

# FACTORES DE RIESGO DE CONTAMINACIÓN DE LA LECHE CON BACTERIAS ESPORULADAS (*CLOSTRIDIUM*) EN ESTABLECIMIENTOS LECHEROS DE LA PROVINCIA DE SANTA FE

THOMAS, J.<sup>1</sup>; DALLA FONTANA, L.<sup>1</sup>; RAMOS, E.<sup>2</sup>; THOMAS, J.<sup>2</sup>; DEMARIA, M.<sup>2</sup>;

COSTAMAGNA, D.<sup>3</sup>; FAGGIANO, M.<sup>3</sup> & BONZI, E.<sup>1</sup>

## RESUMEN

Un estudio exploratorio de contaminación en leche de tanque con esporulados (*Clostridium*) en 20 tambos (Pcia. de Santa Fe), con silaje la mayor parte del año (2 muestreos/tambo, Otoño 2010), indica alta proporción de cisternas contaminadas. El análisis estadístico de factores de riesgo de contaminación en 9 establecimientos (higiene del tambo y ordeño -calidad, extracción y distribución del silaje-contaminación en heces) desde Otoño 2010 a Otoño 2011, indican la diferencia entre estaciones, con y sin silaje (primavera) y demuestra que el mayor riesgo de contaminación con clostridios proviene de la alimentación con silaje de pobre calidad. Los tambos analizados con: silaje de buena calidad, alta tecnología de extracción y distribución del alimento, alta higiene de las vacas y del ambiente del tambo, y alta higiene del pezón durante la rutina de ordeño, lograron bajas concentraciones de esporas /l de leche (<200 NMP/litro) y bajas concentraciones de esporas /g de heces (<10.000 NMP/g heces).

*Palabras claves:* *Clostridium*, leche de tanque, silaje .

## SUMMARY

**Risk factors for bulk tank milk contamination with spore-forming bacteria (*Clostridium*) in Santa Fe dairy farms.**

The exploratory study of bulk milk contamination with spores (*Clostridium*) in 20 dairy farms (Santa Fe Province) with silage feeding most of the year (2 samples/farm, fall 2010) indicates a high proportion of contaminated tanks. Statistical analysis of risk factors of contamination in 9 farms (dairy and milking hygiene -quality, extraction and distribution of silage- dung contamination) from fall 2010 to fall 2011, indicates: differences between seasons-with and without silage (Spring), and

1.- Facultad de Ciencias Agrarias (UNL). Kreder 2805. (3080) Esperanza, provincia de Santa Fe.  
Email: jthomas@fca.unl.edu.ar

2.- Instituto Nacional de Tecnología Industrial. Ruta Nacional 34. Km. 227.6. (2300) Rafaela, provincia de Santa Fe.

3.- Alumnos Adscriptos a las Cátedras de Forrajes y Producción de leche (FCA - UNL).

Manuscrito recibido el 6 de diciembre de 2012 y aceptado para su publicación el 17 de mayo de 2012.

confirms that the increasing risk of contamination with *Clostridium* comes from feeding poor quality silage. Those dairies with good quality silage, high technology of extraction and distribution of silage, high hygiene of cows and the environment, and high teat hygiene during the milking routine, achieve low concentration of spores/l of milk (< 200 MPN /l) and low concentration of spores/g of faeces (<10.000 MPN/g faeces).

*Key words:* clostridium spores, bulk tank milk, silage.

## INTRODUCCIÓN

El control de la contaminación de la leche con organismos esporulados generadores de gas butírico, resulta importante para la industria láctea en relación al defecto de hinchazón tardía en quesos, siendo los más susceptibles los de pasta dura y semidura. Los responsables de esta contaminación microbiológica de interés para la industria casearia, son las bacterias anaerobias formadoras de esporas *Clostridium tyrobutyricum* y *C. butyricum* las cuales fermentan azúcares y ácidos orgánicos. Su capacidad de sobrevivir a la pasteurización les permite crecer durante el proceso de maduración de los quesos, originando defectos de sabor y excesiva formación de gas. La contaminación de la leche con niveles tan bajos como 0.01 UFC/ml puede causar el defecto mencionado en ciertos tipos de quesos como el Gouda (Bergere & Hermier, 1970; Klijn *et al.*, 1995).

