	9,02	3,25	4,1
	3	23,5	5,4	70,4	3,55	7,75	3,09	3,2
AIV	1	19,4	4,0	54,9	3,74	7,42	2,89	5,9
	2	20,5	2,4	76,1	3,59	8,44	2,70	4,3
	3	23,0	3,8	76,7	3,49	7,83	3,20	3,0
SO ₄ H ₂	1	22,0	7,2	18,1	3,97	9,62	3,75	5,5
	2	20,7	6,8	33,2	3,94	10,05	3,45	5,1
	3	25,2	7,3	58,0	3,92	9,61	3,49	5,5
Kofa (0,3 %)	1	21,9	9,4	3,9	4,04	9,12	3,74	6,7
	2	23,6	11,5	—	4,05	6,30	2,66	6,3
	3	26,2	17,5	2,7	4,00	8,50	2,99	6,5
Préfané	a	36,1	2,4	71,7	4,14	7,49	2,29	2,5
	b	36,2	3,1	61,1	4,13	6,85	1,59	3,6

* Concentrations à la limite de la sensibilité de la méthode de dosage.

— Acide butyrique : néant.

2 à 3 p. 100 sec) ; seul le témoin n° 1 contient une trace d'acide butyrique et les taux de N-NH₃ varient entre 5 et 11 p. 100 de l'azote total.

DISCUSSION

Avant qu'une démonstration globale de la réduction des nitrates par la microflore ait été apportée par PETERSON *et al.* (1958), BARNETT (1953) l'avait déjà attribuée à la seule espèce bactérienne *Escherichia coli*. Or, l'étude écologique (GOUET, 1966) de la microflore Gram négative des ensilages, prouve que la présence d'*Escherichia coli* ou d'autres espèces d'entérobactéries (*Aerobacter*) dans les ensilages humides de bonne qualité est généralement très éphémère (24 heures) et que leur nombre est faible (10⁵-10⁷/g). Nos résultats *in situ* montrent que les nitrates peuvent être réduits par des espèces dominantes appartenant à la microflore lactique et parfaitement implantées (GOUET *et al.*, 1965) telles que *L. plantarum* et « branching *Lactobacillus* ». Ceci n'exclut pas toutefois, que dans les ensilages holoxéniques, d'autres genres dominants ou non, y soient aussi associés (*Enterobacter*, *Clostridium*).

Dans les ensilages témoins que nous avons analysés, et où aucun traitement n'est venu modifier l'équilibre de la microflore, la disparition des nitrates est totale ; des résultats voisins (83-93 p. 100 de pertes de nitrates) ont été observés par WISEMAN et JACOBSON (1965), pour les ensilages non traités d'herbe, contenant à la récolte 0,2 p. 100 de N-NO₃ dans la matière sèche. Mais il en serait peut être différemment si la concentration en nitrates dépassait les possibilités de métabolisation de la microflore, comme le suggèrent les résultats de MIYAZAKI et ISHIDA (1968) ; ces auteurs rapportent des pertes variables (2 à 60 p. 100) pour des ensilages de maïs contenant au départ 0,5 à 1,4 p. 100 de N-NO₃ dans la matière sèche. L'effet de l'acidification se retrouve sur les deux fourrages étudiés ; la dégradation des nitrates est moins importante que dans les témoins, mais reste néanmoins voisine de 70 p. 100 et doit être attribuée à l'activité de la microflore lactique dont le développement n'est pas inhibé aux faibles pH de ces ensilages. Par contre, en présence de Kofa et quelle que soit la dose employée, les résultats obtenus sont opposés selon qu'il s'agit de Luzerne (disparition totale) ou de Ray-Grass (disparition partielle ou nulle). Pourtant, la fermentation lactique a été nettement plus intense dans le Ray-Grass ; en fait, nous savons que *L. brevis*, qui ne réduit pas les nitrates, domine dans les ensilages de Ray-Grass (résultats non publiés) alors qu'il est moins important dans la Luzerne où *L. plantarum* le remplace (GOUET *et al.*, 1965).

Ces résultats prouvent donc que les taux de dégradation des nitrates, dans les ensilages qui ont reçu un conservateur, sont extrêmement variables et pour le moment imprévisibles car ils varient avec le fourrage, sa concentration initiale en nitrates, le développement bactérien, et ses facteurs limitants. Ainsi, le préfanage, en abaissant notablement le taux de croissance bactérienne et la croissance maximale (GOUET *et al.*, 1965) conduit à la préservation partielle des nitrates dans les deux fourrages conservés par ensilage.

Enfin, la qualité de tous les ensilages est très satisfaisante et nos résultats ne permettent donc pas de savoir si l'apport de nitrites par le Kofa peut favoriser la conservation. De plus, il est peu probable que l'absence de fermentation butyrique

dans les ensilages témoins soit due à l'effet des nitrites (DUNCAN et FOSTER, 1968) provenant de la réduction des faibles quantités de nitrates dans les fourrages. Ce, en particulier dans le cas du Ray-Grass, dont le pH est suffisamment acide (4,0-4,1) pour provoquer la dissociation des nitrites au fur et à mesure de leur formation, tandis que le développement des *Clostridium* a souvent lieu après plusieurs semaines ou plusieurs mois de conservation (GOUET *et al.*, 1965).

