



HAL
open science

LA NUMÉRATION DES SPORES DE CLOSTRIDIUM ET SON APPLICATION AU LAIT ET AUX PRODUITS LAITIERS. II. NUMÉRATION DES DIFFÉRENTS GROUPES DE CLOSTRIDIUM

O. Cerf, J.-L. Bergere

► **To cite this version:**

O. Cerf, J.-L. Bergere. LA NUMÉRATION DES SPORES DE CLOSTRIDIUM ET SON APPLICATION AU LAIT ET AUX PRODUITS LAITIERS. II. NUMÉRATION DES DIFFÉRENTS GROUPES DE CLOSTRIDIUM. *Le Lait*, 1968, 48 (478), pp.501-519. hal-00928469

HAL Id: hal-00928469

<https://hal.science/hal-00928469>

Submitted on 11 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

LA NUMÉRATION DES SPORES DE *CLOSTRIDIUM* ET SON APPLICATION AU LAIT ET AUX PRODUITS LAITIERS

II. NUMÉRATION DES DIFFÉRENTS GROUPES DE *CLOSTRIDIUM*

par

O. CERF et J.-L. BERGERE

*Station centrale de recherches laitières et de technologie
des produits animaux*

Centre national de recherches zootechniques

78-Jouy-en-Josas (France)

PLAN

1. Introduction.
2. Numération des *Clostridium* sulfito-réducteurs, et en particulier de *Cl. perfringens*.
3. Numération des *Clostridium* putréfiants.
4. Numération des *Clostridium* du groupe butyrique.
5. Numération de l'ensemble des spores de *Clostridium*.
 - 5.1. Numération par incubation du lait à analyser.
 - 5.2. Autres méthodes.
6. Conclusion.
7. Ouvrages cités.

1. Introduction

Le lait est un vecteur fréquent des bactéries appartenant au genre *Clostridium*. Elles sont présentes dans les aliments des animaux (aliments qui ont été en contact avec de la terre) et contaminent le lait directement ou par l'intermédiaire des fèces. De nombreux travaux ont été consacrés à ce sujet, et Goudkov et Sharpe (1965) en ont fait une revue bibliographique très complète. La conclusion générale est que 16 à 18 p. 100 des échantillons de laits contiennent des spores d'anaérobies. Mais les nombres moyens de spores ainsi relevés sont toujours faibles : 1 à 10 spores par millilitre, avec des variations saisonnières dépendant de l'alimentation et de l'hygiène de la traite. Heureusement, dans les conditions normales d'utilisation, le lait n'offre pas en général un milieu propice au développement des *Clostridium*, en raison de son potentiel

d'oxydo-réduction trop élevé. Dans le cas où la multiplication d'autres espèces bactériennes abaisserait suffisamment le potentiel d'oxydo-réduction pour rendre possible la croissance de certains *Clostridium*, le lait serait de toute façon rendu impropre à la consommation. Par conséquent, dans les conditions courantes on assiste rarement au développement de *Clostridium* dans le lait, ce qui explique qu'il n'existe pas de méthodes officielles de dénombrement de leurs spores dans le lait de consommation.

Il y a cependant des cas où le nombre de spores de certains *Clostridium* dans le lait cru peut servir d'indice de contamination de ce produit : ainsi *Cl. perfringens* comme signe de contamination fécale (Buttiaux & Beerens, 1953 ; Romagnoli & Brezzi, 1960). Les *Clostridium* butyriques pourraient également servir de signe de contamination par les fèces d'animaux nourris avec certains ensilages (Bergère, Gouet, Hermier & Mocquot, 1968).

Par ailleurs, si dans la pratique les *Clostridium* ne se développent dans le lait que très rarement, cette croissance reste toujours possible dans des conditions particulières ; par exemple quand le lait a subi un traitement thermique intense qui a abaissé son potentiel d'oxydo-réduction. On a montré expérimentalement que des *Clostridium* hautement pathogènes tels que *Cl. botulinum* peuvent cultiver et produire des toxines dans du lait très fortement chauffé et conservé en bouteilles (Kaufmann & Brillaud, 1961 ; Kaufmann & Marshall, 1965), de même que les *Clostridium* provoquant les maladies gangréneuses (Prévot & Thouvenot, 1952). D'ailleurs, bien que très rares, quelques cas de botulisme et d'intoxications à *Clostridium* provoquées par le lait ont déjà été signalés (Walter, 1967). En outre, il ne faut pas oublier que l'aspect de la croissance dans le lait autoclavé au laboratoire est un caractère de classification très couramment utilisé pour les *Clostridium* (Beerens, 1954 ; Beerens, Castel & Put, 1962 ; Pohl & Thomas, 1966). Notons enfin, que la simple ébullition domestique abaisse suffisamment le potentiel d'oxydo-réduction du lait pour permettre la croissance de *Cl. perfringens* (Plommet, 1956).

Dans la plupart des produits laitiers on peut évidemment retrouver les spores de *Clostridium* initialement présentes dans le lait cru. Leur nombre est en général faible mais souvent supérieur à celui trouvé dans le lait cru en raison des procédés de fabrication qui augmentent la concentration du lait ou de l'un de ses constituants (dessiccation, écrémage, etc.). On retrouve ainsi, d'après Goudkov & Sharpe (1965), *Cl. perfringens* dans les poudres de lait, des *Clostridium* lipolytiques dans le beurre et la crème ; ou bien *Cl. nigrificans* et *Cl. thermosaccharolyticum* que l'A.P.H.A. (1960) recommandait de dénombrer dans les crèmes glacées, alors qu'il n'en est plus fait mention dans l'édition de Walter (1967) ; ou encore *Cl. tetani* signalé par Prévot & Thouvenot (1952) dans des fromages fondus.

On peut cependant retrouver des nombres de spores beaucoup plus élevés quand il y a eu développement des *Clostridium* dans les produits laitiers. Heureusement ceux-ci constituent en général des milieux défavorables à la croissance de ces bactéries en raison soit de leur pH, soit de leur activité en eau, soit de leur température de stockage, etc. Seules quelques espèces sont susceptibles de se développer lorsque ces diverses conditions de milieu ne sont pas trop rigoureuses, comme c'est le cas pour certains fromages. Citons *Cl. tyrobutyricum* qui provoque des défauts graves et des pertes importantes dans les fromages de type Gruyère, Parmesan, Hollande, Trappiste, Cheddar, de même que dans les fromages de Tilsit (Kutzner, 1966), Sbrinz (Kurmann, Oehen & Ritter, 1967), Herrgård (Thomé, Swartling, Lodin, Mattson, Wessner, Buhrgård & Lindgren, 1952), à pâte filée (Chomakov, 1966), etc. ; *Cl. tetanomorphum*, *Cl. sporogenes*, *Cl. tyrobutyricum* qui provoquent des défauts dans les fromages fondus fabriqués à partir de fromages de Hollande (Galesloot, 1961) ; *Cl. perfringens* qui provoque des défauts dans des Emmental insuffisamment acidifiés (Albus, 1928) ; *Cl. sporogenes* qui provoque la pourriture blanche des Emmental (Dorner, Demont & Chavannes, 1952) ; etc. *Cl. botulinum* ne présenterait pas de danger dans les fromages (Wagenaar & Dack, 1955) bien que sa toxine soit capable de se conserver dans la pâte de fromages fondus (Grecz, Wagenaar & Dack, 1965). Les cas d'intoxications provoquées par les anaérobies sporulés dans les produits laitiers en général sont d'ailleurs aussi rares que celles provoquées par le lait (Walter, 1967).