Las nuevas regulaciones para la inocuidad de los alimentos, requieren del productor la responsabilidad de garantizar que los alimentos que consume el ganado se encuentren libres de contaminantes. La seguridad de que se podrán controlar los peligros y mejorar la calidad del producto dependerá de que todos los pasos en el proceso de producción hayan sido incluidos en este control (Weissbach, 2006).

La intensificación de la producción lechera genera mayor uso de algunos recursos

forrajeros como el silaje. Siendo este alimento, ofrecido en raciones mixtas, el que más contribuye a la contaminación de la leche con bacterias formadoras de esporas (*Clostridium* y *Bacillus*), y parece convertirse actualmente en un serio problema para la industria láctea.

La utilización de silaje de baja calidad para la alimentación de las vacas en lactancia, aparece como uno de los factores más importantes que contribuye a esta contaminación. Las heces son consideradas la principal vía de contaminación hacia la leche (Bergere *et al.*, 1968).

Cuando los alimentos utilizados son otros diferentes al silaje, o la mezcla de la ración no contiene silaje, las prácticas de higiene consideradas normales para la rutina de ordeño pueden ser suficientes para alcanzar el nivel deseable de calidad en leche de tanque. Cuando la fracción del silaje en la ración supera el 50 %, los riesgos de incremento en el nivel de contaminación en tanque de leche son mayores (Vissers *et al.*, 2006).

Las esporas están naturalmente presentes en el suelo, pero las prácticas de manejo utilizadas, tanto para el silaje, como para otros alimentos, incluyendo el heno, pueden actuar como una fuente de contaminación de bacterias productoras de ácido butírico (Vissers *et al.*, 2006).

El contenido de materia seca y pH del silaje durante el período de confección, han sido identificados como importantes factores para

el control de la contaminación proveniente del silaje con esporas de bacterias generadoras de ácido butírico (Pahlow *et al.*, 2003).

La difusión de aire dentro del silo durante el almacenamiento permite el crecimiento de hongos y levaduras, los cuales metabolizan el ácido láctico. Como consecuencia, el pH se incrementa, creando de esta manera las condiciones favorables para el crecimiento de clostridios. De esta forma, el silaje de maíz puede convertirse en una fuente de contaminación con alta cantidad de esporas (Driehuis & te Giffel, 2005).

Durante el período comprendido entre el manejo de los alimentos, ya sea para suministro directo al ganado o para conformar la ración, y el momento efectivo de consumo del alimento por los animales, puede ocurrir un crecimiento de las bacterias butíricas cuando las condiciones de temperatura, el pH y la disponibilidad de nutrientes son favorables (Bergere & Hermier, 1970). Estudios exploratorios sobre el efecto del manejo sobre la calidad del silaje de maíz, considerando a la digestibilidad como parámetro para describir la calidad del silaje, demostraron que la digestibilidad es menor ( $p < 0,07$ ) en el material tomado del comedero, respecto al del silo, debido a la exposición al aire. Analizando el pH en distintos sitios de muestreo y tipos de silo (bunker y bolsa), se observaron menores pH en bolsas, debido a que las remociones diarias fueron mayores en la medida en que la cara expuesta fue menor, y por ende fue menor la oxigenación del material (Abdelhadi, 2010). En el mismo estudio, se concluye que las pérdidas durante el suministro de silajes de maíz estabilizados anaeróbicamente, se reflejan especialmente en la menor digestibilidad del material que llega al comedero.

Ensayos realizados en la EEA Rafaela del INTA indican que los niveles de

contaminación con esporas de clostridios gasógenos en ensilaje son altos. Los silajes tipo puente presentaron mayor número de esporas que los tipo bolsa (45% de las muestras de silos puente con más de 10.000 esporos/g, mientras que en los silos bolsa menos de un 10% de las muestras superaron ese valor), y los niveles de contaminación en los ensilajes de alfalfa (43% de las muestras con valores entre 1.000 y 10.000 esporas/g) podrían producir inconvenientes en la elaboración de quesos de pasta dura (Taverna *et al.*, 1997).

