

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

I. MÉTHODES ET TECHNIQUES GÉNÉRALES DE NUMÉRATION

par

O. CERF

*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 spores viables.
 - 2.1. Préparation de l'échantillon.
 - 2.2. Obtention des conditions anaérobies.
 - 2.2.1. Régénération et répartition du milieu de culture.
 - 2.2.2. Addition de composés réducteurs dans le milieu de culture.
 - 2.2.3. Culture simultanée d'organismes aérobies stricts.
 - 2.2.4. Séparation de l'atmosphère ambiante.
 - 2.2.5. Exclusion de l'oxygène ambiant par des moyens chimiques ou physiques.
 - 2.2.6. Indicateurs d'anaérobiose.
 - 2.3. Comparaison des numérations sur milieux solides et liquides.
 - 2.3.1. Utilisation de milieux solides.
 - 2.3.1.1. Boîtes de Petri.
 - 2.3.1.2. Tubes.
 - 2.3.1.3. Autres procédés.
 - 2.3.2. Utilisation de milieux liquides.
3. Choix entre les méthodes. Conclusion.
4. Travaux cités.

I. Introduction

Les spores des bactéries du genre *Clostridium* (Breed, Murray & Smith, 1957 ; Oakley, 1956 & 1963 ; Skerman, 1967) sont répandues d'une manière universelle dans les sols et les eaux, et peuvent contaminer tous les produits destinés à l'alimentation humaine. Des espèces pathogènes comme *Cl. botulinum* ou *Cl. perfringens* sont susceptibles de s'y développer et de produire des toxines constituant un danger pour le consommateur. D'autres, comme

Cl. sporogenes, sans être pathogènes au sens strict, sont parfois la cause de colites et de plus, par leur forte activité putréfiante, rendent les aliments impropres à la consommation. Les *Clostridium* du groupe butyrique, dont le développement entraîne l'apparition de mauvais goûts, une acidification et la production de gaz, sont aussi très nuisibles bien que non pathogènes. Il est donc important pour l'hygiéniste comme pour le technologue, de connaître le nombre de *Clostridium* qui contaminent les aliments.

Nous étudierons dans cet article les méthodes générales de numération, puis, dans un second article, celles que l'on peut utiliser pour compter les spores de *Clostridium* dans le lait et les produits laitiers.

Pourquoi est-on amené en général à faire la numération des spores et non celle des formes végétatives ? C'est que, par exemple, si l'on a affaire à des produits qui doivent subir un traitement thermique fort (stérilisation), les formes végétatives n'ont aucune importance ; seul le nombre initial de spores présentes est important à connaître pour le « thermobactériologiste » (Stumbo, 1965), que ce soit le cas d'une contamination naturelle ou celui d'une contamination artificielle. De même, lorsqu'on cherche la cause d'une infection alimentaire, les formes végétatives ont bien souvent disparu au moment où l'expertise a lieu et seules des spores (formes de survie) peuvent être dénombrées. Ou bien si la contamination se fait principalement sous forme de spores et que celles-ci ne se développent pas dans le produit où on les recherche (le lait), mais seulement à un autre stade de la fabrication (le fromage), c'est encore un nombre de spores qu'il faut connaître. Enfin et surtout, il n'existe, sauf pour *Cl. perfringens*, aucun milieu permettant de cultiver sélectivement les formes végétatives des *Clostridium* et permettant de les distinguer des bactéries anaérobies non sporulées.

Les spores de *Clostridium* sont en général peu nombreuses et ce fait rend les numérations difficiles et imprécises. Cependant les spores ont deux propriétés qui facilitent, si l'on peut dire, leur recherche : elles sont thermorésistantes et ne se développent qu'en anaérobiose. Par un chauffage modéré, il est donc possible de tuer tous les organismes non sporulés et l'anaérobiose permet d'éliminer tous les microorganismes aérobies stricts.

Malheureusement, la température et la durée de ce chauffage modéré ne sont pas simples à déterminer. La limite supérieure est dictée par la nécessité de ne détruire qu'un pourcentage aussi faible que possible de spores, ce qui est délicat lorsque la différence de thermorésistance entre les cellules végétatives et les spores est faible. De plus, lorsque le chauffage a lieu dans le milieu utilisé pour effectuer les dilutions de l'échantillon on ne connaît pas toujours les caractéristiques de thermorésistance des spores que l'on cherche à dénombrer. Par exemple, l'école anglaise (Hobbs, 1965) admet que les spores de *Cl. perfringens* responsables de toxi-infections

alimentaires résistent à une courte ébullition, mais des spécialistes américains (Hauschild & Thatcher, 1967), considérant que ces spores ne sont pas thermorésistantes, préfèrent compter aussi les cellules végétatives. La limite inférieure du chauffage est également difficile à fixer. En effet le chauffage est nécessaire non seulement pour tuer les cellules végétatives, mais aussi pour stimuler la germination des spores. Le taux de spores capables de germer est fonction de la température et de la durée de ce chauffage dit d'« activation ». Finalement, on peut être amené à faire subir des traitements thermiques différents à plusieurs échantillons du même produit afin de compter les spores appartenant à diverses espèces : traitement « faible » pour les espèces du groupe butyrique, traitement « fort » pour *Cl. sporogenes*, dont les spores ont besoin d'être activées et sont relativement très thermorésistantes.

Pour compter les spores sans avoir à tenir compte de toutes les objections que nous venons de faire, Favero (1967) suggère de détruire les formes végétatives par l'alcool éthylique, qui n'a pas d'effet délétère notable sur les spores même si on prolonge son action. Mais cet auteur n'a pas décrit les techniques mettant en œuvre ses suggestions.

Les techniques d'anaérobiose elles-mêmes ne sont pas à l'abri de critiques importantes : elles sont délicates à mettre en œuvre et surtout, elles laissent cultiver les anaérobies facultatifs. Si la numération est effectuée sur boîtes de Petri et à la surface de la gélose, il existe cependant un test permettant de distinguer les colonies de bactéries possédant des cytochromes (Deibel & Evans, 1960), ce qui est le cas de bactéries sporulées non aérobies strictes, du genre *Bacillus*.

Pratiquement, ce sont des méthodes de numération des spores de bactéries anaérobies ayant survécu au chauffage destiné à détruire les formes végétatives et susceptibles de germer et de cultiver dans les conditions choisies, au cours d'une incubation de durée limitée, que nous étudierons maintenant après avoir cité pour mémoire les méthodes de numération directe des spores sous le microscope.

