

## Évolution, biodiversité, taxonomie

### Développement d'un milieu sélectif pour le dénombrement des bifidobactéries dans les laits fermentés

Christine BONAPARTE<sup>a\*</sup>, Günter KLEIN<sup>b</sup>, Wolfgang KNEIFEL<sup>a</sup>,  
Gerhard REUTER<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Institut de Recherche Laitière et de Bactériologie, Université Agronomique,  
Gregor Mendel Strasse 33, 1180 Vienne, Autriche

<sup>b</sup> Institut Fédéral pour la Protection des Consommateurs et Médecine Vétérinaire, Berlin, Allemagne

<sup>c</sup> Institut de l'Hygiène et Technologie de la Viande, Université Libre de Berlin, Allemagne

**Abstract — Development of a selective culture medium for the enumeration of bifidobacteria in fermented milks.** The use of selective culture media is necessary to demonstrate the presence of bifidobacteria in European fermented milks, since *Lactobacillus (L.) acidophilus*, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *Streptococcus (S.) thermophilus* usually dominate the flora in these products. But a fully selective medium suppressing these microorganisms does not exist as yet. Therefore, the selectivity and productivity of three media were tested qualitatively and quantitatively: DIC (pH 6.8) and BEE (pH 5.0) were based on TPY and Columbia agar with dicloxacillin and propionic acid respectively, as inhibitory agents. A new combination, DP (pH 6.8), was created on the base of Columbia agar with both propionic acid and dicloxacillin as additives. The elective medium BIO, which is based on RCM agar supplemented with lactose and human erythrocyte concentrate was used as control medium. The samples tested were either single strains of *Bifidobacterium* spp., *L. acidophilus*, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *S. thermophilus* or mixte cultures in form of starter cultures or fermented milks. DIC allowed a good growth of bifidobacteria as well as *L. acidophilus*. On BEE bifidobacteria as well as *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* grew irregularly. DP allowed a quantitatively sufficient growth of bifidobacteria and prevented the growth of accompanying *L. acidophilus*, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *S. thermophilus* strains. Therefore, DP is advantageous over DIC and BEE and can be recommended for the selective isolation of bifidobacteria from starter cultures and from different fermented milks products in Europe.

**bifidobacteria / selective medium / fermented milk / lactic acid bacteria**

**Résumé —** L'importance sur le marché européen des laits fermentés aux vertus présumées probiotiques augmente régulièrement. La flore bactérienne dans le produit est souvent dominée par *Streptococcus (S.) thermophilus*, *Lactobacillus (L.) delbrueckii* ssp. *bulgaricus* et *L. acidophilus*, alors

\* Correspondance et tirés-à-part  
Tél. : (43) 1 476546121 ; fax : (43) 1 4789114 ; e-mail : cbonapar@edv1.boku.ac.at

que les bifidobactéries ne sont présentes qu'en faible concentration. Leur dénombrement nécessite donc l'utilisation d'un milieu sélectif. Or il n'existe à ce jour aucune méthode standard de dénombrement des bifidobactéries. Trois milieux de culture ont donc été testés pour leur sélectivité et productivité envers les bifidobactéries : le milieu DIC (pH 6,8) est basé sur la gélose TPY contenant de la dicloxacilline comme agent inhibiteur et le milieu BEE (pH 5,0) est une gélose Columbia supplémentée en acide propionique. Le nouveau milieu DP (pH 6,8), a comme base la gélose Columbia additionnée d'acide propionique et de dicloxacilline comme agents inhibiteurs. Les bifidobactéries se développent sur les 3 milieux. En revanche alors que DP inhibe la croissance de *L. acidophilus*, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* et *S. thermophilus*, DIC n'a pas d'effet inhibiteur sur *L. acidophilus* et *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* se multiplie parfois sur BEE. Le milieu DP peut être recommandé pour l'isolement sélectif des bifidobactéries provenant de laits fermentés.

### **bifidobactérie / milieu sélectif / lait fermenté / bactérie lactique**

## **1. INTRODUCTION**

Ces dix dernières années ont vu l'explosion sur le marché européen des laits fermentés aux vertus présumées probiotiques [6, 10, 29]. Ces produits contiennent des bactéries appartenant à différentes espèces de *Bifidobacterium*, des bactéries appartenant aux espèces *L. acidophilus*, plus récemment *L. casei* et les germes classiques du yaourt *S. thermophilus* et parfois *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (couramment dénommé *L. bulgaricus*) [22, 23].

