

Effets de trois sources azotées sur le microbiote ruminal et la digestion chez le taurillon

GRIMM P. (1), CHANUDET M. (1), OMPHALIUS C. (1), LAZA KNOERR A-L. (2), POINT S. (2), JULLIAND S. (1)

(1) Lab To Field, 26 boulevard Docteur Petitjean, BP 87999, 21079 DIJON Cedex, France

(2) Agro Innovation International, 18 avenue Franklin Roosevelt, 35400 Saint Malo, France

RESUME – Une bonne synchronisation des apports énergétiques et protéiques permet d'optimiser le fonctionnement de l'écosystème ruminal. Pour ce faire, l'urée (source azotée alternative au tourteau de soja) peut être protégée afin d'obtenir une libération lente de l'azote dans le rumen. Un essai sur 8 taurillons, en carré latin 4 x 4 incomplet (périodes de 21 jours – de J1 à J21), a été mis en place pour tester l'effet de 3 sources azotées (tourteau de soja, urée non protégée, urée protégée par un complexe d'aluminosilicates) sur l'écosystème ruminal et la digestion de la ration. Quarante pourcents du tourteau de soja de la ration contrôle ont été substitués par de l'urée non protégée (ration UNP) ou par de l'urée à libération lente (ration ULL), en conservant des rations iso-énergétiques et iso-azotées. Les poids des animaux et l'ingestion individuelle quotidienne ont servi à calculer l'efficacité alimentaire. A J21, des prélèvements ruminiaux et sanguins ont été réalisés en cinétique avant le repas (T0), 3h, 6h et 9h après le repas (T3, T6 et T9, respectivement). A chaque temps, le pH ruminal, les concentrations ruminales d'acides gras volatils, de lactate, d'ammoniac et l'urémie ont été mesurés. A T6, la structure et la diversité bactériennes de l'écosystème ruminal ont été analysées par séquençage de l'ADNr 16S et les groupes fonctionnels cellulolytiques et xylanolytiques ont été dénombrés par techniques culturales. La digestibilité totale apparente des constituants de la ration a été mesurée par collecte de fèces de J18 à J20. La taille des particules et la matière sèche des fèces ont été mesurées à J21. Les données ont été analysées par une PROC MIXED (SAS) en considérant les effets Ration, Période et leur interaction pour les paramètres à mesure unique et en ajoutant les effets Temps et l'interaction TempsxRation pour les paramètres mesurés en cinétique. La concentration ruminale en ammoniac était significativement supérieure à T3 ($P_{\text{Temps} \times \text{Ration}} = 0,02$) et le pH ruminal tendait à être supérieur ($P_{\text{Ration}} = 0,08$) dans les deux rations contenant de l'urée, suggérant un environnement plus tamponné avec l'urée. L'urémie retrouvait une valeur basale à T9 avec la ration Contrôle mais pas dans le cas des rations UNP et ULL ($P_{\text{Temps} \times \text{Ration}} < 0,001$), ce qui démontrait une utilisation prolongée de l'azote avec des formes synthétiques d'urée. La concentration ruminale d'ammoniac et le pH supérieurs à T6 avec la ration ULL ont confirmé la disponibilité plus longue de l'azote avec l'urée protégée, favorable au fonctionnement de l'écosystème ruminal. Une plus forte diversité bactérienne était d'ailleurs observée chez les animaux recevant la ration ULL (indice de Shannon supérieur ; $P = 0,04$), mais la structure de l'écosystème bactérien ruminal semblait peu impactée par les différentes formes d'azote apportées. Une proportion significativement plus élevée de petites particules fécales ($P = 0,01$) et des augmentations numériques de l'efficacité alimentaire et de la digestibilité des fibres suggéraient une meilleure fibrolyse avec la ration ULL. Les concentrations ruminales en acides gras volatils plus faibles avec la ration ULL pourraient refléter une meilleure absorption de ces métabolites avec cette ration, et expliquer les modifications zootechniques observées.