La fuente de contaminación de esporas de clostridios son las heces de las vacas desde donde se extrae la leche. Aún con la mejor higiene durante el proceso de ordeño, al menos unas pocas esporas son transmitidas a la leche (Stadhouders & Spoelstra, 1990). El riesgo de contaminación se incrementa significativamente con el aumento del número de esporas en las heces de las vacas. Cuando se alimenta con silaje de baja calidad se encontrará normalmente una alta cantidad de esporas en las heces (Vissers *et al.*, 2007).

Bergere *et al.* (1968) y Stadhouders & Jorgensen (1990) enfatizaron la importancia de una efectiva práctica de higiene en el ordeño para eliminar la suciedad y la contaminación de los pezones pre-ordeño, a fin de minimizar la contaminación de la leche en el tanque. El tiempo empleado para la preparación del pezón y la elección del elemento usado para su secado, afectan el contenido de esporas y el recuento de bacterias en leche.

Una alta incidencia de alteraciones en la salud del ganado lechero ha sido relacionado con alta carga de esporas en los alimentos y con una nueva enfermedad llamada botulismo visceral (Böhnel, 1999a, 2004b; Böhnel *et al.*, 2001; Schwagerick & Böhnel, 2001, 2003; Schwagerick, 2004). Aunque algunos

elementos asociados con esta enfermedad son motivo de nuevas investigaciones, su ocurrencia ha sido regularmente vinculada con la alimentación del ganado lechero con silaje de pobre calidad higiénica (Weissbach, 2006). El comportamiento de las esporas de clostridios en el tracto intestinal de los bovinos, no es aún suficientemente comprendido. Se ha comprobado que las esporas no sólo pasan el rumen y el intestino sin sufrir alteraciones, sino que son capaces de germinar y que las células pueden proliferar en dicho hábitat (Bani *et al.*, 1991). Se han encontrado evidencias de que la formación de las toxinas botulínicas podría ocurrir en el rumen (Böhnel, 1999, 2004; Böhnel *et al.*, 2001; Schwagerick & Böhnel, 2001a, 2003b; Schwagerick, 2004).

La calidad de la leche para industrialización y la salud de los animales, son motivos suficientes para mejorar la calidad del alimento (silaje) que consumen las vacas en lactancia y aplicar las medidas necesarias para controlar los riesgos de contaminación en el proceso de producción y suministro del alimento, y de extracción de la leche.

El objetivo de este trabajo fue realizar un estudio exploratorio de contaminación en leche de tanque con esporulados (*Clostridium*) en establecimientos lecheros de la provincia de Santa Fe, con ofrecimiento de silaje a vacas en producción durante la mayor parte del año; y analizar los factores de riesgo de contaminación del alimento en los procesos de producción, almacenamiento, extracción y suministro; y de contaminación de la leche durante el ordeño.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó inicialmente un estudio exploratorio de contaminación en leche de tanque con esporulados (*Clostridium*) en 20 establecimientos lecheros proveedores de

una misma industria láctea, que suministran silaje durante la mayor parte del año (2 muestras/tambo). Se determinaron microorganismos esporulados anaeróbicos fermentadores de lactato (NMP de esporas/l de leche) en el laboratorio de análisis microbiológico del INTI Rafaela.

En 9 tambos seleccionados, ubicados en los Departamentos Las Colonias y San Justo de la provincia de Santa Fe, se realizaron los siguientes estudios en cada estación, durante el período Otoño 2010-Otoño 2011:

- Contaminación de la leche de tanque con microorganismos esporulados anaeróbicos fermentadores de lactato en leche cruda: CNERNA (Centre National de Coordination des Etudes et Recherches sur la Nutrition et l'Alimentation)-1986-Revue Latiere Francaise N° 451, pag 39-45. Los análisis se realizaron en el laboratorio del INTI (Instituto Nacional de Tecnología Industrial - Centro de Investigaciones Tecnológicas de la Industria Lechera).