Demeter (1967) donne une description de celles qui sont applicables aux produits laitiers. Elles ne permettent pas de distinguer les espèces, ni de séparer aérobies et anaérobies. C'est pourquoi plusieurs équipes s'attachent à mettre au point l'utilisation d'anticorps spécifiques fluorescents (Walker, 1963 ; Batty & Walker, 1963 ; Lipshyc' & Nagorna, 1964 ; Sharpe & Goudkov, 1966). En particulier dans le cas de *Cl. botulinum*, la solution semble en vue (Ingram & Roberts, 1967). Cependant on ne pourra utiliser la numération directe que pour les échantillons fortement contaminés.

Pour la numération des spores en culture pure, la cellule de comptage de Petroff-Hausser semble la plus commode (Stüssi,

1961 ; Pheil & Ordal, 1967). On trouvera dans Leroy & Stüssi (1962) et Cassel (1965) des indications pour obtenir avec cette technique une précision optimale.

2. Numération des spores viables

On peut trouver dans Weinberg, Nativelle & Prévot (1937) une description complète des méthodes de culture et d'isolement des anaérobies telles qu'elles étaient connues à l'époque de cette publication. L'isolement des *Clostridium* a été traité récemment par Pohl & Thomas (1966) et Narayan (1967). Pour notre part, nous nous efforcerons dans ce qui suit de décrire les techniques, anciennes (mais ayant fait l'objet d'améliorations) ou nouvelles, qui permettent d'obtenir une numération des spores.

2.1. Préparation de l'échantillon.

L'échantillon mélangé à un diluant liquide est chauffé pour détruire les formes végétatives à des températures et pendant des temps variables selon les espèces étudiées et les auteurs. Citons par exemple : pour *Cl. butyricum*, 75° C, 20 mn (Gibbs & Hirsch, 1956) ; 75° C, 30 mn (Gibbs & Freame, 1965) ; 78° C, 10 mn (Stüssi, 1961) ; et selon Binder (1960) au plus 70° C, 40 mn ou 80° C, 10 mn ; pour *Cl. sporogenes*, 80° C, 20 mn (A.P.H.A., 1966) ; 100° C, 10 mn (C.N.E.R.N.A., 1961) ; etc. Pour éviter qu'un trop fort pourcentage de spores ne soient détruites par ce traitement, il est recommandé d'amener l'échantillon à un pH voisin de la neutralité avant ce chauffage (Cerf, Bergère & Hermier, 1967). Il est souvent plus simple de n'effectuer le chauffage que lorsque les dilutions sont réparties dans le milieu de culture, si toutefois il s'agit d'un milieu liquide dont le pH est voisin de 7.

Les spores ne sont pas tuées dans l'eau distillée et on peut donc utiliser comme diluant l'eau distillée ou l'eau du robinet (Rosenberger, 1956). Mais pour obtenir une bonne répartition des spores, lorsqu'on les recherche dans des produits solides, on peut préférer une solution de citrates comme Frazier, Burkey, Boyer, Sanders & Matheson (1935). Gibbs & Freame (1965) ont comparé la liqueur de Ringer au 1/4, additionnée ou non de cystéine et l'eau peptonée et ont préféré l'eau peptonée. De même Hauschild, Erdman, Hilsheimer & Thatcher (1967) préférèrent l'eau peptonée au tampon phosphate. Le milieu de culture lui-même est recommandé par Barnes & Ingram (1956).

A partir des dilutions du produit à analyser, la numération des spores peut se faire sur milieu gélosé par numération de colonies (dans des boîtes de Petri ou dans des tubes) ou bien en milieu liquide, par la méthode dite des dilutions ou du nombre le plus probable.

2.2. *Obtention des conditions anaérobies.*

2.2.1 *Régénération et répartition du milieu de culture.*

La germination des spores présentes dans les milieux de culture est favorisée lorsque le potentiel d'oxydo-réduction a une valeur de $-0,200$ V (Reed & Orr, 1943). Quel que soit le milieu utilisé, la première précaution à prendre consiste donc à le régénérer, c'est-à-dire à en chasser l'oxygène dissous par un séjour au bain-marie à 100° C d'un quart d'heure au moins. Avant ensemencement les tubes sont refroidis à 45° C s'il s'agit de milieu gélosé ou à une température inférieure s'il s'agit de milieu liquide.

On peut aussi régénérer le milieu contenu dans une grande fiole, le refroidir immédiatement et le distribuer en tubes, sous pression d'azote (Willingham & Oppenheimer, 1963) : les auteurs indiquent que l'anaérobiose est mieux préservée ainsi, mais il nous semble que ce procédé ne fait qu'augmenter les chances de contamination. Norheim & Müller (1967) et Rojahn (1967) proposent également des appareillages permettant de répartir un milieu dépourvu d'oxygène, sous pression d'azote ou de gaz carbonique. L'emploi de ces appareillages est cependant difficile à adapter au cas particulier de la numération.

Pour que les conditions anaérobies persistent ensuite au cours de l'incubation, divers procédés ont été proposés. Nous allons passer en revue quelques-uns de ceux-ci.

2.2.2 *Addition de composés réducteurs dans le milieu de culture.*

Pour que le milieu de culture reste réducteur pendant la période nécessaire à la germination et au développement des spores, on a utilisé la vitamine C (Klinger & Guggenheim, 1935), le thioglycolate et le formaldéhyde sulfoxylate de sodium (Brewer, 1940), la cystéine (Rosenberger, 1951), des métaux ferreux (Hirsch & Grinstead, 1954 ; Azuma, Ogimoto & Suto, 1962), des ions Cobalt Co^{++} (El Ghazzawi, 1967).

Parmi les composés les plus classiques, il faut encore citer le sulfite de sodium (Beerens, Castel & Leclerc, 1961 ; Narayan & Takacs, 1966), qui se convertit en H_2S fortement réducteur en solution neutre ; le pyruvate de sodium (d'Aubert, 1966) ou la catalase (El Ghazzawi, 1967), qui participent à la décomposition de l' H_2O_2 accumulé dans les cellules ; enfin certains auteurs ajoutent des fragments de tissus animaux, par exemple un morceau de cervelle de mouton entre dans la composition du milieu de Rosenow (Beerens, 1954). La gélose à 0,05 p. 100 limite les mouvements de convection dans les milieux liquides (Hirsch & Grinstead, 1954) et empêche la redissolution de l'oxygène.

Malheureusement, quelques-uns de ces produits se révèlent inhibiteurs de la germination ou de la croissance et il faut éviter

que leur concentration ne dépasse un seuil critique, variable suivant les souches de *Clostridium* étudiées. Par exemple, les *Clostridium* du groupe butyrique sont inhibés par 0,1 p. 100 de thioglycolate de sodium, *Cl. sporogenes* par le sulfoxylate de sodium à partir de 0,2 p. 100 (Rosenberger, 1956) ; un excès de pyruvate est inhibiteur de *Cl. butyricum* (Peel & Watkinson, 1965) ; la concentration maximale non inhibitrice de sulfite de sodium est en général de 0,1 g/l (Stanier, Doudoroff & Adelberg, 1966). Il faut noter cependant que les substances réductrices se révèlent moins inhibitrices en milieu liquide que dans les milieux gélosés (Gibbs & Freame, 1965). Desmet & al. (1966) notent d'autre part que si le milieu classique de Brewer au thioglycolate est fortement inhibiteur pour la plupart des *Clostridium*, le même milieu additionné de soytone (digestat enzymatique de soja) convient mieux pour la plupart des souches étudiées.