Effects of three nitrogen sources on ruminal fermentation and digestion in beef steers

GRIMM P. (1), CHANUDET M. (1), OMPHALIUS C. (1), LAZA KNOERR A-L. (2), POINT S. (2), JULLIAND S. (1)

(1) Lab To Field, 26, boulevard Docteur Petitjean, BP 87999, 21079 DIJON Cedex

SUMMARY – Enhancing the ruminal ecosystem activity requires a good synchronization of energy and protein intakes. Urea (an alternative nitrogen source to soybean meal) can be protected to procure a slow-released source of nitrogen in the rumen. Eight beef steers were used to compare the effects of 3 nitrogen sources (soybean meal, standard urea and slow-release urea protected by aluminosilicate complexes) on ruminal microbiota, rumen fermentation end-products and nutrient digestibility in a 4x4 Latin square design (21-days periods, from D1 to D21). Forty percent of the soybean meal in the control diet was replaced with unprotected urea (UNP diet) or slow-release urea (ULL diet), maintaining iso-energetic and iso-nitrogenous intakes. Animal weights and daily individual intake were used to calculate feed efficiency. At D21, ruminal content and blood samples were collected before the meal (T0), 3h, 6h and 9h after the meal (T3, T6, and T9, respectively). At each time, ruminal pH, ruminal concentrations of volatile fatty acids, lactate and ammonia, and uremia were measured. At T6, bacterial structure and diversity were analyzed by 16S rDNA sequencing and cellulolytic and xylanolytic functional groups were enumerated by cultural techniques. Nutrients digestibility was estimated from feces collection from D18 to D20. Fecal particles size and dry matter were measured on D21. Data was analyzed with a PROC MIXED (SAS) by considering diet, period effects and their interaction for the single measurement parameters, and included time effects and TimexDiet interaction for the parameters measured in kinetics. Ruminal ammonia concentration was significantly higher at T3 ($P_{\text{Time} \times \text{Diet}} = 0.02$) and ruminal pH tended to be higher ($P_{\text{Diet}} = 0.08$) in urea diets, suggesting a more buffered environment with urea. Uremia got down to its initial value at T9 with the Control diet but not with UNP and ULL diets ($P_{\text{Time} \times \text{Diet}} < 0.001$), which demonstrated a prolonged use of nitrogen with synthetic forms of urea. Higher ruminal ammonia concentration and pH at T6 with ULL diet confirmed the longer availability of nitrogen with protected urea, which is favorable to the proper functioning of ruminal ecosystem. Higher bacterial diversity was also observed in animals fed ULL diet (higher Shannon index; $P = 0.04$), but the nitrogen source seemed to carry little effects on the structure of ruminal bacterial ecosystem. A significantly higher proportion of small particles in the faeces ($P = 0.01$) and numerical increases in feed efficiency and fiber digestibility could indicate a better fibrolysis with the ULL diet. The lower ruminal concentrations of volatile fatty acids with the ULL diet could reflect a better absorption of these fermentation end-products and explain the zootechnical modifications that were observed.

INTRODUCTION

Chez le bovin, une bonne synchronisation des apports en énergie et en azote est essentielle au fonctionnement correct des micro-organismes ruminiaux (Nocek et Russel 1988) et à l'optimisation de la digestibilité de la ration. En France, dans les rations des taurillons à l'engraissement, un correcteur

azoté est fréquemment apporté, souvent formulé à partir de tourteau de soja. Il représente une proportion importante du coût de la ration. En plus de son impact économique, l'utilisation de tourteau de soja peut poser des problèmes environnementaux liés notamment au transport intercontinental et aux excréments d'azote provoqués par des apports azotés excessifs. L'une des alternatives à l'utilisation