- Contaminación de las heces con esporas gasógenas (NMP esporas/g heces) en una muestra compuesta tomadas de heces de 10 vacas en lactancia 72 hs después de consumido el alimento. El recuento de bacterias esporuladas anaeróbicas (género *Clostridium*) se realizó según el método de Weinzirl, modificado por Annibaldi, empleando la determinación del Número más probable (NMP), e incubando 7 días a 37 °C. Las muestras se analizaron en el laboratorio del INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria) Rafaela.

- Calidad de los silos de maíz y sorgo (silo bolsa): MS (%), pH, NH<sub>3</sub> /NT (%), PB (%), FDA (%), NIDA/NT (%), EM (Mcal/kg MS. (Laboratorio de Análisis de alimentos-Fac. Cs. Agrarias).

Se realizaron observaciones en cada tambo, y se categorizaron los tambos, en relación a:

*Calificación de la suciedad de las vacas al entrar al tambo:* permitió apreciar el estado de los callejones, accesos y lugares de descanso y comida de las vacas en condiciones climáticas consideradas normales (Clasificación Dairy Wellness Plan. Pfizer Animal Health).

*Rutina de ordeño (higiene de los pezones):* Referido a la eficiencia del lavado y secado de los pezones y a la observación de suciedad visible al colocar las pezoneras. Se categorizó mediante el siguiente puntaje:

Calif. 1 - Lava sólo los pezones, se drena o se secan antes de colocar las pezoneras. Se observan limpios.

Calif. 2 - Lava los pezones, no seca, ni drena el agua, baja eficiencia en el lavado. Medianamente limpios.

Calif. 3 - Lava la ubre y los pezones, coloca las pezoneras sin drenar el agua. Se observan sucios.

*Higiene del ambiente de ordeño:* Se consideró la limpieza de corrales y tinglados en el momento del ordeño. Se estandarizó el registro de los datos, categorizando las observaciones, en:

Puntaje 1 - Alta higiene: Se observan pisos limpios, sin acumulación de bosta, barro, alimentos en el corral de espera y en el tinglado de ordeño. El ambiente de ordeño minimiza la contaminación de los pezones en el momento previo y durante el ordeño.

Puntaje 2 - Media higiene: La limpieza es insuficiente para minimizar el riesgo de contaminación proveniente del ambiente de ordeño. Bosta y agua en el piso.

Puntaje 3 - Baja higiene: Acumulación de bosta, agua, residuos de alimentos en el piso del corral y tinglado de ordeño. Alto riesgo de contaminación durante el ordeño.

*Calidad del silaje almacenado en bolsa:*

Se analizó y observó el silaje confeccionado, muestreado en la bolsa.

*Procedimiento de extracción del silaje:* se relaciona con el cierre y la integridad de la bolsa y con la presencia de efluentes y agua en el lugar de extracción.

*Procedimiento de suministro del alimento:* rotación del patio de comida; higiene del comedero; residuos de alimentos (silaje) con evidente deterioro en el lugar de alimentación; separación de la fracción de silaje con características indeseables.

Se evaluó mediante un análisis estadístico de correspondencia, las variables NMP de esporas/ litro de leche, NMP de esporas/g heces, higiene de los tambos, higiene del animal y ordeño, distribución del alimento.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Del relevamiento inicial de la calidad de la leche (NMP esporas/l) en 20 establecimientos con silaje la mayor parte del año (Fig.1), y con diferentes escalas: 2 muestreos/tambo en Otoño 2010; se encontró que el 65% de las muestras presentaban niveles de contaminación dentro del rango medio: entre 200-1000 NMP esporas/l; mientras que en el 30% de las cisternas muestreadas se encontraron niveles superiores a 1000 NMP esporas/l. Sólo el 5% presentaban valores aceptables en leche de calidad para la industrialización de los quesos: 200 NMP esporas/l.

Los resultados obtenidos del trabajo de relevamiento de contaminación con clostridios en leche cruda destinada a industrialización (37 cisternas, una vez por mes, durante 1 año), por M. Gaggiotti y otros (2001), en tambos de la Cuenca Central Santafesina, considerando el mismo criterio, encontraron que el 49 % de las cisternas

tendría niveles (>1.000 esporas/l) que producirían hinchazón generalizada en quesos.