La numération des spores de *Clostridium* dans le lait et les produits laitiers n'est pas, nous venons de le voir, une question aussi négligeable qu'on affecte de le penser trop souvent. Si elle n'est pas plus employée c'est qu'il n'existe aucune méthode sélective sûre et que l'on en est réduit pour les *Clostridium*, à rechercher la présence de spores appartenant à des groupes relativement mal délimités. De plus, s'il existe des méthodes pour leur recherche dans les produits alimentaires au sens large, il n'en existe pas de bonnes qui aient été étudiées à l'origine pour le lait ou les produits laitiers. Après avoir présenté dans une première partie (Cerf 1968) les méthodes générales de numération des spores de *Clostridium*, nous traiterons maintenant des méthodes de numération applicables au lait et aux produits laitiers pour trois groupes importants de *Clostridium* : le groupe des sulfito-réducteurs, représenté principalement par *Cl. perfringens*, le groupe des putréfiants parmi lesquels *Cl. sporogenes* est le plus souvent rencontré, puis le groupe des butyriques dont *Cl. tyrobutyricum* est le représentant le plus nuisible en industrie des fromages à pâte pressée. Ces méthodes seront présentées par ordre de spécificité décroissante puis nous citerons les moyens d'apprécier globalement la contamination en spores de *Clostridium*.

2. Numération des *Clostridium* sulfito-réducteurs et en particulier de *Cl. perfringens*

A la suite d'une longue évolution amorcée par Wilson & Blair (1924), les bactériologistes ont réussi à mettre au point divers milieux fortement sélectifs, aussi bien pour les spores que pour les cellules végétatives de *Cl. perfringens*. Le milieu de Wilson & Blair est à base d'extrait de viande, de peptone et de glucose et contient du sulfite de sodium et un sel de fer. Les colonies des bactéries qui réduisent le sulfite s'entourent d'un halo noir de sulfure de fer ; ce milieu permet donc de dénombrer des bactéries « sulfito-réductrices », principalement des *Clostridium* mais aussi des *Bacillus*, des entérobactéries. Ce milieu, puisqu'il contient du sulfite est réducteur, et son emploi est relativement simple. Cependant, s'il contient trop de glucides, son pH s'abaisse rapidement, le sulfite se solubilise et tout le milieu se colore en noir (Mossel, 1968). C'est pourquoi, on compte les colonies après une incubation de 24 h seulement à 37° C. Celles dont le diamètre est supérieur à 3 mm sont formées par des bactéries qui appartiennent en principe à l'espèce *Cl. perfringens*. D'après Willis (1957), il faut repiquer ces colonies dans du lait autoclavé et recouvert de paraffine, puis observer s'il se produit ou non une coagulation du lait accompagnée de production de gaz pour confirmer la présence de *Cl. perfringens*.

Tel qu'il a été conçu, le milieu de Wilson & Blair contient une concentration de sulfite qui est inhibitrice pour un grand nombre de *Clostridium*, dont malheureusement certains sont sulfito-réducteurs (Beerens, Castel & Leclerc, 1961 ; Put, 1961 ; Gibbs & Freame, 1965 ; Narayan & Takacs, 1966). La concentration optimale permettant de dénombrer le plus grand nombre possible de sulfito-réducteurs semble devoir être fixée aux alentours de 0,05 p. 100 de sulfite de sodium anhydre. Pour la recherche des espèces sulfito-sensibles, comme par exemple *Cl. sporogenes*, on utilise d'autres milieux (paragraphe 3).

Pour éviter la croissance de bactéries sulfito-réductrices n'appartenant pas au genre *Clostridium*, divers agents sélectifs ont été proposés. L'azohydrate (« azide ») de sodium, l'acide sorbique, le violet cristal semblent devoir être abandonnés (Gibbs & Freame, 1965) ; la néomycine a été proposée par Lowburry & Lilly (1955), la polymyxine par Willis & Hobbs (1959) et Mossel (1959), la polymyxine avec la sulfadiazine (milieu SPS) par Angelotti, Hall, Foter & Lewis (1962). Selon Beerens (1968), la combinaison de sulfite avec ces deux antibiotiques rend le milieu moins inhibiteur que s'il contient un seul ou une combinaison de deux seulement de ces trois agents sélectifs. Selon Shank (1965), Southworth & Strong (1964) et Gibbs & Freame (1965), le milieu SPS serait le meilleur dont on dispose actuellement, car seuls des *Clostridium* y cultivent, et parmi ceux-ci principalement *Cl. perfringens*. Aux Etats-Unis, il est recommandé par la Food and Drug Administra-

tion (Lewis & Angelotti, 1964 ; Elliott, 1966). Ces derniers auteurs précisent que les colonies doivent être repiquées pour tester la motilité des germes et leur aptitude à la réduction des nitrates, ceci pour confirmer leur appartenance à l'espèce *Cl. perfringens*. Le milieu SPS est utilisé habituellement dans des tubes à sections elliptiques ou sur boîtes de Petri incubées dans des jarres anaérobies de différents types (voir Cerf, 1968), sans chauffage de l'échantillon.

Selon Green & Lisky (1966), le milieu SPS est trop inhibiteur pour *Cl. perfringens*. Or dans un milieu liquide, cette espèce, dont l'intervalle de génération est très court, cultive plus vite que les autres espèces présentes. Ces auteurs préconisent donc une première numération sur milieu liquide par la méthode des dilutions puis repiquage des tubes positifs sur milieu SPS en tubes. Seuls les tubes dans lesquels le milieu a noirci sont considérés pour le calcul du nombre le plus probable (MPN). Les auteurs détectent ainsi deux fois plus de *Cl. perfringens* que par l'emploi direct du milieu SPS. Hauschild, Erdman, Hilsheimer & Thatcher (1967) attribuent ces résultats à des irrégularités dans la qualité des préparations commerciales du milieu SPS et insistent par ailleurs sur la nécessité d'employer comme diluant l'eau peptonée de préférence au tampon phosphate.

Marshall, Steenbergen & McLung (1965) ont mis au point un milieu à la polymyxine et à la néomycine et recommandent une incubation de 18 heures à 46° C pendant laquelle seuls des *Cl. perfringens* ont, d'après ces auteurs, le temps de former des colonies. Mais leurs essais ont porté uniquement sur des souches pures.

Dans l'état actuel, on peut penser que le milieu SPS ou sa modification SSSPS (Beerens, 1968) est le milieu le plus convenable et, selon Mossel (1968), la température optimale pour la recherche de *Cl. perfringens* serait bien 46° C et une courte incubation suffirait. L'emploi des « poches » anaérobies (voir Cerf, 1968) est tout à fait indiqué pour cette recherche.

En conclusion, on peut penser que le milieu SPS conviendrait mieux au lait et aux produits laitiers que des milieux simplement sulfités tels que ceux proposés par Petransxienne & Lapied (1962) et par Demeter (1967).