massive du tourteau de soja est de substituer une fraction des apports par une source d'azote dégradable dans le rumen telle que l'urée (Storm et Ørskov, 1983). Dès les années 70, Kropp et al. (1977) ont montré, sur des bovins à l'engraissement, que la substitution de tourteau de soja par de l'urée pouvait favoriser la synthèse de protéines microbiennes dans le rumen. Cependant, l'hydrolyse de l'urée en ammoniac (NH_3) par les bactéries uréolytiques est très rapide et la quantité de NH_3 produit peut dépasser la capacité des micro-organismes ruminants à l'utiliser pour leur croissance. L'accumulation de NH_3 dans le rumen puis dans le sang peut entraîner un excès d'azote excrété dans l'environnement sous forme polluante et une toxicité pour l'animal (Patra et Aschenbach, 2018). Ainsi, une libération lente de l'urée est recherchée pour ralentir l'activité uréolytique et assurer une production continue de NH_3 pour les micro-organismes ruminants. Cela améliorerait le fonctionnement de l'écosystème ruminal (Alvarez-Almora et al., 2012). La formation de complexes organiques-inorganiques à base d'urée et d'un composé minéral (Ca, Huntington et al., 2006 ; CaSO_4 , Cherdthong et al., 2010) est utilisée pour ralentir la dégradation de l'urée par les micro-organismes ruminants et ainsi assurer sa libération lente.

L'objectif de cet essai était de comparer *in vivo* les effets de différentes sources azotées (tourteau de soja, urée non protégée et urée protégée des dégradations ruminales par un complexe d'aluminosilicates) sur la composition et l'activité du microbiote ruminal et sur la digestion de la ration.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. ANIMAUX, SCHEMA EXPERIMENTAL ET RATIONS

Huit taurillons charolais âgés de 12 à 14 mois (349 ± 48 kg) ont été inclus dans un essai en carré latin 4×4 , constitué de quatre périodes expérimentales (P1 à P4) de 21 jours. Ils étaient logés et conduits individuellement.

Quatre rations différentes ont été calculées individuellement, sur la base du poids visé en milieu d'essai, avec un gain moyen quotidien (GMQ) cible de 1,2 kg/jour, afin de couvrir les besoins énergétiques et protéiques des taurillons selon les recommandations INRA (2007). Les rations ont été calculées pour être quasiment iso-énergétiques, iso-azote et iso-matière sèche (MS). La ration Contrôle était composée d'ensilage de maïs (67% MSI), de blé tendre (18% MSI), de tourteau de soja 48 (14% MSI) et d'un aliment minéral (1% MSI). Quarante pourcents du tourteau de soja étaient remplacés par de l'urée non protégée (UNP) dans la ration UNP ou par une urée à libération lente (ULL) dans la ration ULL (Tableau 1). La quatrième ration constituant le carré latin ne sera pas présentée car confidentielle. Le correcteur azoté a été progressivement introduit dans les rations sur une période de 7 jours au début de chaque période expérimentale. Les rations ont été distribuées individuellement, au cornadis, en deux repas égaux à 8h et 16h15. Les refus ont été retirés et pesés après chaque repas.

1.2. PRELEVEMENTS ET ANALYSES

Durant chaque période, les animaux ont été pesés toutes les semaines afin de suivre l'évolution de leur GMQ. Ces pesées, couplées à la pesée quotidienne des refus ont servi à calculer l'efficacité alimentaire. A la fin de chaque période expérimentale, des fèces fraîchement émises ont été collectées au sol matin et soir pendant trois jours (J18 - J20) pour chaque individu afin d'évaluer la digestibilité totale apparente de la ration. La taille des particules (sur tamis 2 mm ; 1 mm ; 0,5 mm et 0,25 mm) et la MS des fèces ont été mesurées à J21. A J21 des prélèvements ruminants (intubation oro-ruminale) et sanguins (veine caudale) ont été réalisés en cinétique : avant le repas (T0), puis à 3h, 6h et 9h

Tableau 1 : Composition et apports des rations testées

	Ration « Contrôle »	Ration « UNP »	Ration « ULL »
Composition (kg matière brute/j)			
Ensilage de maïs	13,7	13,7	13,7
Blé	1,37	1,37	1,37
Tourteau soja	1,05	0,63	0,63
Produits testés	-	0,11	0,22
CMV	0,15	0,15	0,15
Apports nutritionnels			
MS ingérée (kg/j)	6,92	6,65	6,76
UFV (UFV/j)	6,85	6,42	6,59
PDIN (g/j)	674	707	689
PDIE (g/j)	727	633	633
Amidon (g/j)	2156	2153	2153

après le repas (T3, T6, T9, respectivement). A chaque temps, le pH ruminal, l'activité microbienne [concentrations en acides gras volatils (AGV), en D- et L-lactate et en NH_3] et l'urémie ont été mesurés. A T6, les bactéries anaérobies totales, xylanolytiques et cellulolytiques du contenu ruminal ont été dénombrées par techniques culturales sous anaérobiose. La structure et la diversité bactériennes ont été analysées par séquençage (Illumina Miseq) après extraction et amplification de la région V3-V4 de l'ADN codant pour l'ARNr 16S. Les séquences ont été affiliées par le pipeline Metabiote® développé par GenoScreen.