### Resultados de los nueve tambos bajo estudio

En la Fig. 2 se muestran los resultados sobre la contaminación de leche/estación (NMP esporas/litro de leche) en nueve tambos que suministraban silaje o raciones que lo contengan, durante la mayor parte del año.

En otoño (2010 y 2011), la mayoría de los establecimientos presentaron valores por encima del valor mínimo de referencia. Más de la mitad de los establecimientos presentaron valores dentro del rango superior (> 1000 NMP esporas/litro de leche), siendo nulo el porcentaje de tambos con leche de calidad óptima para industrialización (<200 NMP esporas/litro de leche). Mientras que en invierno, el 34% de los tambos presentó valores por debajo de 200 NMP esporas/litro de leche, indicando baja contaminación y el

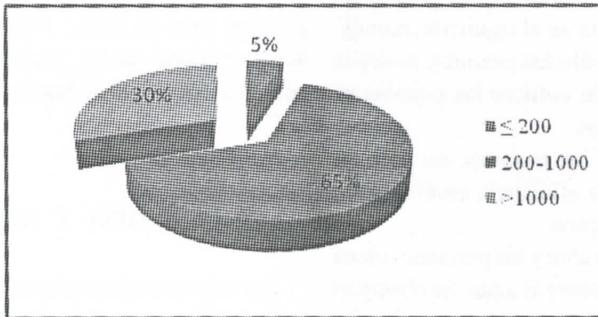


Fig. 1: Contaminación (Clostridios) en leche de tanque NMP esporas/l en 20 establecimientos lecheros (Dep. San Justo y Las Colonias de la provincia de Santa Fe).

Referencias: < 200 NMP esporas/l: leche no contaminada; 200 - 1.000 NMP esporas/l: leche contaminada; > 1.000 NMP esporas/l: leche muy contaminada.

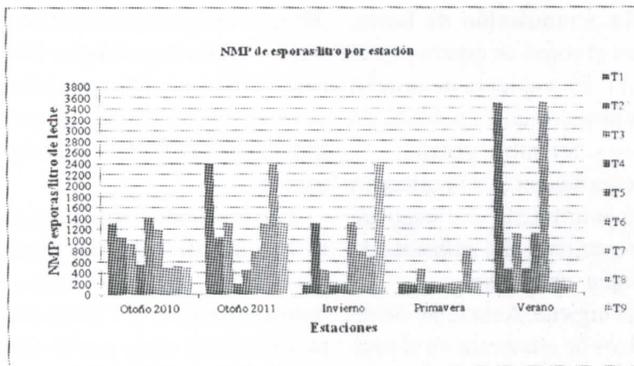


Fig. 2: NMP esporas/litro de leche en 9 tambos (Dep. Las Colonias y San Justo,) durante el periodo otoño 2010 a otoño 2011.

restante (66%) se ubicaron en los rangos más elevados de NMP esporas/litro de leche. En verano los tambos que ofrecen silaje en la ración mostraron elevada contaminación, mientras que los otros se encuentran en rangos óptimos de calidad. La situación más favorable se presentó en primavera. El 78% de ellos arrojaron valores por debajo del límite del rango mínimo ( $< 200$  NMP esporas/litro de leche), indicando leche de calidad adecuada para industrialización y el 22% restante se ubicó dentro del rango medio (entre 200 - 1000 NMP esporas/litro de leche).

### Contaminación en las heces

Los resultados obtenidos al analizar esporas en heces por estación, en los nueve establecimientos, se observa en la Fig. 3

Los mayores valores de contaminación ( $> 40.000$  NMP esporas/g de heces) se ubicaron en las estaciones de Otoño e Invierno, siendo más notorio en el Otoño 2011 donde la mayor parte de los establecimientos se ubicó dentro de este rango, indicando una alta carga de esporas que coinciden con la época del año

de mayor consumo de silaje de las vacas en lactancia, poniendo de manifiesto la contaminación en el alimento consumido por estos animales, y/o el alto contenido de esporas en el tracto gastrointestinal de los mismos, como consecuencia del consumo frecuente de alimento contaminado.