En conclusion, la présence de nitrates en concentrations importantes dans les fourrages à ensiler, risque de présenter plus de danger pour les ruminants que d'efficacité vis-à-vis de la qualité de l'ensilage. Dans le cas de fortes fumures azotées on pourrait même envisager à la mise en silo, un traitement systématique par des bactéries lactiques nitratase positives.

Reçu pour publication en avril 1971.

SUMMARY

NITRATES IN FRESH AND ENSILED FORAGES

II. — ORIGIN OF NITRATES CATABOLISM AND EFFECT OF CONSERVATION TREATMENTS ON NITRATE DEGRADATION IN SILAGE

In a first experiment, holoxenic, axenic and gnotoxenic Lucerne and Ryegrass silages were prepared. For the latter, the forages were sterilized by gamma irradiation (3 Mrad) and, for gnotoxenic silages, inoculated with bacterial species known to the dominant in silage microflora. It is shown that *L. plantarum*, « branching *Lactobacillus* », *Enterobacter* and *Cl. tyrobutyricum* are responsible for nitrate reduction, while *L. brevis*, *Str. faecalis*, *Pediococcus*, *Cl. butyricum* and plant enzymes alone, have no effect on this degradation.

In a second experiment, Lucerne and Ryegrass were ensiled in 1 m³ silos with either mineral acidification, Kofa addition or wilting as conservation treatments, and compared with control untreated forages.

The nitrate losses recorded varied on a wide range and were always the highest in untreated silages. Our results are discussed with special reference to the factors influencing bacterial development.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ALBERDA W., 1965. The influence of temperature, light intensity and nitrate concentration on dry matter production and chemical composition of *Lolium perenne* L. *Neth. J. Agric. Sci.*, **13**, 335-360.
- BARNETT A. J. G., 1953. The reduction of nitrate in mixtures of minced grass and water. *J. Sci. Fd. Agric.*, **4**, 92-96.
- DUNCAN C. L., FOSTER E. M., 1968. Effect of sodium nitrite, sodium chloride, and sodium nitrate on germination and outgrowth of anaerobic spores. *Appl. Microbiol.*, **16**, 406-411.
- GOUET Ph., Nathalie FATIANOFF, ZELTER S.-Z., Michelle DURAND, CHEVALIER R., 1965. Influence de l'élévation du taux de matière sèche sur l'évolution biochimique et bactériologique d'une luzerne conservée par ensilage. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, **5**, 79-100.
- GOUET Ph., 1966. The evolution of Gram-negative microflora in direct harvested and wilted alfalfa silages. *Proc. Xth Int. Grassl. Cong. Helsinki*, **2**, 533-536.
- HÉDIN L., DUVAL E., 1963. Recherches sur la présence des nitrates dans les plantes fourragères et prairiales. *Ann. Physiol. vég.*, **5**, 29-49.
- HELLBERG A., 1967. A combination of nitrite and hexamine as an additive in the ensiling of herbage. *J. British Grass. Soc.*, **22**, 289-297.
- HOLTENIUS P., 1957. Nitrite poisoning in sheep with special reference to the detoxification of nitrite in the rumen. *Acta. Agric. Scand.*, **7**, 113-163.
- LANGSTON C. W., BOUMA C., 1960. A study of the microorganisms from grass silage. II. The lactobacilli. *Appl. Microbiol.*, **8**, 223-233.

- MEISKE J. C., PROUTY R. M., SCHUMAN L. M., SCALETTI J. V., 1965. Effects of sodium bisulfite additions to corn silages. *J. Anim. Sci.*, **24**, 705-709.
- MIYAZAKI A., ISHIDA N., 1968. Disappearance of nitrate in forage crops during the ensiling process. *Jap. J. Zootec. Sci.*, **39**, 313-318.
- PETERSON W. H., BURRIS R. H., SANT R., LITTLE H. N., 1958. Production of toxic gas (nitrogen oxides) in silage making. *J. Agric. Fd. Chem.*, **6**, 121-126.
- RAIBAUD P., DICKINSON A. B., SACQUET E., CHARLIER M., MOCQUOT G., 1966. La microflore du tube digestif du rat. IV. Implantation contrôlée chez le rat gnotobiotique de différents genres microbiens isolés du rat conventionnel. *Ann. Inst. Pasteur*, **111**, 193-210.
- SCALETTI J. V., GATES C. E., BRIGGS R. A., SCHUMAN L. M., 1960. Nitrogen dioxide production from silage. I. Field survey. *Agron. J.*, **52**, 369-372.
- SCALETTI J. V., JEZESKI J. J., GATES C. E., SCHUMAN L. M., 1965. Nitrogen dioxide production from silage. II. Detailed field survey. *Agron. J.*, **57**, 65-67.
- WIERINGA C. W., 1966. The influence of nitrates on silage fermentation. *Proc. Xth Grassl. Cong. Helsinki*, **2**, 537.
- WISEMAN H. G., JACOBSON W. C., 1965. Determination of nitrate in silage and forage. *J. Agric. Fd. Chem.*, **13**, 36-39.
-