Les données ont été analysées par une ANOVA selon un modèle mixte à l'aide du logiciel SAS (PROC MIXED). Les effets de la Ration, de la Période et de leur interaction ont été testés pour les paramètres à mesure unique. Le paramètre « Période » a été défini en intercept pour chaque bovin. L'effet du Temps (point de cinétique) et de l'interaction entre le Temps et la Ration (Temps×Ration) ont été ajoutés au modèle pour les paramètres mesurés en cinétique. Le seuil de significativité a été fixé à $P \leq 0,05$ et les tendances ont été considérées à $0,05 < P \leq 0,1$. Dans la partie Résultats, seuls les effets de l'interaction Temps×Ration et ceux de la Ration seront présentés.

2. RESULTATS

2.1. ECOSYSTEME RUMINAL

A T6, l'indice de richesse (nombre d'unités taxonomiques opérationnelles observées) n'était pas impacté uniquement par le régime ($P_{\text{Période} \times \text{Ration}} = 0,009$). En revanche, l'indice de diversité bactérienne (Shannon) était significativement plus élevé chez les animaux recevant la ration ULL en comparaison de la ration Contrôle (Contrôle : 6,41 ; UNP : 6,50 ; ULL : 6,72 ; $P = 0,04$).

Chez les taurillons consommant la ration ULL, les abondances relatives du phylum TM7 et de la famille F16 comprise dans ce phylum étaient significativement plus grandes (Contrôle : 0,36 ; UNP : 0,37 ; ULL : 0,53 ; $P = 0,04$), et l'abondance relative de la classe Deltaproteobacteria tendait également à être plus importante ($P = 0,07$) en comparaison des deux autres rations. L'abondance relative de la famille Paraprevotella tendait à être supérieure avec la ration ULL en comparaison de la ration Contrôle ($P = 0,09$). Chez les taurillons consommant la ration UNP, les abondances relatives du phylum des Firmicutes et de la classe Clostridia tendaient à être plus faibles par rapport aux deux autres rations ($P = 0,06$).

A T6, les concentrations en bactéries anaérobies totales ($P = 0,13$), xylanolytiques ($P = 0,15$) et cellulolytiques ($P = 0,64$) n'étaient pas significativement différentes selon les rations consommées.

Les concentrations en AGV totaux et en acétate (C2) diminuaient significativement avec la ration ULL à T6 uniquement (interaction $P_{Temps \times Ration} \leq 0,04$, Figure 1). Les concentrations en isobutyrate diminuaient significativement (iC4, $P_{Ration} = 0,04$) et celles en butyrate tendaient à diminuer (C4, $P_{Ration} = 0,09$) avec la ration ULL par rapport à la ration Contrôle (en mmol/L, Contrôle : 11,20 et 0,68 ; UNP : 9,96 et 0,61 ; ULL : 9,75 et 0,57, pour C4 et iC4 respectivement).

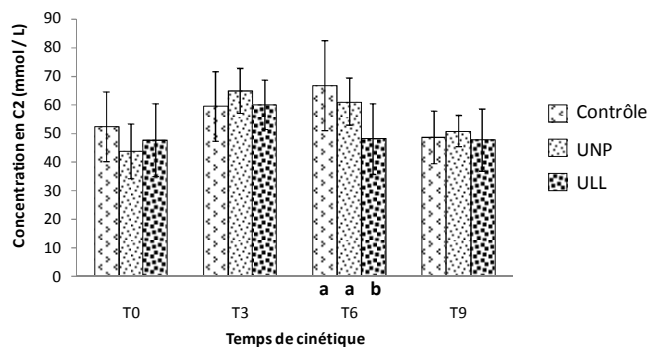


Figure 1 - Variations des concentrations ruminales en C2 en fonction de la ration et du temps.