Dans ce qui précède, on a vu que le chauffage des échantillons pour détruire les formes végétatives n'était pas stipulé. En effet, les spores de *Cl. perfringens* sont réputées thermosensibles. Cependant, selon Hobbs (1965), l'échantillon doit subir un traitement de quelques minutes à 100° C si l'on désire compter les spores produites par les souches de *Cl. perfringens* qui sont réellement responsables des toxi-infections alimentaires dans le Royaume-Uni. Sutton (1966) recommande également ce traitement thermique (voir aussi Taylor & Coetzee, 1966). Hauschild & Thatcher (1967), sans contester la nécessité de ce chauffage pour les souches isolées en Grande-Bretagne, pensent qu'aux Etats-Unis, il faut faire égale-

ment la numération des formes végétatives, les souches toxiques isolées dans ce pays produisant des spores ne résistant pas à l'ébullition. Selon Akama, Otani, Kameyana, Ito & Murata (1966), les différences de thermorésistance proviendraient de différences entre les milieux de chauffage employés par les différents auteurs. Quoi qu'il en soit, Hobbs (1968) a présenté des courbes de destruction thermique (TDT) qui montrent une différence marquée entre la thermorésistance de souches hémolytiques (pathogènes), et de souches non hémolytiques.

Ceci nous amène à citer une dernière méthode qui est couramment utilisée Outre-Manche, et qui est basée sur le fait que les souches responsables d'infections alimentaires possèdent une beta-hémolysine. Il est d'abord procédé à une culture sur boîte de gélose au sang, en jarre anaérobie. Les colonies montrant une zone d'hémolyse sont ensuite soumises à des tests sérologiques (Thatcher & Clark, 1967).

L'épreuve de Paquet & Gauvin (1953), destinée par ses auteurs à dénombrer les spores de *Cl. perfringens*, sera étudiée en détail au paragraphe 5.1).

3. Numération des *Clostridium* putréfiants

Parmi les *Clostridium* putréfiants, *Cl. sporogenes* est celui que l'on rencontre le plus fréquemment dans les produits laitiers (Goudkov & Sharpe, 1965). Il n'est pas rare qu'il soit signalé dans des accidents de fabrication qui peuvent rendre inconsommables des fromages fondus (Galesloot, 1961). Par ailleurs, la numération des spores de *Cl. sporogenes* présente un intérêt du fait que ses spores sont utilisées à cause de leur thermorésistance pour établir des barèmes de stérilisation des conserves.

Les milieux utilisés pour la numération de ces *Clostridium* ne sont en rien spécifiques. Le plus classique est celui d'Andersen (1951). Ce milieu gélosé à base d'infusion de pois et de viande de porc contient également de la tryptone, une peptone, de l'amidon, du thioglycolate et du bicarbonate de sodium. Il est réparti en boîtes de Petri et recouvert de gélose au thioglycolate, ou bien réparti en tubes à section elliptique, ou encore en « poches ». Il est considéré par Desmet & al. (1966) comme excellent pour la numération de souches pures de *Cl. sporogenes*, lorsqu'il est comparé à dix autres milieux. Pour la numération dans les produits alimentaires, les colonies doivent ensuite faire l'objet d'une identification complémentaire. Selon Narayan (1967), les caractères de culture sur jaune d'œuf, gélatine et sérum coagulé suffisent à déterminer *Cl. sporogenes*.

Le milieu à la gélatine mis au point par Rosenberger (1956) pour la numération des *Clostridium* protéolytiques dans l'ensilage

et qui ne contient aucun glucide, n'est pas non plus spécifique de *Cl. sporogenes* ; l'aspect du milieu dans les tubes où une croissance s'est produite permet cependant un diagnostic approximatif (liquéfaction de la gélatine, production plus ou moins abondante d'ammoniac ou de gaz sulfureux). Le milieu SMA de Goudkov & Sharpe (1966) pour la recherche des *Clostridium* protéolytiques, non plus que le milieu T 65 de Mossel, Beerens, Tahon-Castel, Baron & Polspoel (1965), favorables tous deux aux *Clostridium* protéolytiques, ne permettent cette différenciation approximative de *Cl. sporogenes*. Le milieu SMA qui contient de la néomycine et de la polymyxine permettrait selon ses auteurs de faire la numération de cellules végétatives.

Pour les études de thermorésistance il est important de disposer d'un milieu dans lequel le plus fort pourcentage possible de spores survivantes puisse être dénombré. Parmi les milieux proposés, Frank & Campbell (1955) préfèrent un milieu à base d'infusion de pois et de viande de porc, et Augustin & Pflug (1967) préconisent l'infusion de bœuf additionnée de peptone, tryptone et amidon.

Bien que *Cl. botulinum* ne soit pas en général rangé dans le même groupe, rappelons que les milieux utilisés pour son dénombrement sont du même type que ceux utilisés pour *Cl. sporogenes*. Les colonies sont donc repiquées soit pour identification, soit pour un enrichissement et une vérification de la toxicité (Narayan, 1967 ; Lewis & Angelotti, 1964 ; Elliott, 1966 ; Thatcher & Clark, 1967).

4. Numération des *Clostridium* du groupe butyrique

Ces *Clostridium*, non pathogènes, présentent une importance particulière pour l'industrie laitière. En effet, comme nous l'avons vu dans l'introduction, certaines espèces de ce groupe sont responsables de graves défauts dans divers types de fromages ; dans la pratique, on les désigne communément sous le nom de « butyriques ». Les espèces dont la croissance dans les fromages a été démontrée sont *Cl. butyricum* et *Cl. tyrobutyricum* (Van Beynum & Pette, 1936 ; Galesloot, 1961 ; Stüssi, 1961 ; Ritter, Sahli, Schilt & Heuscher, 1963 ; Goudkov & Sharpe, 1965 et 1966 ; Kutzner, 1966 ; Bergère, Hermier, Gouet & Mocquot, 1968). Il est bon de rappeler que ces deux espèces fermentent le lactate (et ne le fermentent qu'en présence d'acétate : Ritter, Sahli, Schilt & Heuscher, 1963 ; Kutzner, 1963) mais se différencient par de nombreux caractères (Beerens, Castel & Put, 1962 ; Goudkov & Sharpe, 1965 ; Bergère & al., 1968). Notons que, parmi ceux-ci, *Cl. butyricum* fermente beaucoup de glucides dont le lactose alors que *Cl. tyrobutyricum* ne fermente que peu de glucides ; en particulier il ne fermente pas le lactose et par conséquent ne produit ni gaz ni acide lorsqu'il est inoculé dans du lait. De ces deux espèces, c'est *Cl. tyrobutyricum* que l'on retrouve presque exclusivement dans les fromages présentant une

rancidité (Cheddar) ou un gonflement (Gruyère, etc.), et c'est lui dont les spores sont le plus à redouter lorsqu'elles sont présentes dans le lait de fromagerie. Le nombre de ces spores est d'ailleurs le principal facteur qui conditionne l'apparition du gonflement dans les fromages (Thomé & Swartling, 1953 ; Bergère & al., 1968).

Le premier problème est donc de déterminer l'importance de la contamination initiale du lait. Malheureusement on n'a pas encore trouvé d'agents vraiment sélectifs, ni pour *Cl. tyrobutyricum*, ni même pour le groupe butyrique (Eross & Kiss, 1965 ; Narayan, 1966).