En primavera, momento del año de menor o nulo suministro de forrajes conservados como silaje, estos niveles disminuyeron notablemente hasta valores por debajo del rango mínimo aceptable ( $< 10000$  NMP esporas/g de heces) en el 67% de los casos, presentando el 33% restante valores intermedios (10000- 40000 NMP esporas/g de heces)

La diferencia entre las estaciones - alimentación con y sin silaje (primavera), confirma lo encontrado por otros autores, en relación a que el mayor riesgo de contaminación con clostridios proviene de la alimentación con silaje (Visser *et al.*, 2006).

Los resultados del análisis estadístico de correspondencia entre las variables bajo estudio (NMP de esporas/litro de leche, NMP de esporas/g heces, higiene de los tambos,

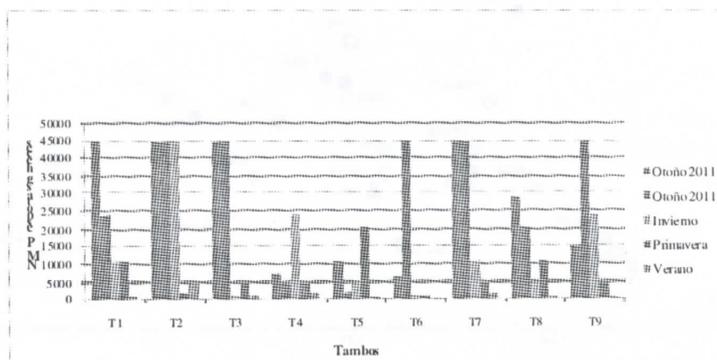


Fig. 3: Variación de NMP esporas/g de heces por estación en nueve establecimientos lecheros (Dep. San Justo y Las Colonias, provincia Santa Fe)

Referencias:  $< 10\,000$  esporas/g heces: valor deseable; 10.000 a 40.000 esporas/g heces: contaminado;  $> 40.000$  esporas/g de heces: muy contaminado.

higiene del animal y ordeño, distribución del alimento), son mostrados en la fig. 4.

Si bien la inercia de la variabilidad es baja (18% sobre el eje 1) se observa claramente (Fig.4) que frente a una buena distribución del alimento, una alta higiene de las vacas, del ambiente del tambo y en la rutina en el ordeño, se observa una baja concentración de esporas /l de leche (<200 NMP/litro) y baja concentración de esporas /g de heces (<10.000 NMP/g heces). A la inversa, en tambos con una baja higiene del ambiente, una pobre a regular distribución del alimento y una media clasificación de rutina de ordeño e higiene de las vacas, se evidencia una alta concentración de esporas/l de leche (>1000 NMP/leche) y alta concentración de clostridios (>40.000 NMP/g heces).

La relación NMP de esporulados/l de leche y NMP/ esporulados/g heces se distribuye según la estación (Fig. 5). El consumo de silaje en los meses de otoño, invierno y verano, aparece como el alimento que más

contribuye en la cantidad de esporas presentes en las heces. En Otoño se observan grupos de tambos con alta concentración de NMP/l leche y alta concentración de *Clostridium* ( $\geq 40.000$ )/g heces y pobre tecnología de distribución del silaje. Invierno: grupos con 10.000 a 40.000 NMP/g heces y media concentración de NMP de esporulados/l leche -(200 a 1000). Primavera (sin silaje), tambos con  $\leq$  a 10.000/g heces y baja concentración de NMP de esporulados/l. Verano: Con menos de 200 esporas/l, pocos tambos.