Des lettres différentes indiquent des concentrations significativement différentes entre les rations à un temps donné.

La concentration en NH_3 était significativement supérieure à T3 dans les rations UNP et ULL par rapport à la ration Contrôle, tandis qu'à T6 seule la ration ULL présentait une concentration en NH_3 supérieure à la ration Contrôle ($P_{Temps \times Ration} = 0,02$, Figure 2).

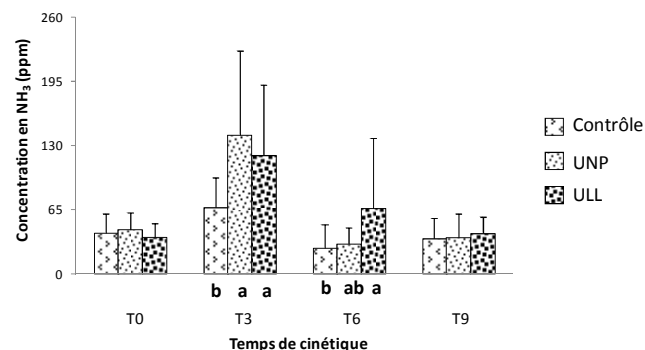


Figure 2 - Variations des concentrations ruminales en NH_3 en fonction de la ration et du temps.

Des lettres différentes indiquent des concentrations significativement différentes entre les rations à un temps donné.

Le pH ruminal tendait à augmenter avec les rations UNP et ULL par rapport à la ration Contrôle (Contrôle : 6,78 ; UNP : 6,88 ; ULL : 6,90 ; $P_{Ration} = 0,08$).

2.2. UREMIE

La concentration sanguine en urée retrouvait une valeur basale à T9 avec la ration Contrôle, tandis que les concentrations à T9 étaient significativement supérieures à celles à T0 avec les rations UNP et ULL ($P_{Temps \times Ration} < 0,001$, Figure 3). Quel que soit le temps, l'urémie était significativement différente entre les rations : elle était la plus haute avec la ration UNP et la plus basse avec la ration Contrôle (en mmol/L, Contrôle : 3,31 ; UNP : 5,31 ; ULL : 4,47).

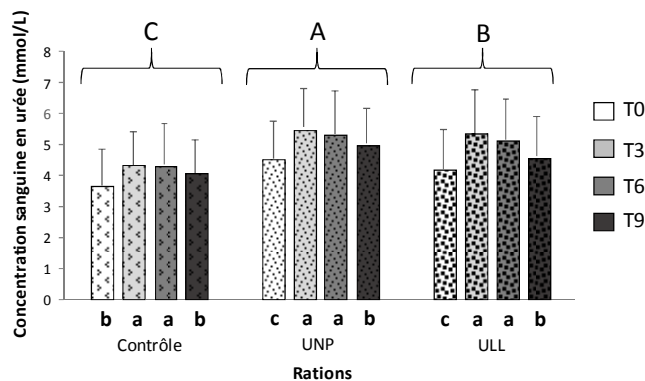


Figure 3 - Variations de l'urémie en fonction de la ration et du temps.

Des lettres minuscules différentes indiquent des concentrations significativement différentes entre les temps au sein d'une ration. Des lettres majuscules différentes indiquent des concentrations significativement différentes entre rations.

2.3. DIGESTIBILITE

Aucune variation significative des digestibilités totales apparentes des différents constituants de la ration n'a été observée selon la ration administrée ($P > 0,17$).

2.4. PARAMETRES FECAUX

La MS des fèces n'a pas varié significativement entre les différentes rations ($P = 0,19$). Une proportion plus élevée de particules entre 0,5 et 1 mm tendait à être observée dans les fèces avec la ration UNP par rapport à la ration ULL ($P = 0,10$) et une proportion significativement plus élevée était observée pour les particules de taille inférieure à 0,25 mm avec la ration ULL par rapport à la ration UNP ($P = 0,01$).