Les nombreux milieux qui ont été utilisés par les différents auteurs pour dénombrer les spores de « butyriques » peuvent être classés en deux groupes suivant la nature de la source de carbone qui entre dans leur composition (tableau I) :

— Dans le premier groupe, les milieux contiennent au moins un glucide comme source de carbone, celui-ci étant très souvent le glucose. De ce fait non seulement tous les *Clostridium* du groupe butyrique mais aussi beaucoup d'autres *Clostridium* soit saccharolytiques, soit protéolytiques peuvent s'y développer et y produire des gaz. Ces derniers *Clostridium* sont assez souvent présents dans les laits (Goudkov & Sharpe, 1965) mais sont incapables dans les conditions normales de se développer dans les fromages et d'y provoquer une altération. Dans ce groupe de milieux on peut également classer ceux à base de lait additionné de différents composés comme le glucose ou l'acide lactique. Il faut signaler que la simple addition d'acide lactique au lait dans le but de le rendre inhibiteur pour les protéolytiques ne permet cependant pas la croissance de *Cl. tyrobutyricum* (Van Beynum & Pette, 1936 ; Beerens & al., 1962).

— Dans le second groupe de milieux, la source de carbone est constituée par le mélange lactate-acétate de sodium, à l'exclusion de tout glucide. Ces milieux sont plus sélectifs puisqu'ils permettent en principe de ne dénombrer que les *Clostridium* capables de fermenter le lactate, parmi lesquels se trouve d'ailleurs *Cl. tyrobutyricum*. Il faut cependant remarquer que certains protéolytiques tels que *Cl. paraputrificum* peuvent encore se développer dans un milieu tel que celui de Rosenberger (1951, 1956) malgré sa faible teneur en protéines et son *pH* relativement bas.

Il faut ajouter également que dans le cas où l'on doit rechercher un nombre de spores relativement faible (moins de 10 par ml), et c'est un cas fréquent, l'inoculum doit être important (1 ml) et l'introduction des constituants du lait à analyser (protéines, lactose, etc.) est de ce fait inévitable. Ceci favorise le développement éventuel de *Clostridium* fermentant le lactose ou même de *Clostridium* protéolytiques, et réduit considérablement la spécificité qu'un milieu tel que celui de Rosenberger peut présenter vis-à-vis des *Clostridium* fermentant le lactate. Pour remédier en partie à ces

inconvenients, on pourrait éventuellement centrifuger le lait à analyser et ensemercer le milieu avec seulement le culot de centrifugation et la crème dans lesquels se retrouvent la majorité des spores (Hostettler, Sahli & Binz, 1941). On trouvera une discussion de ces questions dans Demeter (1967).

Tout ceci montre que dans aucun des milieux proposés, il ne suffit de compter des colonies ou des tubes positifs pour connaître le nombre de spores de « butyriques » ; il faudrait en plus identifier toutes les espèces qui ont cultivé. D'une manière assez simple l'odeur et l'examen microscopique des cultures ou des colonies peut donner une idée approximative de l'espèce dominante. Certains auteurs proposent d'effectuer sur le contenu des tubes positifs une détermination des acides butyrique et acétique par distillation ou chromatographie (KGK, 1949 ; Sahli, 1961 ; Waes & Devogelaere, 1966). Cette précaution supplémentaire complique beaucoup la méthode sans offrir une bonne preuve de l'identité de l'espèce présente. En effet, Moore, Cato & Holdeman (1966) ont montré que d'autres espèces telles que *Cl. septicum*, *Cl. chauvoei* et *Cl. parapatrificum* produisent les acides butyrique et acétique dans les mêmes proportions que *Cl. butyricum*. Signalons que *Cl. butyricum* pourrait être éventuellement distingué des autres *Clostridium* par le fait que 50 p. 100 des acides gras cellulaires qu'il synthétise sont constitués par de l'acide palmitique (Moss & Lewis, 1967).

En définitive il n'existe donc pas de méthode pour dénombrer uniquement les spores de « butyriques ». Dans la pratique, le dénombrement des spores du lait sur milieu au lactate et à l'acétate de sodium reste la meilleure méthode de prévision des accidents de fromagerie, puisqu'on a mis en évidence, dans le cas des laits d'ensilage, une relation entre la fréquence du gonflement butyrique et le nombre des spores déterminé par cette méthode (Thomé & Swartling, 1953 ; Bergère & al., 1968 ; Bergère, en préparation).

Le deuxième problème dans la numération des *Clostridium* du groupe butyrique concerne le dénombrement des spores dans les fromages affinés en vue de déterminer l'agent responsable du défaut observé (rancidité ou gonflement). Il est beaucoup plus facile à résoudre : d'une part le nombre de spores est beaucoup plus élevé (10^4 à 10^7 par gramme) (Goudkov & Sharpe, 1966 ; Kutzner, 1966 ; Bergère & al., 1968), et d'autre part, presque toujours, une seule espèce s'est développée dans le fromage et se retrouve donc en culture pure dans le dernier tube positif de la numération en milieu liquide. L'odeur du contenu de ce tube, son examen microscopique et, suivant le milieu de numération utilisé, une vérification de la fermentation du lactate et du lactose par l'espèce présente permettent à un expérimentateur entraîné d'identifier assez sûrement l'espèce. Enfin il est bon de rappeler que la température de chauffage des échantillons (lait ou suspension de fromage) ne doit pas dépasser 80° C pendant 10 minutes à un pH de 6,5, la thermo-

TABLEAU I

QUELQUES MÉTHODES PROPOSÉES POUR LA NUMÉRATION DES *Clostridium* BUTYRIQUES

(MPN signifie que la numération se fait par la méthode des dilutions, sauf pour les quatre premières méthodes du tableau, où seulement cinq tubes de lait supplémenté sont mis à incuber.)

<i>Références</i>	<i>Sources de carbone</i>	<i>Moyen de numération</i>	<i>Chauffage de l'échantillon</i>	<i>Observations</i>
1. <i>Milieu contenant au moins un glucide comme source de carbone</i>				
1.1. <i>Milieux à base de lait</i>				
Van Beynum et Pette (1933)	Lactose, glucose, lactate	MPN	+ (80° C, 10 mn)	Tube en V spécial.
Demeter (1952)	Lactose, glucose, lactate	MPN	+ (80° C, 10 mn)	
Winkler (1961)	Lactose, glucose	MPN	+ (80° C, 10 mn)	
Petransxienne et Lapied (1962)	Lactose, lactate	MPN	+ (80° C, 5 mn)	
Chomakov (1966)	Lactose, glucose	MPN	+ (80° C, 10 mn)	
Winkler (1967)	Lactose, lactate	MPN	+ (80° C, 10 mn)	Additionné d'extraits de foie et de levure.

1.2. *Autres milieux*

Burri, Staub et Hohl (1919)	Glucose	Colonies	+ (80° C, 10 mn)	Confirmation sur milieu lactate-levure.
Ruschmann et Harder (1931)	Glucose, pomme de terre	MPN	—	
Van Beynum et Pette (1936)	Glucose	MPN	—	
Hostettler, Sahli et Binz (1941)	Glucose, pomme de terre	Colonies	+ (76° C, 10 mn)	Sur crème et culot de centrifugation. Vérification sur lactate.
KGK (1949)	Glucose, lactate	MPN	—	Distillation fractionnée de la culture.
Gibshman et Kalinina (1957)	Glucose, lactose	MPN	—	Virage d'un colorant. Odeur, gaz, examen microscopique, chromatographie sur la culture pure.
Binder (1960)	Lactose, lactate	Colonies	+ (80° C, 10 mn)	
Sahli (1961)	Glucose, lactate, pomme de terre	MPN	+ (78° C, 12 mn)	
Dorner et Gonin (1962)	Glucose, pomme de terre	Colonies	—	
Petransxienne et Lapied (1962)	Glucose	Colonies	+ (85° C, 15 mn)	

2. *Milieu dont la source de carbone est le lactate de sodium, sans glucide*

Rosenberger (1951)	Lactate, acétate	MPN	—	Virage d'un colorant Addition d'extrait de levure.
Kurmann, Oehen et Ritter (1967)	Lactate	Colonies	+ (76° C, 12 mn)	
Bergère, Gouet, Hermier et Mocquot (1968)	Lactate, acétate	MPN	+ (75° C, 10 mn)	Odeur, gaz, examen microscopique.

résistance des spores de butyriques étant relativement faible (Cerf, Bergère & Hermier, 1967).