## CONCLUSIONES

El recuento del número de clostridios en heces permitió caracterizar el nivel de higiene de la ración que consumen las vacas, incluyendo la tecnología de alimentación (extracción y suministro del silaje). La pobre

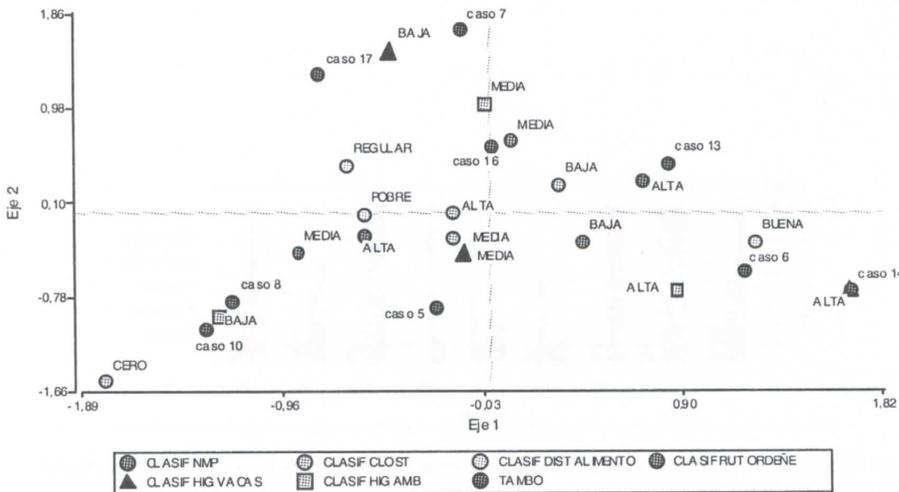


Fig. 4: NMP de esporas/ litro de leche, NMP de esporas/g heces, higiene de los tambos, higiene del animal y ordeño, distribución del alimento.

tecnología aplicada en la extracción y en el suministro del alimento, demuestran ser las causas de riesgo más comunes en los tambos bajo estudio.

Se demostró claramente que los tambos analizados, con silaje de buena calidad, alta tecnología de extracción y distribución del alimento, alta higiene de las vacas y del ambiente del tambo, y alta higiene del pezón durante la rutina de ordeño, logran bajas concentraciones de esporas/l de leche (<200 NMP/litro) y bajas concentraciones de esporas/g de heces (<10.000 NMP/g heces).

## AGRADECIMIENTOS

Se agradece a directivos y personal de producción primaria de la Empresa García Hnos. Agroindustrial S.A. por su permanente colaboración en las tareas de relevamiento y validación de la información.

## BIBLIOGRAFÍA

- ABDELHADI, L.** 2010. Disminuyendo las pérdidas en la extracción y el suministro. IV Congreso Nacional de Conservación y Uso de forrajes. Producir XXI. Rosario, Argentina. P 74-78
- BANI, P.; BERTONI, G.; GHILARDELLI, P. & GENNARI, R.** 1991. Preliminary research on some factors affecting the content of Clostridium spores in the faeces of dairy cows. *Scienza e Tecnica LattieroCasearia* 42, 421-432.
- BERGERE, J. L.; GOUET, P.; HERMIER, J. & MOCQUOT, G.** 1968. Les Clostridium du groupe butyrique dans les produit laitiers. *Ann. Inst. Pasteur de Lille* 19:41-54.
- BERGERE, J. L. & J. HERMIER.** 1970. Spore properties of Clostridia occurring in cheese. *J. Appl. Bacteriology.* 33:167-179
- BÖHNEL, H.** a1999. Botulismus - eine vergessene Krankheit. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.*