2.2.3. Culture simultanée d'organismes aérobies stricts.

De nombreuses espèces ont été utilisées. On peut citer parmi les travaux récents ceux de Kneteman (1957) utilisant une culture de microcoques et de Fortner (1957) utilisant *Serratia marcescens*. Van der Heyde & Henderickx (1964) utilisent *Escherichia coli*, tandis que Struppe (1966) utilise *Bacterium prodigiosum*. La culture aérobie utilise l'oxygène dissous dans le milieu et celui de l'atmosphère : elle doit donc se faire à l'intérieur d'un vase clos dont l'épuisement en oxygène soit rapide. Il faut s'assurer que les organismes aérobies ne sont en rien inhibiteurs des spores, ne serait-ce, par exemple, que par l'acidification du milieu qu'ils peuvent provoquer.

2.2.4. Séparation de l'atmosphère ambiante.

Dans le cas de la culture simultanée d'organismes aérobies, les tubes ou les boîtes de Petri peuvent être simplement déposés dans un dessiccateur, ou enveloppés dans un sac en matière plastique (Struppe, 1966) ; ou encore le milieu peut être recouvert lui-même par un film plastique (Kneteman, 1957). Ce dernier procédé est recommandé par Shank (1963) et Scheist & Smith (1963) pour recouvrir des boîtes de Petri contenant un milieu réducteur mais Marth, Sherman, Hasenzahl & Hussong (1966) préfèrent envelopper chaque boîte dans une poche en matière plastique. Sur les milieux gélosés il est plus simple de couler de la gélose au thioglycolate : par exemple Rosenberger (1951) recommande une gélose au thioglycolate, à la cystéine et à la résazurine, indicateur d'oxydo-réduction. Mais le thioglycolate diffuse dans la gélose nutritive et risque d'y dépasser le seuil d'inhibition. Une plaque de verre placée entre les deux couches de gélose pallie cet inconvénient (Andersen, 1951). Il est possible aussi — et c'est obligatoirement cette solution qui est adoptée pour les milieux liquides répartis en tubes — de

verser, sur une épaisseur de 1 cm au moins de l'huile de vaseline, de la paraffine fondue, un mélange à parts égales d'huile de vaseline et de paraffine (« vaspar ») (Salle, 1948), un mélange de 1 partie de paraffine, 1 partie d'huile de vaseline et 4 parties d'huile minérale (Stumbo, 1965), un mélange de 1 partie d'huile minérale et de 10 parties de « petrolatum » (Pheil & Ordal, 1967). Demeter (1967) recommande le mélange suivant : 50 g de vaseline, 2 g de gélose, 1 ml de Tween 80 pour 50 ml d'eau distillée, amené à ébullition, puis autoclavé. Le mélange vaspar, facile à préparer, convient cependant très bien.

On utilise parfois les couvercles anaérobies pour boîtes de Petri de Brewer (1942) : ceux-ci viennent en contact avec la gélose mais laissent une frange non recouverte autour de la boîte, ce qui nuit à la précision des numérations.

2.2.5. Exclusion de l'oxygène ambiant par des moyens chimiques ou physiques.

La méthode la plus ancienne est celle utilisée par Buchner (1888) : l'oxygène est absorbé par le pyrogallol alcalinisé par la soude. En enfonçant le bouchon de coton imbibé de soude dans un tube à essai et en le recouvrant de pyrogallol, on réalise l'anaérobiose dans le tube lorsque celui-ci est fermé hermétiquement par un bouchon de caoutchouc. Il existe des tubes à tubulures annexes spécialement prévues pour y réaliser cette réaction (Fuhrmann, 1943 ; Pankhurst, 1967). Si l'on utilise des boîtes de Petri, on place le pyrogallol et la soude dans le couvercle de la boîte retournée (Petsi, 1965). Pour isoler la boîte, Beerens & Castel (1959) et Naylor (1963) l'entourent d'un ruban cellulosique adhésif, et Hartwigk & Tzimas (1965) d'un anneau de caoutchouc. Bray (in Salle, 1948) et Spray (1936) ont conçu des boîtes spéciales dont le couvercle possède une rainure que l'on scelle à la boîte en y coulant de la paraffine ; le couvercle lui-même est partagé en deux, ce qui permet de ne mélanger la soude au pyrogallol que lorsque le joint est scellé. Hartwigk & Tzimas proposent l'artifice suivant : un « dessous de verre à bière » occupant tout le fond du couvercle d'une boîte de Petri est imbibé du mélange soude pyrogallol et sert en même temps de joint d'étanchéité.

Cependant, si Naylor et Hartwigk & Tzimas utilisent la réaction de Buchner, Beerens & Castel, ainsi que Mossel, Van Golstein-Brouwers & De Bruin (1959), Petsi (1965) et Pheil & Ordal (1967) préfèrent la modification de Ritter & Dorner (1932), dans laquelle du carbonate de sodium et de la terre d'infusoire sont mélangés au pyrogallol. Le choix entre les deux réactions ne doit pas rester limité à des questions de matériel seulement : en effet la réaction de Buchner est très alcaline et absorbe, en plus de l'oxygène, le gaz carbonique. Au contraire, la réaction de Ritter & Dorner enrichit l'atmosphère en gaz carbonique ce qui convient mieux à

certaines espèces bactériennes (Stanier, Doudoroff & Adelberg, 1966).

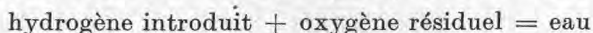
Les méthodes citées jusqu'ici dans les paragraphes 2.2.2, 2.2.3, 2.2.4 peuvent être combinées entre elles (Van der Heyde & Henderickx, 1965). La méthode de Buchner n'est pas capable en effet à elle seule de rendre l'ambiance totalement exempte d'oxygène : seules s'en contentent des bactéries n'exigeant pas une anaérobiose stricte (Collins, 1964). Pourtant les *Clostridium* du groupe butyrique, bien que peu exigeants (Kayser, 1962), ne peuvent se satisfaire de cette méthode (observations personnelles), lorsque des boîtes ou des tubes sont placés dans la cloche à vide où la réaction a lieu.