5. Numération des spores de *Clostridium* en général

5.1. Numération par incubation du lait à analyser

Comme dans l'industrie de la conserve où les boîtes elles-mêmes sont mises à incuber pour détecter une contamination éventuelle du produit, on utilise ici le lait à analyser comme milieu de culture. Il ne s'agit d'ailleurs que d'une numération approximative dans le but d'obtenir un ordre de grandeur du nombre de spores que contient le lait.

La numération par incubation du lait à analyser a été préconisée dès 1915 par Weinzirl comme test de contamination du lait par le fumier et plus précisément par *Cl. sporogenes* (Weinzirl, 1916). Voici sa description : 5 tubes bouchés au coton et contenant 0,5 à 1 ml de paraffine sont préalablement stérilisés par autoclavage ou à l'air chaud et sec ; ensuite on introduit stérilement 5 ml de lait à analyser dans chaque tube ; puis les tubes sont chauffés à 80° C pendant 10 mn, refroidis, et incubés pendant 3 jours à 37° C (Weinzirl, 1921). Si deux tubes sur cinq présentent une fermentation gazeuse, le lait est considéré comme très pollué. L'utilisation de cette technique comme test de contamination par le fumier a d'ailleurs été critiquée depuis longtemps (Hudson & Tanner, 1922) et continue de l'être (Demeter, 1967 ; Zaadhof & Terplan, 1967).

Depuis cette époque l'incubation du lait lui-même a été employée à des fins différentes. En effet, si l'épreuve a été effectuée par les différents auteurs qui l'ont utilisée selon des protocoles voisins de celui décrit ci-dessus, l'interprétation qu'en ont donnée ces auteurs, en ce qui concerne la nature des germes que l'épreuve permet de détecter, a notablement varié. Certains, comme Paquet & Gauvin (1953), l'ont utilisée d'une manière rationnelle puisqu'ils disent rechercher la présence de *Cl. perfringens* dans des échantillons de laits crus et pasteurisés avec un seul tube, mais en vérifiant que les *Clostridium* ayant donné des gaz étaient bien à coloration de Gram positive et immobiles. D'autres l'ont conseillé comme permettant la recherche des « butyriques » dans le lait (par exemple Dumas, 1958). D'autres l'ont proposée pour la numération des spores de germes anaérobies mésophiles type *Cl. sporogenes* et *Cl. perfringens* (C.N.E.R.N.A., 1961). D'autres enfin l'ont proposée pour la recherche des sporulés anaérobies dans le lait (Papavassiliou, 1956 ; Petranskienne & Lapiéd, 1962 ; Harrigan & McCance, 1966 ; par exemple).

En fait, contrairement à ce que pourrait laisser croire ce qui précède, l'incubation du lait à analyser ne permet pas le dénombrement de tous les *Clostridium* qui le contaminent. Dès 1933,

Meyn (cité par Demeter, 1967) a montré que cette épreuve ne donne des résultats positifs que dans 58 p. 100 des cas où le lait contient effectivement des spores d'anaérobies ; donc une épreuve négative ne signifie pas que le lait ne contient pas de spores. Par ailleurs Kurmann (1963) a constaté que, lorsque le test de Weinzirl est positif, l'espèce présente dans le lait est *Cl. perfringens* dans 52 p. 100 des cas, *Cl. butyricum* dans 28 p. 100 des cas et *Cl. sporogenes* dans 10 p. 100 des cas seulement. Comme l'avait déjà montré Lind (1956), c'est donc *Cl. perfringens* qui, le plus souvent, détermine le résultat en raison de sa vitesse de croissance beaucoup plus grande que celle de la plupart des autres *Clostridium*. Ajoutons que tous les *Clostridium* ne sont pas capables de se développer dans le lait. C'est le cas de *Cl. tyrobutyricum* dont les caractères taxinomiques les plus importants sont de ne pas fermenter le lactose et de ne pas modifier le lait (Van Beynum & Pette, 1936 ; Beerens & al., 1962). En outre, selon Kurmann, le simple aspect du lait dans les tubes positifs (type de coagulation, couleur du sérum, etc.) ne permet pas de distinguer l'espèce qui s'y est développée. En effet, contrairement à ce qu'on observe en culture pure, l'aspect du lait dans l'épreuve de Weinzirl est dû non seulement à la croissance simultanée d'un ou plusieurs *Clostridium*, mais souvent aussi à la croissance simultanée d'autres bactéries telles que des *Bacillus* ou même des bactéries propioniques qui — selon Demeter (1967) — auraient résisté au chauffage. Il faut signaler également que, dans cette épreuve, la croissance des *Clostridium* est fonction de la qualité initiale du lait à analyser puisqu'il constitue le milieu de culture (présence d'inhibiteurs, d'antibiotiques, etc.).

L'emploi du lait lui-même comme milieu de culture pour la numération des spores de *Clostridium*, et en particulier pour la numération des spores de *Clostridium* susceptibles de provoquer le gonflement des fromages est donc à déconseiller.

Notons que le principe de la méthode de Weinzirl a été mis à profit en vue de résoudre le problème de la détection des spores de *Clostridium* présentes dans les fromages par des auteurs qui ont incubé une émulsion du fromage lui-même (Hirsch, McClintock & Mocquot, 1952 ; Csiszar & Zambach-Bittera, 1956).

5.2. Autres milieux

Pour la numération de toutes les spores de *Clostridium* présentes dans le lait ou les produits laitiers, il existe différents milieux dont certains ont été mis au point pour d'autres produits alimentaires (Gibbs & Freame, 1965). Le milieu le plus favorable au développement des *Clostridium* est incontestablement celui de Hirsch & Grinsted (1954), appelé RCM (Reinforced Clostridial Medium), et mis au point à l'origine pour les *Clostridium* du groupe butyrique. Gibbs & Freame (1965), en le modifiant légèrement, conseillent d'y ajouter du sulfite de sodium (0,04 p. 100) et du citrate de fer

(DRCM) pour rendre la lecture plus facile. On peut utiliser cette modification à condition de se souvenir que certains *Clostridium* sont inhibés par une telle concentration de sulfite (voir paragraphe 2).

Mossel & al. (1965), comparant différents milieux, constatent que ce RCM convient bien pour la plupart des *Clostridium* mais proposent cependant deux autres milieux à utiliser simultanément, S 65 et T 65, l'un convenant plus particulièrement aux saccharolytiques, l'autre aux protéolytiques. Le RCM, dont le spectre est le plus large, demeure pourtant le plus utilisé dans la numération des « spores anaérobies totales » des produits alimentaires, de préférence à des milieux à base d'infusion de viande, de foie ou de produits végétaux difficiles à préparer (Goudkov & Sharpe, 1965 et 1966 ; Gibbs & Freame, 1965 ; Desmet & al., 1966):

6. Conclusion

Malgré l'importance que revêt la numération de certains *Clostridium* dans les produits alimentaires et en particulier dans le lait et les produits laitiers, on constate malheureusement que sauf pour *Cl. perfringens*, il n'existe pas de milieux sélectifs. Cela complique beaucoup la numération des spores et rend pratiquement impossible la numération des cellules végétatives. On peut cependant espérer qu'une meilleure connaissance des caractères physiologiques, biochimiques et sérologiques des espèces importantes permettra dans un proche avenir d'améliorer les milieux de culture et les techniques de recherche et de numération de ces bactéries. L'utilisation des anticorps fluorescents est peut-être un exemple de ces techniques d'avenir.