Les bifidobactéries, plus sensibles à l'oxygène et au pH acide [13, 14] sont souvent en concentration moins importante que les autres micro-organismes surtout lorsque les produits sont proches de la date limite de péremption [24]. Or la concentration conseillée afin d'obtenir un effet bénéfique pour la santé est de  $10^6$  bactéries probiotiques par gramme de produit à la date de péremption [25]. De plus chaque germe, autre que les bactéries classiques du yaourt, explicitement déclaré sur l'emballage du lait fermenté doit être présent à la date de péremption à une concentration minimale de  $10^6$  ufc.g<sup>-1</sup> [8].

Il est donc très important pour les producteurs de yaourts, mais aussi pour les laboratoires de contrôle de pouvoir dénombrer les bifidobactéries provenant des laits fermentés. Or les milieux décrits dans la

littérature sont, soit insuffisamment sélectifs [9, 12], soit ils inhibent partiellement la croissance des bifidobactéries [27], soit ils ne sont pas adaptés à l'emploi dans un laboratoire de routine car leur préparation est fastidieuse [18, 20, 27]. C'est aussi la raison pour laquelle, malgré plusieurs tentatives de la Fédération Internationale Laitière, il n'existe à ce jour aucune méthode standard de dénombrement des bifidobactéries, simplement un conseil d'utilisation d'un milieu contenant du lithium chlorure et du sodium de propionate comme agents inhibiteurs [7]. La combinaison de ces deux agents, déjà utilisée par Lapiere et al. [11], est utilisée dans plusieurs milieux développés récemment [17, 19, 28].

Ces dernières années sont apparues des techniques de biologie moléculaire permettant la détection des bifidobactéries surtout parmi la flore intestinale [4] mais leur emploi trop complexe n'est pas encore adapté aux besoins des laboratoires de contrôle de qualité dans l'industrie laitière.

Le but de ces travaux était le développement d'un milieu sélectif permettant à la fois une croissance optimale des bifidobactéries et l'inhibition des bactéries appartenant aux espèces *L. acidophilus*, *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*. De plus sa préparation devait être adaptée à l'emploi en analyse microbiologique de routine.

## 2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 2.1. Les micro-organismes

Les micro-organismes étudiés étaient en culture pure ou en culture mixte.

Les 8 cultures pures appartenaient aux espèces *B. animalis*, *B. longum*, *B. infantis*, *B. breve*, *B. bifidum*, *L. acidophilus*, *L. bulgaricus* et *S. thermophilus*. Chaque espèce, choisie pour sa présence dans la majorité des laits fermentés était représentée par la souche type. Toutes les souches provenaient de la collection de l'institut de l'hygiène et technologie de la viande, université libre de Berlin (Allemagne). Les souches *B. longum*<sup>T</sup>, *B. infantis*<sup>T</sup>, *B. breve*<sup>T</sup> ont été isolées par Reuter dans les années 60 au sein du même institut, les autres souches provenaient à l'origine d'autres collections (Tab. I).

Les cultures mixtes rassemblaient 30 ferments lactiques composés de souches appartenant à *Bifidobacterium* ssp., *L. acidophilus*, *L. bulgaricus* et *S. thermophilus* fournis par un producteur de ferments (SKW Biosystems GmbH, unité Culture et Enzyme, Bönen, Allemagne) et 29 laits fermentés commercialisés sur le marché allemand.

**Tableau I.** Souches types testées.

**Table I.** Type strains tested.

Souches	Référence
<i>B. animalis</i> <sup>T</sup>	ATCC 27527
<i>B. bifidum</i> <sup>T</sup>	DSM 20456
<i>B. infantis</i> <sup>T</sup>	Reuter
<i>B. breve</i> <sup>T</sup>	Reuter
<i>B. longum</i> <sup>T</sup>	Reuter
<i>L. acidophilus</i> <sup>T</sup>	ATCC 4356
<i>L. bulgaricus</i> <sup>T</sup>	DSM 20081
<i>S. thermophilus</i> <sup>T</sup>	DSM 20617

### 2.2. Les milieux

Trois milieux sélectifs DIC [26], BEE [3] et DP (le milieu développé au cours de cette étude) furent comparés au milieu électif BIO [22] utilisé comme milieu de contrôle. Leur composition respective est détaillée dans le tableau II.

### 2.3. Étude qualitative

Un milieu sélectif étant caractérisé par sa productivité et sa sélectivité [16], ces deux critères furent évalués qualitativement

**Tableau II.** Composition des milieux de culture étudiés.

**Table II.** Composition of the culture media investigated.

	BIO	DIC	BEE	DP
pH	6,8	6,8	5,0	6,8
Ingrédients (g ou mL ou mg)				
Milieu gélosé	RCM TPY Columbia	50,0	41,9	42,0 42,0
Glucose			5,0	5,0
Lactose	10,0			
Cysteine hydrochloride			0,5	0,5
Agar			5,0	5,0
Aqua dest. (mL)	1 000,0	1 000,0	1 000,0	1 000,0
Érythrocytes humains (mL)	50,0			
Acide propionique (mL)			5,0	5
Dicloxacilline (mg)		1,0		2,0

grâce à un isolement des 8 souches pures sur boîte de Petri selon la méthode écométrique [15]. Chaque souche fut ensemencée sur 5 segments de la boîte puis incubée 48 h à 37 °C en chambre anaérobie (10 % CO<sub>2</sub>, 10 % H<sub>2</sub> et 80 % N<sub>2</sub>).