C'est pourquoi s'est étendu l'emploi des « jarres anaérobies » ; lorsque les organismes à compter ne sont pas trop exigeants, on se contente de remplacer l'air de la jarre par un autre gaz. Divers mélanges sont proposés :

- Gaz carbonique : Khairat (1964), Binder (1960).
- Azote : Van der Heyde & Henderickx (1964), Elliott (1966).
- 90 p. 100 d'azote et 10 p. 100 de CO₂ : Angelotti, Hall, Foter & Lewis (1962), Gough & Alford (1965).
- Hydrogène : Kim (1965).
- 10 p. 100 H₂, 10 p. 100 CO₂ et 80 p. 100 N₂ : Moss, Schekter & Cherry (1967).
- 75 p. 100 H₂, 25 p. 100 CO₂ : El Ghazzawi (1967).

On trouvera dans Skerman (1967) un moyen simple de mélanger les gaz dans les proportions désirées.

Mais l'anaérobiose ainsi obtenue n'est pas satisfaisante dans tous les cas. Ceci explique le grand succès des jarres à catalyse, qui remonte à McIntosh & Fildes (1916). La réaction :



est catalysée par des produits couverts par de nombreux brevets, à base d'asbeste ou d'alumine et de palladium (Heller, 1954) par exemple, dans des jarres de Case ou de Forma (Robohm & Graikoski, 1966), dans celles de Torbal (McMillan & Ridge, 1966). Certains d'entre ces produits sont empoisonnés par l'hydrogène sulfureux ; il faut s'en méfier dans le cas des souches de *Clostridium* productrices de ce gaz. La jarre de Brewer utilisée en Amérique date de 1939 (Fredette, 1964). Dans cette jarre qui peut être utilisée avec de l'hydrogène pur aussi bien qu'avec du gaz de ville, le catalyseur à base de platine est chauffé à l'intérieur du couvercle. Ces jarres peuvent présenter certains dangers lorsque l'air y pénètre en proportion telle que le mélange devienne détonnant, mais Morton (1943) a indiqué quelles précautions devaient être prises pour éviter un tel risque. Les jarres de Brewer sont donc très utilisées et des améliorations leur sont constamment apportées

(Khairat, 1963 & 1964a ; Moore, Engwall & Moskal, 1964 ; Brewer & Allgeier, 1966 ; McMillan & Ridge, 1966 ; Cohen, 1967 ; voir aussi Gravens, Cole & Bernard, 1967 ; Lickfeld, 1967).

D'autres systèmes de catalyse ont été proposés, comme par exemple celui de Fabian (1965) : une solution tamponnée de glucose et de glucose-oxydase capable d'absorber 0,4 M d'oxygène est placée dans une jarre, elle-même remplie de 95 p. 100 d'azote et de 5 p. 100 de gaz carbonique. Citons encore la « candle-oats jar » (jarre bougie-avoine) utilisée par Vedamuthu & Rheinbold (1967) : dans celle-ci après fermeture de la jarre, la combustion d'une bougie consomme l'oxygène libre en dégageant du gaz carbonique, puis les traces d'oxygène restant sont consommées par la germination de l'avoine.

2.2.6. Indicateurs d'anaérobiose.

Après que l'anaérobiose a été réalisée, on peut vouloir s'assurer qu'elle a bien été maintenue. Il est possible de faire entrer dans la composition du milieu un indicateur d'oxydo-réduction comme la résazurine (Mossel & al., 1959), ou le bleu de méthylène (Barnes & Ingram, 1956). A l'intérieur d'une jarre on dispose généralement un tube d'une solution alcaline de bleu de méthylène glucosée fraîchement régénérée (Riemsdijk, 1932). Brewer, Allgeier & McLaughlin (1966) préfèrent disposer ce mélange dans un sac de Teflon.

2.3. Comparaison des numérations sur milieux solides et liquides.

2.3.1. Utilisation des milieux solides.

2.3.1.1. Boîtes de Petri.

L'avantage primordial de l'utilisation des boîtes de Petri est d'obtenir une numération dont la précision est satisfaisante. Si, pour deux boîtes le nombre moyen de colonies est 100, l'intervalle de confiance (coefficient de sécurité 0,95) est : (86, 114). Cet intervalle peut encore être réduit si l'on se sert de la formule de Farmiloe, Cornford, Coppock & Ingram (1954) qui tient compte des nombres de colonies obtenus sur les boîtes correspondant à des dilutions successives. Roberts & Coote (1965) affirment qu'il est inexcusable de ne pas employer cette formule. Un autre avantage des boîtes de Petri, à condition de répartir l'échantillon ou sa dilution uniquement à la surface de la gélose, est de pouvoir distinguer les colonies de *Bacillus* qui peuvent se développer malgré l'anaérobiose. La réaction à la benzidine de Deibel & Evans (1960) permet en effet de mettre en évidence les colonies de bactéries possédant des enzymes à cytochromes.

L'inconvénient qu'il y a à utiliser des boîtes de Petri est que, à moins d'employer des milieux réducteurs (donc fort probablement inhibiteurs), il faut éliminer l'oxygène ambiant par des techniques laborieuses et exigeantes en matériel spécialisé et vérifier que l'anaé-

robiose se maintient bien pendant la durée de l'incubation. De plus, les espèces mobiles peuvent envahir la surface du milieu, surtout dans les jarres à catalyse qui sont très humides. Lewis & Angelotti (1964) recommandent alors d'employer des milieux gélosés à seulement 0,6 p. 100, en disposant, à l'intérieur des couvercles des boîtes de Petri, des disques de papier absorbant. Il est plus simple, comme Moore, Engwall & Moskal (1964), de placer au fond de la jarre quelques grammes de CaCl_2 .

2.3.1.2. Tubes.

Les tubes ordinaires bien que trop épais, ou mieux les tubes à section elliptique (Miller, Garrett & Prickett, 1939), permettent de compter des colonies dans des milieux faiblement réducteurs ou simplement réduits et recouverts de paraffine, à condition que la formation de colonies ne s'accompagne pas de dégagement gazeux. Sinon les gaz dilacèrent la gélose et peuvent rendre la numération impossible. Cette méthode est souvent employée lorsque des milieux sélectifs permettent de dénombrer des bactéries à croissance rapide (Mossel, De Bruin, Van Diepen, Vendrig & Zouterwelle, 1956; Gibbs & Freame, 1965; Marshall, Steenberger & McLung, 1965).

Une variante a été proposée par Barnes & Ingram (1956) et Ingram & Barnes (1956) : au milieu de la gélose mise dans un tube ordinaire on place une baguette de verre noir. Les colonies blanches se détachent bien sur ce fond noir.