Remerciements

Nous exprimons notre reconnaissance à MM. Mocquot et Hermier pour leurs suggestions et critiques et pour l'attention qu'ils ont portée à la lecture de ce manuscrit.

Reçu pour publication le 18 juin 1968.

Summary

« The enumeration of *Clostridium* spores, particularly in milk and dairy products. — II. Enumeration of the main groups. »

CONTENTS

1. Introduction.
2. Enumeration of sulphite-reducing *Clostridia*, and more particularly of *Cl. perfringens*.

3. Enumeration of putrefactive *Clostridia*.
4. Enumeration of the butyric group *Clostridia*.
5. Enumeration of total clostridial spores.
 - 5.1. Incubation of the milk itself.
 - 5.2. Other methods.
6. Conclusion.
7. References.

TRAVAUX CITÉS

- AKAMA (K.), OTANI (S.), KAMEYANA (S.), ITO (A.) et MURATA (R.) 1966. (Studies on *Clostridium perfringens* in the feces from healthy human beings. I. Count of the organisms in unheated and heated fecal specimens) (en japonais). *Jap. J. Bacteriol.*, **21**, 619-25, in *Biol. Abstr.*, **48**, 76, 188.
- ALBUS (W. R.). 1928. *Welchii* abnormality from Emmental. *J. Bact.*, **15**, 203.
- ANDERSEN (A. A.). 1951. A rapid plate method for counting spores of *Clostridium botulinum*. *J. Bact.*, **62**, 425-432.
- ANGELOTTI (R.), HALL (H. E.), FOTER (M. J.) et LEWIS (K. H.). 1962. Quantitation of *Clostridium perfringens* in foods. *Appl. Microbiol.*, **10**, 193-199.
- A.P.H.A. 1960. Standard methods for the enumeration of dairy products microbiological and chemical. *Amer. pub. Health. Ass. New-York*, 2^e éd.
- AUGUSTIN (J. A. L.) et PFLUG (I. J.). 1967. Recovery of spores of putrefactive anaerobe 3679 in various subculture media after heat treatment. *Appl. Microbiol.*, **15**, 226-276.
- BEERENS (H.). 1954. Amélioration des techniques d'études et d'identification des bactéries anaérobies. *Annales Inst. Pasteur, Lille*, **6**, 36-48.
- BEERENS (H.). 1968. Les *Clostridium* thermophiles. Colloque « Les *Clostridium* dans les produits alimentaires », Lille, janvier 1968. *Annales Inst. Pasteur, Lille*, **19**, sous presse.
- BEERENS (H.), CASTEL (M. M.) et LECLERC (H.). 1961. Contribution à l'étude des milieux au sulfite de sodium pour l'isolement des *Clostridium*. *Annales Inst. Pasteur, Lille*, **12**, 183-94.
- BEERENS (H.), CASTEL (M. M.) et PUT (H. M. C.). 1962. Caractères d'identification de quelques *Clostridium* du groupe *butyricum*. *Annales Inst. Pasteur, Paris*, **103**, 117-121.
- BINDER (W.). 1960. Zur Kenntnis von *Clostridium butyricum* unter besonderer Berücksichtigung der Buttersäuregärung in Silage und Käse. *Bodenkultur*, **11**, 1-37.
- BERGÈRE (J. L.), GOUET (P.), HERMIER (J.) et MOCQUOT (G.). 1968. Les *Clostridium* du groupe butyrique dans les produits laitiers. *Annales Inst. Pasteur, Lille*, **19**, sous presse.
- BURRI, STAUB et HOHL. 1919. *Schweiz. Zbl. Milchw.*, 40-3, in Demeter (1952).
- BUTTIAUX (R.) et BEERENS (H.). 1953. Les indices de propreté originelle des laits pasteurisés. *Rev. Path. gén. comp.*, **53**, 1 454-1 459, in *Dairy Sci. Abstr.*, **16**, 1 004 c.
- CERF (O.). 1968. La numération des spores de *Clostridium* et son application au lait et aux produits laitiers. I. Méthodes et techniques générales de numération. *Le Lait*, **475-476**, 275-292.
- CERF (O.), BERGÈRE (J. L.) et HERMIER (J.). 1967. Thermorésistance des spores des *Clostridium* du groupe butyrique. *J. Dairy Res.*, **34**, 221-229.
- CHOMAKOV (C.). 1966. A study of « late » gassy fermentation of pickled cheese. *Milchwissenschaft*, **21**, 215-219.
- C.N.E.R.N.A. 1961. Techniques de détection et de dénombrement des microorganismes du lait. *Annales Nutr. Alim.*, **15**, t. 7.
- CSISZAR (J.), et ZAMBACH-BITTERA (R.). 1956. Eine einfache Methode zum Nachweis der Buttersäure-Bazillen im Käse. *XIV^e Cong. Intern. Laiterie*, **2** (2), 146-157.