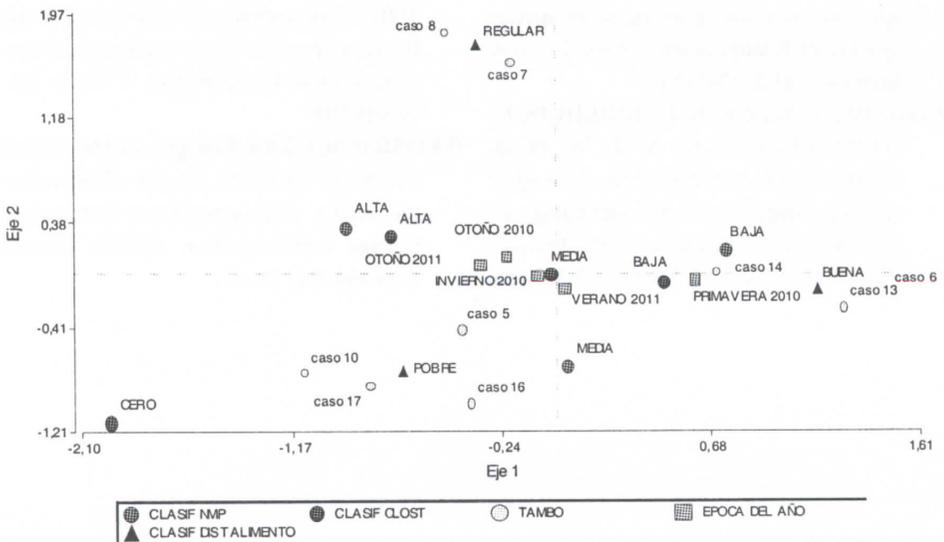


Fig. 5: Relación NMP de esporulados/l de leche y NMP/ esporulados/g heces con las estaciones del año.

112, 139-145

- BÖHNEL, H.** 2004. Von der Bakterienspore zum Tod des Patienten. *Botulinomics - Die Entwicklungskaskade des Botulismus.* Tierärztl. Umschau 59, 13-16
- BÖHNEL, H.; B. SCHWAGERICK & F. GESSLER.** 2001. Visceral botulism - a new form of bovine *Clostridium botulinum* toxification. *J. Vet. Med. A* 48, 373-383
- DRIEHUIS, F. M. & GIFFEL, T.** 2005. Butyric acid bacteria spores in whole crop maize silage. In: *Silage production and utilization.* Proc. XIVth Intern. Silage Confer., Belfast, 271
- GAGGIOTTI, M.; TAVERNA, M.; REINHEIMER, J.; QUAINO, O. & CALVINHO, L.** 2001. Contaminación con *Clostridios* gasógenos en leche cruda destinada a industrialización. Presentado en IX Congreso Argentino de Microbiología. Buenos Aires, 7 al 11 de octubre de 2001.
- KLIJN, N.; NIEUWENHOF, F. F. J.; HOOLWERF, J. D.; WAALS, C. B. & WEERKAMP, A. H.** 1995. Identification of *Clostridium tyrobutyricum* as the causative agent of late blowing in cheese by species specific PCR amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:2919-2924.
- PAHLOW, G.; MUCK, R. E.; DRIEHUIS, F.; OUDE-ELFERINK, S. J. W. H. & SPOELSTRA, S. F.** 2003. Microbiology of ensiling. *Silage Science and Technology.* D. R. Buxton, R. E. Muck, and J. H. Harrison, Ed. Soil Sci. Soc. Am., Madison, WI. Pages 31-93.
- SCHWAGERICK, B. & BÖHNEL, H.** 2001. Eine chronische Erkrankung bei Milchkühen mit Nachweis von Botulinumtoxin - eine Fallstudie. *Praktischer Tierarzt* 82, 516-524
- SCHWAGERICK, B.** 2004. Klinische Fälle von Viszeralem Botulismus bei Milchrindern in Mecklenburg-Vorpommern. *Tierärztl. Umschau* 59, 25-29
- STADHOUDERS, J. & SPOELSTRA, S. F.** 1990. Prevention of the contamination of raw milk by making a good silage. *Bulletin of the IDF* 251, 24-31
- STADHOUDERS, J. & JØRGENSEN, K.** 1990. Prevention of the contamination of raw milk by a hygienic milk production. *Bull. Int. Dairy Fed.* 251:32-36
- VISSERS, M. M.; DRIEHUIS, F.; GIFFEL, M. C.; JONG, P. DE & LANKVELD, J. M. G.** 2006. Improving Farm Management by Modeling the Contamination of Farm Tank Milk with Butyric Acid Bacteria. *J. Dairy Sci.* 89:850-858
- VISSERS, M.; DRIEHUIS, F.; GIFFEL, M. C.; JONG, P. DE & LANKVELD, J. M. G.** 2007. Concentrations of Butyric Acid Bacteria Spores in Silage and Relationships with Aerobic Deterioration. *J. Dairy Sci.* 90:928-936
- WEISSBACH, F.** 2006. Strategies for Minimizing *Clostridia* Spores in Silages. Conference proceeding. 12th international Symposium Forage Conservation. BRNO. Czech Republic. Pág. 26-32.