Mais le système le plus classique reste celui des tubes « en gélose profonde », mis au point par Veillon dès 1898 (Veillon, 1922). Certains auteurs utilisent des tubes très profonds pouvant atteindre 40 cm (Raibaud, Dickinson, Sacquet, Charlier & Mocquot, 1966). Seule une petite portion de la colonne de gélose risque d'être réoxygénée pendant la période d'incubation, et l'on discerne facilement les colonies, car ces tubes sont étroits (0,8 cm de diamètre). Malheureusement, il est tout à fait impossible de compter les colonies de souches gazogènes : la gélose est tout de suite rompue, au point de chasser les cotons et de jaillir hors du tube.

En général les milieux gélosés contiennent 1,5 g de gélose/100 g de milieu ; les colonies peuvent s'y développer plus ou moins facilement suivant les souches, et rester trop petites pour qu'on les discerne bien. Aussi Eller, Rogers & Wynne (1967) préconisent-ils pour *Cl. sporogenes* 0,5 p. 100 et pour *Cl. botulinum* 0,65 p. 100 de gélose pour obtenir des colonies plus grosses et donc discernables plus rapidement, avant production de gaz.

Quels que soient les tubes employés, il n'est pas possible de compter plus de 30 à 50 colonies par tube (Gibbs & Freame, 1965), ce qui rend leur emploi moins souple que celui des boîtes de Petri, sur lesquelles on peut compter de 1 à 300 colonies (Farmiloe & al., 1954). Il reste bien entendu possible, si la numération des

colonies est rendue aléatoire par les gaz, ou par le noircissement du milieu (milieux au sulfite de sodium avec un sel de fer), de faire une numération par la méthode des dilutions : mais alors, il est préférable d'utiliser des milieux liquides (Gibbs & Freame, 1965) (voir paragraphe 2.3.2).

2.3.1.3. *Autres procédés.*

Il convient de citer quatre autres méthodes : celle des « tubes roulés », celle de Bladel & Greenberg (1965), celle de Parker (1965), et celle de la numération sur membrane filtrante.

Dans la méthode des « tubes roulés » (roll tubes), la gélose est répartie uniquement sur la surface d'un tube ou d'un flacon. Cette méthode a été perfectionnée récemment (Toerien & Siebert, 1967 ; McBee, 1967).

La méthode de Bladel et Greenberg consiste à enfermer le milieu réduit contenant les spores à dénombrer dans une poche en matière plastique dont on replie ensuite le col, lorsque la gélose est solidifiée. Pendant le refroidissement, la poche est maintenue entre deux planchettes pour que son épaisseur ne soit pas supérieure à celle d'une boîte de Petri (Greenberg, Bladel & Zingelmann, 1966 ; Waart & Smith, 1967).

La méthode de Parker consiste à prélever une partie aliquote d'un milieu gélosé contenant les spores à dénombrer à l'aide d'une pipette, puis les extrémités de la pipette sont plongées dans la paraffine. On compte les colonies dans la pipette elle-même à l'aide d'une loupe.

La numération sur membrane a été expérimentée par Beerens, Castel & Leclerc (1961), mais ne semble pas d'utilisation commode.

2.3.2. *Utilisation des milieux liquides.*

L'intervalle de confiance (coefficient de sécurité 0,95) du nombre le plus probable, avec 5 tubes par dilution, obtenu par des tables classiques (comme par exemple celles de Walter (1967)), est de 0,3 fois à 3,3 fois ce nombre ; mais cet intervalle peut être légèrement réduit en employant la table de Taylor (1962) : de 0,26 à 2,6 fois le nombre le plus probable. Bien entendu, avec moins de 5 tubes par dilution, la méthode est encore moins précise : on ne doit l'employer que pour des numérations approximatives. Au contraire prendre plus de 5 tubes par dilution donne évidemment une meilleure précision. Il est recommandé alors de faire deux galeries ou plus, avec chacune 5 tubes par dilution, et de faire la moyenne géométrique des nombres les plus probables obtenus pour chaque galerie (Taylor, 1962). Il est à noter qu'une contamination éventuelle peut modifier les résultats obtenus par cette méthode des dilutions dans des proportions plus fortes que dans le cas des comptages de colonies sur milieu gélosé.

Cependant Gibbs & Freame (1965) préfèrent la méthode des dilutions à toute autre pour les raisons suivantes :

— Elle peut être utilisée pour compter un très petit nombre de spores, ce qu'une numération sur boîte ne permet de faire qu'avec une imprécision très forte ;

— Les *Clostridium* cultivent toujours mieux sur milieu liquides que sur milieux solides ;

— Il n'est pas besoin de jarres anaérobies, dans lesquelles ils constatent par ailleurs que les résultats sont irréguliers ;

— Les milieux de culture ne sont pas déchiquetés par les gaz et il est donc possible d'y inclure plus de glucides ;

— Les substances inhibitrices des autres bactéries sont moins inhibitrices des *Clostridium* dans les milieux liquides que dans les milieux solides ;

— La toxicité des cultures peut être vérifiée directement à partir des milieux liquides.

Ajoutons qu'il n'est pas nécessaire de rompre les conditions d'anaérobiose pour observer la croissance.

3. Choix entre les méthodes. Conclusion

Le choix à faire entre deux méthodes et entre un nombre infini de techniques ou de combinaisons de techniques montre qu'à l'heure actuelle, le problème de la numération des spores de *Clostridium* est loin d'être résolu de façon satisfaisante.

Chaque fois que l'on aura à compter des spores de *Clostridium* se développant rapidement en milieu gélosé, sans produire trop de gaz, on pourra donner la préférence à la numération sur milieu solide. Suivant le matériel dont on disposera on utilisera la technique qui paraîtra la plus simple à mettre en œuvre.

Pour des spores de *Clostridium* à croissance lente ou produisant de grandes quantités de gaz, on choisira la numération en milieu liquide, malgré son imprécision et malgré le nombre de tubes à utiliser pour les dilutions et les cultures. C'est d'ailleurs cette méthode des dilutions qui est d'usage le plus général et dont la mise au point est la plus rapide. Ainsi la plupart des auteurs, lorsqu'ils proposent une technique sur milieu solide, prennent soin de la comparer avec une numération sur milieu liquide.

Chaque chercheur, chaque laboratoire marquera donc une préférence pour l'une ou l'autre des techniques existantes, préférence qui découlera par exemple de la possibilité de disposer ou non d'un matériel donné, ou de la pratique de la recherche de tel ou tel type de *Clostridium*. Celui qui sera nouveau venu dans l'étude de ces bactéries sera tenté de se forger une technique personnelle, qui augmentera la liste de celles existant déjà, à moins qu'il n'ait

la rare bonne fortune de découvrir une méthode universelle de numération des spores de *Clostridium*!

Reçu pour publication en mars 1968

Nous exprimons notre reconnaissance à MM. Mocquot, Hermier et Bergère, pour leurs suggestions et leurs critiques au cours de la rédaction du manuscrit.