- DEMETER (K. J.). 1952. Bakteriologische Untersuchungsmethoden der Milchwirtschaft. *Eugen Ulmer*, Stuttgart, 1^{re} édit.
- DEMETER (K. J.). 1967. Bakteriologische Untersuchungsmethoden der Milchwirtschaft. *Eugen Ulmer*, Stuttgart, 2^e édit.
- DESMET, DONY, GÉRARD, GILQUIN, DEPELCHIN, HARPIGNY et SEEGER. 1966. Etude comparative de différents milieux de culture pour la détection des spores de *Clostridia* dans les produits chauffés. *Rev. Ferment. Indus. Alim.*, **21**, 81-86.
- DORNER (W.), DEMONT (P.) et CHAVANNES (D.). 1952. Microbiologie Laitière, Librairie Payot, Lausanne.
- DORNER (W.) et GONIN (P.). 1962. Un milieu amélioré pour la recherche de *Clostridium butyricum*. *Pathol. et Microbiol.*, **25**, 586-589, in *Biol. Abstr.*, **42**, 14, 554 (1963).
- DUMAS (J.). 1958. Bactériologie médicale. *Les Ed. médicales Flammarion*, Paris.
- ELLIOTT (R. P.). 1966. Bacteriological analytical manual. *U. S. Dept. Health, Educ. & Welfare*, Washington.
- EROS (G.) et KISS (E.). 1964. (Indications pour la recherche des bactéries butyriques) (en hongrois). *Tejipari. Kut. Koz.*, **7**, 49, in *Dairy Sci. Abstr.*, **27**, 3, 535.
- FRANK (H. A.) et CAMPBELL (L. L.). 1955. The influence of recovery media on thermal resistance values of spores of putrefactive anaerobe bacteria. *Appl. Microbiol.*, **3**, 300-302.
- GALESLOOT (Th. E.). 1961. (Concerning the anaerobic bacilli wich cause spoilage in processed cheese) (en hollandais). *Neth. Milk Dairy J.*, **15** 263-281.
- GIBBS (B. M.) et FREAME (B.). 1965. Methods for the recovery of *Clostridia* from foods. *J. appl. Bacteriol.*, **28**, 95-111.
- GIBSHMAN (M.) et KALININA (G.). 1957. (New media for the estimation of butyric acid bacteria in cheese) (en russe). *Mol. Prom.*, **18**, 33-34, in *Dairy Sci. Abstr.*, **19**, 497a.
- GOUDKOV (A. V.) et SHARPE (M. E.). 1965. *Clostridia* in dairying. *J. appl. Bacteriol.*, **28**, 63-73.
- GOUDKOV (A. V.) et SHARPE (M. E.). 1966. A preliminary investigation of the importance of the *Clostridia* in the production of rancid flavour in Cheddar cheese. *J. Dairy Res.*, **33**, 139-149.
- GRECZ (N.), WAGENAAR (R. O.) et DACK (G. M.). 1965. Storage stability of *Cl. botulinum* toxin and spores in processed cheese. *Appl. Microbiol.*, **13**, 1 014-1 022.
- GREEN (J. H.) et LITSKY (W.). 1966. A new medium and « mimic » MPN method for *Clostridium perfringens* isolation and numeration. *J. Fd. Sci.*, **31**, 610-614.
- HAMMER (B. W.). 1946. Dairy bacteriology. *John Wiley & Sons, New York*, 2^e édition.
- HARRIGAN (W. F.) et McCANCE (M. E.). 1966. Laboratory methods in microbiology. *Academic Press, Londres*.
- HAUSCHILD (A.H.W.), ERDMAN (I. E.), HILSHEIMER (R.) et THATCHER (F.S.). 1967. Variations in recovery of *Clostridium perfringens* on commercial sulfite-polymyxin-sulfadiazine (SPS) agar. *J. Fd. Sci.*, **32**, 469-473.
- HAUSCHILD (A. H. W.) et THATCHER (F. S.). 1967. Experimental food poisoning heat-susceptible *Clostridium perfringens* type A. *J. Fd. Sci.*, **32**, 467-469.
- HIRSCH (A.), McCLINTOCK (M.) et MOCQUOT (G.). 1952. Observation on the influence of inhibitory substances produced by the lactobacilli of Gruyère cheese on the development of anaerobic spore formers. *J. Dairy Res.*, **19**, 179-186.
- HIRSCH (A.) et GRINSTED (E.). 1954. Methods for the growth and enumeration of anaerobic spore formers from cheese, with observations on the effect of nisin. *J. Dairy Res.*, **21**, 101-110.

- HOBBS (B. C.). 1965. *Clostridium welchii* as a food poisoning organism. *J. appl. Bact.*, **28**, 74-82.
- HOBBS (B. C.). 1968. Les *Clostridium perfringens* dans les toxi-infections alimentaires. Colloque « Les *Clostridium* dans les produits alimentaires », Lille, janvier 1968. *Annales Inst. Pasteur*, Lille, 19, sous presse.
- HOSTETTLER (H.), SAHLI (K.) et BINZ (M.). 1941. Beitrag zur Methodik des Nachweises anaerober Buttersäurebazillen in Milch. *Mitt. Geb. Lebensmittelunters. u. Hyg.*, **32**, 76-90, in *Dairy Sci. Abstr.*, **4**, p. 138.
- HUDSON (J. R.) et TANNER (F. W.). 1922. A note on the Weinzirl anaerobic spore test for determining manurial pollution of milk. *J. Dairy Sci.*, **5**, 377-382.
- KAUFMANN (O. W.) et BRILLAUD (A. R.). 1961. Development of *Clostridium botulinum* spores in sterile milk. *J. Dairy Sci.*, **44**, 1161-1162.
- KAUFMANN (O. W.) et MARSCHALL (R. S.). 1965. Factors affecting the development of *Clostridium botulinum* in whole milk. *Appl. Microbiol.*, **13**, 521-526.
- KGK (1949). (Démonstration de la présence de bactéries butyriques sous formes végétatives) (en suédois). *Svenska Mejeritidn.*, **41**, 528.
- KURMANN (J. A.). 1963. Zur Kenntnis der bakteriellen Verhältnisse in der pasteurisierten Gärprobe. *Schweiz. Milchztg.*, **89** (69), 1.
- KURMANN (J. L.), OEHEN (V.) et RITTER (P.). 1967. Zusammenhänge zwischen dem Befund von Buttersäurebazillen in des Milch und dem Auftreten von Spätblähungen in Sbrinzkäsen. *Schweiz. Milchztg.*, **93**, (48), 373-4.
- KUTZNER (H. J.). 1963. Untersuchungen an Clostridien mit besonderer Berücksichtigung der für die Milchwirtschaft wichtigen Arten. *Zentbl. Bakt. Parasitkde. I. Abt.*, **191**, 441-450.
- KUTZNER (H. J.). 1966. Untersuchungen über die Buttersäuregärung in Schmitt- und Hartkäse. *XVII^e Cong. Intern. Laiterie*, **D2**, 647-658.
- LEWIS (K. H.) & ANGELOTTI (R.). 1964. *Examination of foods for enteropathogenic and indicator bacteria*. U.S. Dept. Health, Educ. and Welfare, Washington.
- LIND (C. S.). 1956. Studies on the growth of the *Clostridia*. *XIV^e Congr. Intern. Laiterie*, **3** (II), 276-285.
- LOWBURY (B. J. L.) et LILLY (H. A.). 1955. A selective plate medium for *Clostridium welchii*. *J. Path. Bact.*, **70**, 105-109, in Marshall & al., 1965.
- MARSHALL (R. S.), STEENBERGEN (J. F.) et MCLUNG (L. S.). 1965. Rapid technique for the numeration of *Clostridium perfringens*. *Appl. Microbiol.*, **13**, 559-563.
- MOORE (W. E. C.), CATO (E. P.) et HOLDEMAN (L. V.). 1966. Fermentation patterns of some *Clostridium* species. *Int. J. syst. Bacteriol.*, **16**, 383-415.
- MOSS (C. W.) et LEWIS (V. J.). 1967. Characterization of *Clostridia* by gas chromatography. I. Differentiation of species by cellular fatty acids. *Appl. Microbiol.*, **15**, 390-397.
- MOSSEL (D. A. A.). 1959. Enumeration of sulphite-reducing *Clostridia* occurring in foods. *J. Sci. Fd. Agric.*, **10**, 662-669.
- MOSSEL (D. A. A.). 1968. Recherche et dénombrement des *Clostridium* dans les produits alimentaires. Colloque « Les *Clostridium* dans les produits alimentaires », Lille, janvier 1968. *Annales Inst. Pasteur*, Lille, sous presse.
- MOSSEL (D. A. A.), BEERENS (H.), TAHON-CASTEL (M^{me}), BARON (G.) et POLSPOEL (B.). 1965. Etude des milieux utilisés pour le dénombrement des spores des bactéries anaérobies en microbiologie alimentaire. *Annales Inst. Pasteur*, Lille, **16**, 147-156.
- NARAYAN (K. G.). 1967. Selective agents in cultivation of *Clostridia*. *Zentbl. Bakt. Parasitkde. I. Abt.*, **201**, 57-64.
- NARAYAN (K. G.). 1967. Incidence of the blood poisoning *Clostridia* in meat animals. *Zentbl. Bakt. Parasitkde. I. Abt.*, **204**, 265-273.