2.5. PARAMETRES ZOOTECHNIQUES

Le GMQ et l'efficacité alimentaire n'ont pas significativement varié selon la ration consommée ($P > 0,12$).

3. DISCUSSION

A notre connaissance, cette étude est la première à comparer les effets de 3 sources azotées sur le fonctionnement de l'écosystème ruminal du taurillon lors d'un essai *in vivo*, grâce à une approche globale et compréhensive.

L'une des hypothèses était que la substitution du tourteau de soja par de l'urée fournirait de l'azote plus dégradé, facilement utilisable par les micro-organismes. En effet, les concentrations en NH_3 étaient supérieures à T3 dans les rations contenant des urées de synthèse par rapport à la ration avec le tourteau de soja, conférant au rumen un environnement plus tamponné. Cela était confirmé par des valeurs de pH supérieures observées dans les rations UNP et ULL. De plus, le retour de l'urémie à sa valeur basale avec la ration Contrôle par rapport aux rations UNP et ULL reflétait une utilisation plus rapide de l'azote lorsque ce dernier était fourni par une matière première comme le tourteau de soja et non sous forme d'urée. Cela pourrait s'expliquer par le fait que l'urée de synthèse est hydrolysée en NH_3 plus lentement que l'urée issue de l'alimentation (Kang et al., 2015), permettant ainsi une utilisation prolongée de l'azote par les micro-organismes du rumen. Les différences observées dans cet essai en substituant du tourteau de soja par une urée de synthèse (protégée ou non) sont cohérentes avec les résultats précédemment obtenus (Benedeti et al., 2014 ; Spanghero et al., 2017).

Une seconde hypothèse était qu'un complexe d'alumino-silicates permettrait une libération lente de l'urée dans le rumen en la protégeant des dégradations bactériennes. Cela conférerait à l'écosystème ruminal un environnement favorable au fonctionnement des micro-organismes.

Plusieurs indicateurs ont permis de mettre en évidence cette libération lente de l'urée testée dans la ration ULL. Cet effet prolongé de l'utilisation de l'urée était visible sur les concentrations en NH₃ qui étaient supérieures avec la ration ULL à T6 par rapport aux deux autres rations. Ceci se reflétait sur le pH ruminal qui semblait revenir à sa valeur basale dès T6 avec la ration ULL, bien que l'interaction Temps×Ration ne soit pas ressortie significative pour ce paramètre. L'urémie inférieure dans la ration ULL par rapport à la ration UNP indiquait également une libération lente cohérente avec des études antérieures (Gardinal et al., 2017). Ces effets amplifiés et prolongés des urées protégées des dégradations ruminales ont déjà été évoqués dans la littérature (Benedeti et al., 2014) et confirment que la forme d'urée testée dans la ration ULL a une libération lente. Ainsi, la substitution du tourteau de soja par de l'urée à libération lente semblait rendre l'environnement ruminal plus propice à la croissance et à l'activité bactériennes, grâce à un apport prolongé de NH₃ et un meilleur effet tampon sur le pH ruminal. Ceci est conforté par la plus forte diversité bactérienne observée chez les animaux recevant la ration ULL. La composition bactérienne semblait cependant avoir été peu impactée par les différentes formes d'azote. De manière intéressante, une modification de l'abondance relative du phylum TM7 avait également été rapportée dans une étude ayant testé l'effet d'une supplémentation avec deux doses différentes d'urée non protégée sur la structure et la diversité bactériennes (Zhou et al., 2017). Dans cette étude, l'abondance relative des TM7 diminuait avec l'augmentation de l'urée dans la ration. Bien que nos résultats ne soient pas comparables, il pourrait néanmoins être supposé que le phylum TM7 joue un rôle dans les fermentations azotées.