Summary

The enumeration of *Clostridium* spores, particularly in milk and dairy products. — I. Methods of enumeration.

CONTENTS

1. Introduction.
2. Enumeration of viable spores.
 - 2.1. Preparation of samples.
 - 2.2. Obtaining anaerobic cultures.
 - 2.2.1. Boiling and dispensing the medium.
 - 2.2.2. Addition of reducing agents in the medium.
 - 2.2.3. Simultaneous culture of strict aerobic microorganisms.
 - 2.2.4. Removal of atmospheric oxygen.
 - 2.2.5. Exclusion of oxygen by chemical or physical means.
 - 2.2.6. Anaerobiosis indicators.
 - 2.3. Comparison between the use of solid and liquid media.
 - 2.3.1. Solid media.
 - 2.3.1.1. Petri dishes.
 - 2.3.1.2. Tubes.
 - 2.3.1.3. Roll tubes, anaerobic pouches, pipette count and membrane filter methods.
 - 2.3.2. Liquid media.
3. Difficulty of the choice for a convenient method. Conclusion.
4. References.

TRAVAUX CITÉS

- 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, 1966 Recommended methods for the microbiological examination of foods. 2nd ed, by Sharf J. M. Amer. pub. Health Ass., New York.
- AUBERT S. (D^r), 1966. Ricerche sui clostridi : la possibilità di coltivare i clostridi in ambiente aerobico. *Boll. Ist. sieroterap.*, Milan, **45**, 160-164.
- AZUMA R., OGIMATO K. et SUTO T., 1962. Méthode de culture anaérobie avec la laine de fer (en japonais). *Jap. J. Bacteriol.*, **17**, 802-806. In C.N.R.S., 25, 14, 574.
- BARNES E. M. et INGRAM M., 1956. The effect of redox potential on the growth of *Clostridium welchii* strains isolated from horse muscle. *J. Appl. Bact.*, **19**, 117-128.
- BATTY I. et WALKER P. D., 1963. Differentiation of *Clostridium septicum* and *Clostridium chauvoei* by the use of fluorescent labelled antibodies. *J. Path. Bact.*, **85**, 517-521.

- BEERENS H., 1954. Amélioration des techniques d'études et d'identification des bactéries anaérobies. *Annales Inst. Pasteur*, Lille, **6**, 36-48.
- BEERENS H. et CASTEL M. M., 1959. Procédé simplifié de culture en surface des bactéries anaérobies. Comparaison avec la technique utilisant la culture en profondeur. *Annales Inst. Pasteur*, Lille, **10**, 183-192.
- 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**, 183-194.
- BINDER W., 1960. Zur Kenntniss von *Clostridium butyricum* unter besonderer Berücksichtigung des Buttersäuregärung in Silage und Käse. *Bodenkultur*, **11**, 1-37.
- BLADEL B. O. et GREENBERG R. A., 1965. Pouch method for the isolation and enumeration of *Clostridia*. *Appl. Microbiol.*, **13**, 281-285.
- BREED R. S., MURRAY E. G. D. et SMITH N. R., 1957. Bergey's manual of determinative bacteriology. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, 7^e éd.
- BREWER J. H., 1940. Clear liquid medium for the « aerobic » cultivation of anaerobes. *J. Am. Med. Assoc.*, **225**, 598-600 in Reed and Orr, 1943.
- BREWER J. H., 1942. A new petri dish cover and technique for use in the cultivation of anaerobes and microaerophiles. *Science*, **59**, 587.
- BREWER J. H. et ALLGEIER D. L., 1966. Safe self-contained carbon dioxide-hydrogen anaerobic system. *Appl. Microbiol.*, **14**, 985-988.
- BREWER J. H., ALLGEIER D. L. et McLAUGHLIN C. B., 1966. Improved anaerobic indicator. *Appl. Microbiol.*, **14**, 135-136.
- BUCHNER H., 1888. Eine neue Methode zur Kultur anaerobor Mikroorganismen. *Zentbl. Bakt. Parasitkde. I. Abt.*, **4**, 149-151.
- CASSELL A., 1965. Rapid graphical method for estimating the precision of direct microscopic counting data. *Appl. Microbiol.*, **13**, 293-296.
- CERF O., BERGERE J.-L. et HERMIER J., 1967. Thermorésistance des spores des *Clostridium* du groupe butyrique. *J. Dairy Res.*, **34**, 221-229.
- COHEN S. N., 1967. Automatic control for evacuating anaerobic jars. *Appl. Microbiol.*, **15**, 678-680.
- COLLINS C. H., 1964. Microbiological methods. Butterworth, Londres.
- C.N.E.R.N.A., 1961. Techniques de détection et de dénombrement des microorganismes du lait. *Annales Nutr. Alim.*, **15**, T. 7.
- DEIBEL R. H. et EVANS J. B., 1960. Modified benzidine test for the detection of cytochrome containing respiratory systems in microorganisms. *J. Bact.*, **79**, 356-360.
- DEMETER K. J., 1967. Bakteriologische Untersuchungsmethoden der Milchwirtschaft. 2^e éd. Eugen Ulmer, Stuttgart.
- 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.
- EL GHAZZAWI E., 1967. Neuisolierung von *Clostridium aceticum* Wieringa und stoffwechselphysiologische Untersuchungen. *Arch. Mikrobiol.*, **57**, 1-19.
- ELLER C., ROGERS L. et WYNNE E. S., 1967. Agar concentration in counting *Clostridium* colonies. *Appl. Microbiol.*, **15**, 55-57.
- ELLIOTT R. P., 1966. Bacteriological analytical manual. U. S. dept. Health, Educ. and Welfare, Washington.
- FABIAN J., 1965. Simple method of anaerobic cultivation with removal of oxygen by a buffered glucose oxidase-catalase system. *J. Bact.*, **89**, 921.
- FARMLOE F. J., CORNFORD S. J., COPPOCK J. B. M. et INGRAM M., 1954. The survival of *Bacillus subtilis* spores in the backing of bread. *J. Sci. Food Agric.*, **5**, 292-304.
- FAVERO M. S., 1967. Dual meaning of activation. *Spore Newsletter.*, **2**, 163-164.