- NARAYAN (K. G.) et TAKACS (J.). 1966. The sulphite-reducing ability of *Clostridia* in a modified sulphite agar medium. *Acta vet. hung.*, **16**, 45-51.
- PAPAVASSILIOU (J.). 1956. Bactéries anaérobies sporulées des laits pasteurisés. *J. Arch. Inst. Pasteur hellen.*, **2**, 139.
- PAQUET (B.) et GAUVIN (D.). 1953. Fréquence et signification des *Clostridium* à fermentation gazeuse dans le lait. *Canad. J. publ. Health*, **44**, 22.
- PETTRANSIENNE (D.) et LAPIED (L.). 1962. La qualité bactériologique du lait. F.N.P.L.
- PLOMMET (M.). 1956. L'ébullition domestique du lait, son action sur la flore microbienne et les constituants du lait. *Annales Technol. agric.*, **4**, 493-519.
- POHL (P.) et THOMAS (J.). 1966. Revues des techniques simples d'isolement et d'identification des principaux germes anaérobies sporulés à Gram positif. *Ann. Med. Vétérinaire*, **110**, 422-447.
- PRÉVOT (A. R.) et THOUVENOT (H.). 1952. Le lait peut-il transmettre des maladies anaérobies. *Annales Inst. Pasteur, Paris*, **83**, 180-183.
- PUT (H. M. C.). 1961. Sulfite-réduction et sulfite-sensibilité des *Clostridia*. Considérations taxonomiques et pratiques. *Annales Inst. Pasteur, Lille*, **12**, 175-181.
- RITTER (W.), SAHLI (K.), SCHILT (P.) et HEUSCHER (E.). 1963. Beitrag zur Kenntnis des Lactatvergärung durch Buttersäurebazillen. *Schweiz. Milchztg.*, **47** (91), 723-730.
- ROMAGNOLI (G.) et BREZZI (G.). 1960. La contaminazione fecale del latte rivelate mediante ricerca dei *Clostridi* sulfite-reductor. *Riv. ital. Ig.*, **20**, 48-55, in *Dairy Sci. Abt.*, **23**, 1 444.
- ROSENBERGER (R. F.). 1951. The development of methods for the study of obligate anaerobes in silage. *Proc. Soc. appl. Bact.*, **14**, 161-164.
- ROSENBERGER (R. F.). 1956. The isolation and cultivation of obligate anaerobes from silage. *J. appl. Bact.*, **19**, 173-180.
- RUSCHMANN (G.). 1928. Vergleichende biologische und chemische Untersuchungen an Stalldüngersorten. *Zentbl. Bakt. Parasitkde.*, **2. Abt.**, **75**, 405-423.
- SAHLI (K. W.). 1961. Die verschiedenen Verfahren zur Ermittlung einer Buttersäuregärung im Käse, mit besonderer Berücksichtigung der Verhältnisse bei schweizerischen Hartkäsen. *Schweiz. Milchztg.*, **9**, (75), 3-22.
- SHANK (J. L.). 1963. Applications of the plastic film technique in the isolation and study of anaerobic bacteria. *J. Bact.*, **86**, 95-100.
- SOUTHWORTH (J. M. L.) et STRONG (D. H.). 1964. Comparison of media for the isolation of *Clostridium perfringens* from food. *J. Milk Fd. Technol.*, **27**, 205-209.
- STÜSSI (D. B.). 1961. Beitrag zur Physiologie von *Clostridium butyricum* Frazm. unter besonderer Berücksichtigung der Sporulation und der Germination. *Landw. Jb. Schweiz.*, **75**, 577-631.
- SUTTON (R. G. A.). 1966. Enumeration of *Clostridium welchii* in the feces of varying sections of the human population. *J. Hyg.*, **64**, 367-374.
- TAYLOR (C. E. D.) et COETZEE (E. F. C.). 1966. Range of heat resistance of *Clostridium welchii* associated with suspected food poisoning. *Mon. Bull. Min. Health, Public Health Lab. Serv.*, **25**, 142-144, in *Bioresearch Index*, 1967 (2).
- THATCHER (F. S.) et CLARK (D. S.). 1967. The significance of microorganisms in food and methods for their enumeration. *Report of the I.A.M.S. International Committee on Microbiological Specifications for Foods*.
- THOMÉ (K. E.) et SWARTLING (P.). 1953. Influence of silage quality on cheese-milk and cheese quality. *XIII^e Cong. Internat. Laiterie*, **2**, 69-75.
- THOMÉ (K. E.), SWARTLING (P.), LODIN (L. O.), MATTSSON (S.), WESSNER (P.), BUHRGARD (A. B.) et LINGDREN (B.). 1952. (Silage quality and Herrgard cheese) (en suédois). *Medd. Mejeriförs.*, Malmö, **38**, in *Dairy Sci. Abstr.*, **15**, 306.

- VAN BEYNUM (J.) et PETTE (J. W.). 1936. Zuckervergärende und laktatvergärende Buttersäurebakterien. *Zentbl. Bakt. ParasitKde*, 2. Abt., **93**, 198-212.
- WAES (G.) et DEVOGELAERE (R.). 1966. L'altération par des anaérobies sporulés d'un produit acidifié et stérilisé. *XVII^e Congr. Inter. Laiterie, E/F*, 581-586.
- WAGENAAR (R. O.) et DACK (G. M.). 1955. Studies on canned cheese spread experimentally inoculated with spores of *Clostridium botulinum*. *Fd. Res.*, **20**, 144-148.
- WALTER (W. G.). 1967. Standard methods for the examination of dairy products. *Amer. Public Health Ass.*, New York, 12^e édition.
- WEINZIRL (J.). 1916. A simple test for *Bacillus sporogenes* in milk and water. *Zentbl. Bakt. ParasitKde*. 2. Abt., **45**, 392.
- WEINZIRL (J.). 1921. Detection of manurial pollution in milk by the anaerobic spore test. *Am. J. Pub. Health*, **11**, 149.
- WEINZIRL (J.) et VELDEE. 1915. *Amer. J. Publ. Health*, **5**, 862 in Hammer, 1946.
- WHEATON (E.), PRATT (G. B.) et JACKSON (J. M.). 1959. Comparative studies for counting anaerobic bacterial spores. *Fd. Res.*, **24**, 134-145.
- WILLIS (A. T.). 1957. Observations on the anaerobes present in a city water, with special reference to *Clostridium welchii*. *J. appl. Bact.*, **20**, 53-60.
- WILLIS (A. T.) et HOBBS (G.). 1959. Some new media for the isolation and identification of *Clostridia*. *J. Path. Bact.*, **77**, 511.
- WILSON (W. J.) et BLAIR (E. M. M' V.). 1924. The application of a sulphite-glucose-iron agar medium to the quantitative estimation of *Bacillus welchii* and other reducing bacteria in water supplies. *J. Path. Bact.*, **27**, 119.
- WINKLER (S.). 1961. Vergleichende Untersuchungen an anaeroben Problem. *Ost. Milchw.*, **16**, 109-112, in *Dairy Sci. Abstr.*, **23**, 2 960.
- WINKLER (S.). 1967. Zum Nachweis von Clostridien. 2. Mitteilung : Versuche mit natürlichen Substraten. *Milchwissenschaft.*, **22**, 23-25.
- ZAADHOF (K. J.) et TERPLAN (G.). 1967. Zur Eignung verschiedenen Nährmedien für den Nachweis von Clostridien und Proteolyten in Milch. *Arch. Lebensmittelhyg.*, **18**, 27-30.