Avec la ration ULL, hormis l'augmentation de l'abondance relative de la famille Paraprevotella qui pourrait contenir des espèces xylanolytiques (Morotomi et al., 2009), aucune augmentation des représentants fibrolytiques n'a été observée, ni par culture, ni par séquençage. Pourtant, les plus petites particules fécales observées dans les fèces des animaux recevant la ration ULL suggèrent une meilleure fibrolyse avec cette ration. Cette hypothèse est étayée par des augmentations numériques de l'efficacité alimentaire (+16 % et +23 % par rapport aux rations Contrôle et UNP respectivement) et donc du GMQ, et par une meilleure digestibilité totale apparente numérique des fibres par rapport à la ration Contrôle (+18 % et +8 % pour dNDF et dADF respectivement). La composition bactérienne a été évaluée à T6 uniquement. Or, il est probable que l'augmentation de la concentration en bactéries fibrolytiques ait eu lieu plus tard après l'ingestion du repas (Morais et Mizrahi, 2019) ou que seule leur activité ait été modifiée. De plus, la digestion des fibres chez le ruminant se poursuivant dans le gros intestin, la meilleure digestion des fibres supposée avec la ration ULL pourrait être expliquée également par une fibrolyse plus importante dans le cæcum ou le côlon des taurillons.

Enfin, les concentrations ruminales en AGV mesurées avec la ration ULL étaient plus faibles (AGV totaux et C2 à T6 ; C4 et iC4 quel que soit le temps) et pourraient suggérer une meilleure absorption de ces métabolites avec cette ration. Ceci pourrait expliquer le fait qu'une meilleure efficacité alimentaire soit observée avec la ration ULL par rapport aux deux autres rations.

CONCLUSION

Cet essai *in vivo* a permis de montrer que la substitution de tourteau de soja par de l'urée (protégée ou non) favorisait l'activité de l'écosystème ruminal mais n'avait pas d'impact majeur sur la composition bactérienne. La technologie de protection de l'urée par un complexe d'aluminosilicates semblait efficace pour assurer une libération lente de l'azote utilisable par les micro-organismes dans le rumen. De plus, cette technologie pourrait améliorer la digestion des fibres et l'absorption des produits de fermentation dans le rumen. Des études complémentaires restent nécessaires pour valider ces hypothèses et élucider les mécanismes impliqués.

- Alvarez-Almora, E., Huntington, G., Burns, J., 2012.** Anim. Feed Sc. Technol. 171 : 136-145.
- Benedeti, P., Paulino, P., Marcondes, M., Valadares Filho, S., Martins, T., Lisboa, E., Silva, L., Teixeira, C., Duarte, M., 2014.** Livestock Sc. 165 : 51-60.
- Cherdthong, A., Wanapat, M., Wachirapakorn, C., Van Amburgh, M., 2010.** In Proceedings of the Agriculture Conference 11th. Khon Kaen, Thaïlande. 138-141.
- Gardinal, R., Calomeni, G., Cônsolo, N., Takiya, C., Freitas, J., Gandra, J., Vendramini, T., Souza, H., Renno, F., 2017.** Asian-Australas. J. Anim. Sci. 30(1) : 34-41.
- Huntington, G., Harmon, D., Kristensen, N., Hanson, K., Spears, J., 2006.** Anim. Feed Sc. Technol. 130 : 225-241
- Kang, S., Wanapat, M., Phesatcha, K., Norrapoke, T., 2015.** Trop. Anim. Health Prod. 47(4) : 671-679.
- Kropp, J., Johnson, R., Males, J., Owens, F., 1977.** J. Anim. Sci. 45(4) : 837-843.
- Morais, S., Mizrahi, I., 2019.** FEMS microbiol. Rev. 43 (4) : 362-379.
- Morotomi, M., Nagai, F., Sakon, H., Tanaka, R., 2009.** Int. J. Syst. Evol. Micr. 59 (8) : 1895-1900.
- Nocek, J., Russell, J., 1988.** J. Dairy Sc. 71 : 2070-2107
- Patra, A., Aschenbach, J., 2018.** J. Adv. Res. 13: 39-50
- Spanghero, M., Mason, F., Zanfi, C., Nikulina, A., 2017.** Livestock Sc. 196 : 14-21.
- Storm, E., Ørskov, E. 1983.** Br. J. Nutr. 50 : 463-470.
- Zhou, Z., Meng, O., Li, S., Jiang, L., Wu, H., 2017.** Appl. Microbiol. Biotechnol. 101(15) : 6205-6216.