- FORTNER J., 1957. Ueber das *Bacterium prodigiosum*. *Zentbl. Bakt. Parasitkde.*, 1. Abt., **169**, 160.
- FRAZIER W. C., BURKEY L. A., BOYER A. J., SANDERS G. P. et MATHESON K. J., 1935. The bacteriology of swiss cheese. II. Bacteriology of the cheese in the press. *J. Dairy Sci.*, **18**, 373-387.
- FREDETTE V., 1964. The role of the anaerobic bacteria, with particular reference to the virulence of *Clostridium perfringens*. *Rev. Canad. Biol.*, **23**, 85-93.
- FUHRMANN F., 1943. Die anaerobe Einzel-Proberöhrchenkultur. *Zentbl. Bakt. Parasitkde.*, 2. Abt., **105**, 406-414.
- GIBBS B. M. et FREAME B., 1965. Methods for the recovery of *Clostridia* from foods. *J. appl. Bacteriol.*, **28**, 95-111.
- GIBBS B. M. et HIRSCH A., 1956. Spore formation by *Clostridium* species in an artificial medium. *J. appl. Bacteriol.*, **19**, 129-141.
- GOUGH B. J. et ALFORD J. A., 1965. Effect of curing agents on the growth and survival of food poisoning strains of *Clostridium perfringens*. *J. Fd. Sci.*, **30**, 1015-1028.
- GRAVENS D. L., COLE W. R. et BERNARD H. R., 1967. Apparatus for the continuous maintenance of an anaerobic environment while incubating and identifying large number of cultures. *Bact. Proc.*, **67th**, 77, M101.
- GREENBERG R. A., BLADEL B. O. et ZINGELMANN W. J., 1966. Use of the anaerobic pouch in isolating *Clostridium botulinum* spores from fresh meat. *Appl. Microbiol.*, **14**, 223-228.
- HARTWICK H. et TZIMAS P., 1965. Die Anaerobenkultur in Petrischalen aus Kunststoff. *Zentbl. Bakt. Parasitkde.*, 1. Abt., **197**, 550-558.
- HAUSCHILD A. H. W., ERDMAN I. E., HILSHEIMER R., et THATCHER F. S., 1967. Variations in recovery of *Clostridium perfringens* on commercial sulfite-polymyxin-sulfadiazin (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.
- HELLER C. L., 1954. A simple method for producing anaerobiosis. *J. appl. Bacteriol.*, **17**, 202.
- 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.
- INGRAM M. et BARNES E. M., 1956. Tube for anaerobe counts. *Lab. Pract.*, **5**, 147.
- INGRAM M. et ROBERTS T. A., 1967. Botulism 1966. Chapman and Hall Ltd. London.
- KAYSER D., 1962. Ueber die Messung des Sauerstoffdruckes, bei dem Sporen von *Clostridium butyricum* auskeimen. *Z. Naturf.*, **17b**, 658-660.
- KHAIRAT O., 1963. A simple spacer for Petri dishes. *J. appl. Bact.*, **26**, 232-233.
- KHAIRAT O., 1964. Routine incubation in a 80 plates CO² container. *Canad. J. Microbiol.*, **10**, 499-501.
- KHAIRAT O., 1964a. Modernizing Brewer and other anaerobic jars. *J. Bact.*, **87**, 963-964.
- KIM C. H., 1965. Substrate factors for growth and sporulation of *Clostridium perfringens* in selected foods and in simple systems. Purdue University Ph. D. Th., University Microfilm Inc., Ann Arbor (Mich.).
- KLINGER I. J., et GUGGENHEIM K., 1935. The influence of vitamine C on the growth of anaerobes in the presence of air. *J. Bact.*, **35**, 141-156. In Reed and Orr, 1943.
- KNETEMAN A., 1957. A method for the cultivation of anaerobic spore forming bacteria. *J. appl. Bacteriol.*, **20**, 101-107.

- LEWIS K. H. et ANGELOTTI R., 1964. Examination of foods for enteropathogenic and indicator bacteria. U. S. Dept. Health, Educ. and Welfare, Washington.
- LE ROY H. L. et STÜSSI D. B., 1962. Statistical observations on the accuracy of the bacterial estimation, based on a practical example (en allemand). *Schweiz. landw. Forsch.*, **1**, 183-211, in *Dairy Sci. Abstr.*, **25**, 1454.
- LICKFELD K. G., 1967. Begasungsanlage für die Kultur anaerober Mikroorganismen nach dem Brewer-Verfahren. *Arztl. Lab.*, **13**, 147-151.
- LIPSHYC' V. V. et NAGORNA S. S., 1964. Sur la possibilité d'appliquer la méthode de microscopie par luminescence pour la différenciation des cellules vivantes et mortes des bactéries anaérobies (en ukrainien). *Mikrobiol. Zh., Ukrain. R.S.R.*, **26**, 73-76.
- MCBEE R. H., 1967. Rolled tube method for clinical laboratory isolation of anaerobic bacteria. *Bact. Proc.*, **67th**, 77, M102.
- MCINTOSH J. et FILDES P., 1916. A new apparatus for the isolation and cultivation of anaerobic microorganism. *Lancet*, **1**, 768-770.
- MCMILLAN P. C. et RIDGE W. M., 1966. Sampling from a modified Torbal anaerobic jar. *Canad. J. Microbiol.*, **12**, 1072.
- MARSHALL R. S., STEENBERGER J. F. et McLUNG L. S., 1965. Rapid technique for the enumeration of *Clostridium perfringens*. *Appl. Microbiol.*, **13**, 559-563.
- MARTH E. H., SHERMAN J. E., HASENZAHN L. et HUSSONG R. V., 1966. Extended storage of microbial cultures and culturing anaerobic bacteria with plastic pouches. *J. Dairy Sci.*, **49**, 1559-1562.
- MILLER N. J., GARRETT O. W. et PRICKETT P. S., 1939. Anaerobic technique—a modified deep agar shake. *Food Res.*, **4**, 447. In Gibbs and Freame (1965).
- MOORE M. L., ENGWALL C. et MOSKAL P. A., 1964. An improved method for the Brewer anaerobic jar. *Am. J. Clin. Pathol.*, **41**, 113-114.
- MORTON H. E., 1943. An improved method for growing microorganisms under anaerobic conditions. *J. Bact.*, **46**, 373-376.
- MOSS C. W., SHEKTER M. A. et CHERRY W. B., 1967. Distribution of neuraminidase among food-poisoning strains of *Clostridium perfringens*. *Appl. Microbiol.*, **15**, 718-722.
- MOSSEL D. A. A., DE BRUIN A. S., VAN DIEPEN H. M. J., VENDRIG C. M. A. et ZOUTERWELLE G., 1956. The enumeration of anaerobic bacteria and of *Clostridium* species in particular, in foods. *J. appl. Bact.*, **19**, 142-145.
- MOSSEL D. A. A., VON GOLSTEIN BROUWERS G. W. M. et DE BRUIN A. S., 1959. A simplified method for the isolation and study of obligate anaerobes. *J. Path. Bact.*, **78**, 290.
- NARAYAN K. G., 1967. Culture isolation and identification of *Clostridia*. *Zentbl. Bakt. Parasitkde. 1. Abt.*, **202**, 212-220.
- 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.
- NAYLOR P. G. D., 1963. A novel polystyrene dish for the production of anaerobiosis. *J. appl. Bact.*, **26**, 219-223.
- NORDHEIM W. et MÜLLER G., 1967. Verfahren zur Züchtung anaerober Mikroorganismen. *Zentbl. Bakt. Parasitkde. 1. Abt.*, **204**, 427-430.
- OAKLEY C. L., 1956. The classification and biochemical activities of the genus *Clostridium*. *J. appl. Bact.*, **19**, 112-116.
- OAKLEY C. L., 1963. Classification of the genus *Clostridium*. *Off. int. Epizooties*, **59**, 1411-1417.
- PANKHURST E. S., 1967. A simple culture tube for anaerobic bacteria. *Lab. Pract.*, **16**, 58-59.
- PARKER R. B., 1965. Pipette count method for obligate anaerobes. *Appl. Microbiol.*, **13**, 1042.
- PEEL J. L. et WATKINSON R. J., 1965. Inactivation by substrate plus oxygen of the pyruvic dehydrogenase of a strictly anaerobic bacterium. *Biochem. J.*, **94**, 210.

- PETSI L., 1965. Two methods for culturing anaerobic bacteria. *Acta vet. hung.*, **15**, 447-449.
- PHEIL C. G. et ORDAL Z. J., 1967. Sporulation of the « Thermophilic anaerobes ». *Appl. Microbiol.*, **15**, 893-898.
- 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. Vét.*, **110**, 422-447.
- RAIBAUD P., DICKINSON A. B., SACQUET E., CHARLIER H. et MOCQUOT G., 1966. La microflore du tube digestif du rat. I. Techniques d'étude et milieux de culture proposés. *Annales Inst. Pasteur, Paris*, **110**, 568-590.
- REED G. B. et ORR J. H., 1943. Cultivation of anaerobes and oxidation-reduction potential. *J. Bact.*, **45**, 309-320.
- RIEMSDIJK M. (VAN), 1939. Eine einfache Methode zur Beseitigung des Sauerstoffes an der Plattenoberfläche zur anaeroben Zucht. Die Ringmethode. *Zentbl. Bakt. Parasitkde. 1. Abt.*, **143**, 265-270.
- RITTER W. et DORNER W., 1932. Behebung eines wichtigen Nachteils des anaeroben Pyrogallolverschlusses. *Zentbl. Bakt. Parasitkde. 1. Abt.*, **125**, 379-383.
- ROBERTS E. A. et COOTE G. G., 1965. The estimation of concentration of viruses and bacteria from dilutions counts. *Biometrics*, **21**, 600-615.
- ROBOHM R. A. et GRAIKOSKI J. T., 1966. Evaluation of media and anaerobic methods for maximum recovery of *Clostridium botulinum*, type E spores. *Bact. Proc.*, **10**.
- ROJAHN J., 1967. Glasgerät zur Bereitung von Nährmedium für Anaerobier. *Zentbl. Bakt. Parasitkde. 1. Abt.*, **121**, 520-522.
- 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.
- SALLE A. J., 1948. Fundamental principles of bacteriology. 3rd ed. McGraw Hill Book Co., New York.
- SHANK J. L., 1963. Applications of the plastic film technique in the isolation and study of anaerobic bacteria. *J. Bact.*, **86**, 95-100.
- SCHARER J. M., 1965. Thermal death behavior of bacterial spores. University of Pennsylvania Ph. D. Th. University Microfilm Inc. Ann Arbor (Mich.).
- SHARPE M. E. et GOUDKOV A. V., 1966. Serological characteristics of some *Clostridia* isolated from milk and cheese. *Int. Dairy Cong.*, **D2**, 625-628.
- SCHNEIST R. A. et SMITH K. J., 1963. Une méthode en plaque pour cultures anaérobies routinières (en anglais). *Am. J. clin. Path.*, **40**, 95-98. In C.N.R.S., **25**, 14, 2353.
- SKERMAN V. B. D., 1967. A guide to the identification of the genera of bacteria. 2nd ed. The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- SPRAY R. S., 1936. Semi-solid media for cultivation and identification of the sporulating anaerobes. *J. Bact.*, **32**, 135.
- STANIER R. Y., DOUDOROFF M. et ADELBERG Ed. A., 1966. Microbiologie Générale. Masson et Cie, Paris.
- STRUPPE H. F., 1966. Zur Verwendung von Plastik-Petrischalen bei der Anaerobierzüchtung. *Zentbl. Bakt. Parasitkde., 1. Abt.*, **200**, 391-394.
- STUMBO C. R., 1965. Thermobacteriology in food processing. Academic Press, New York.
- STÜSSI D. B., 1961. Beitrag zur Physiologie von *Clostridium butyricum* Præzm. unter besonderer Berücksichtigung der Sporulation und der Germination. *Landw. Jb. Schweiz.*, 577-631.
- TAYLOR J., 1962. The estimation of number of bacteria by tenfolds dilutions series. *J. appl. Bact.*, **25**, 54-61.
- TOEBIEN D. F. et SIEBERT M. L., 1967. Modification of the roll-tubes apparatus for the enumeration and cultivation of anaerobic bacteria. *Lab. Prac.*, **16**, 320-322.

- VAN DER HEYDE H. et HENDERICKX H., 1964. Eine einfache Methode mit Ringplatten zur quantitativen Bestimmung von Anaerobien. *Zentbl. Bakt. Parasitkde. 1. Abt.*, **195**, 80-87.
- VEDAMUTHU E. R. et REINBOLD G. W., 1967. Die Anwendung des Candle-Oats Jar Incubation. Technik für Zählung, Charakterisierung und Klassifizierung von Propionsäurebakterien. *Milchwissenschaft*, **22**, 428-431.
- VEILLON R., 1922. Sur quelques microbes thermophiles strictement anaérobies. *Annales Inst. Pasteur*, Paris, **36**, 422-438.
- WAART J. (DE) et SMITH F., 1967. The enumeration of obligately anaerobic bacteria using pouches made from plastics with a low oxygen permeability. *Lab. Prac.*, **16**, 1098-1099.
- WALKER P. D., 1963. The spores antigens of *Clostridium sporogenes*, *Clostridium bifermentans* et *Clostridium sordellii*. *J. Path. Bact.*, **85**, 41-44.
- WALTER W. G., 1967. Standard methods for the examination of dairy products. 12th ed. Amer. Public Health Ass., New York.
- WEINBERG M., NATIVELLE R. et PREVOT A. R., 1937. Les microbes anaérobies. Masson et Cie, Paris.
- WILLINGHAM C. A. et OPPENHEIMER C. H., 1964. Modified device for an anaerobic dispensing of reduced media. *J. Bact.*, **88**, 541-542.
-