Si le germe se multipliait sur les 5 segments, sa croissance était considérée comme optimale, sur 2 à 3 segments comme réduite et comme absente si aucune colonie ne se développait. La procédure, effectuée sur chaque milieu, fut répétée 3 fois.

## 2.4. Étude quantitative

La précision de la méthode écométrique n'étant pas suffisante, la sélectivité et la productivité des milieux furent déterminées par une étude quantitative. Les bactéries contenues dans les 30 ferments lactiques et les 29 laits fermentés furent dénombrées par étalement en surface sur BIO, DIC, BEE et DP suivi d'une incubation de 48 h à 37 °C en anaérobiose.

L'identification des colonies apparues sur les milieux fut effectuée par observation macroscopique mais aussi par l'observation microscopique des différentes morphologies cellulaires.

Les dénombrements des Unités Formant Colonies (UFC) furent comparés grâce à un programme statistique BIAS [1] visualisant les résultats sous forme de box-plots (Fig. 1).

## 3. RÉSULTATS

### 3.1. Étude qualitative

Les résultats sont rapportés dans le tableau III. Sur le milieu BIO se multiplient tous les germes, avec des morphologies de colonies différentes. DIC favorise la croissance des bifidobactéries mais aussi en proportion moins importante celle de *L. acidophilus*. Sur BEE les bifidobactéries se multiplient différemment selon les espèces : *B. breve* ne se développe que faiblement et

*B. bifidum* irrégulièrement ; sur 3 isolements réalisés, la souche *B. bifidum* montra 1 fois une croissance réduite et 2 fois aucune croissance. Ce phénomène fut aussi remarqué avec *L. bulgaricus*. Quant au milieu DP, il inhibe la croissance de *L. acidophilus*, *L. bulgaricus* et *S. thermophilus* et permet

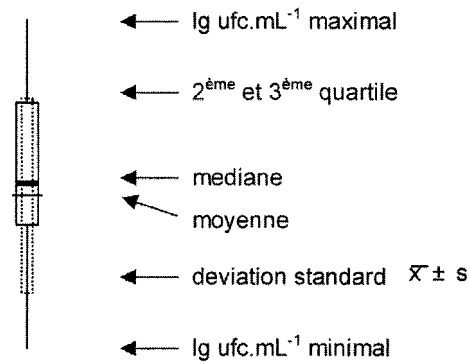


Figure 1. Description de BIAS box-plots.

Figure 1. BIAS box-plot description.

Tableau III. Croissance de *B. animalis*, *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. breve*, *B. longum*, *L. acidophilus*, *L. bulgaricus* and *S. thermophilus* sur les milieux étudiés.

Table III. Growth behaviour of *B. animalis*, *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. breve*, *B. longum*, *L. acidophilus*, *L. bulgaricus* and *S. thermophilus* on the media investigated.

Souches	BIO	DIC	BEE	DP
<i>B. animalis</i> <sup>T</sup>	++	++	++	++
<i>B. bifidum</i> <sup>T</sup>	++	+	+/-	+
<i>B. infantis</i> <sup>T</sup>	++	++	++	++
<i>B. breve</i> <sup>T</sup>	++	++	+	++
<i>B. longum</i> <sup>T</sup>	++	++	++	++
<i>L. acidophilus</i> <sup>T</sup>	++	+	-	-
<i>L. bulgaricus</i> <sup>T</sup>	++	-	+/-	-
<i>S. thermophilus</i> <sup>T</sup>	++	-	-	-

Croissance : ++ : optimale ; + : réduite ; +/- : irrégulière ; - : absente.

Growth: ++: optimum; +: reduced; +/-: irregular; -: no growth.

une multiplication optimale des bifidobactéries, à l'exception de *B. bifidum* qui, comme sur DIC, ne se développe que faiblement. Les colonies apparaissent de couleur blanche ayant la forme d'une tête d'épingle.

### 3.2. Étude quantitative

Comme l'étude qualitative sur culture pure de bifidobactéries, l'étude quantitative réalisée sur cultures mixtes de ferments (Figs. 2 et 3) et laits fermentés (Fig. 4) laisse apparaître sur le milieu DIC une croissance des bifidobactéries comparable à celle obtenue sur BIO mais aussi la croissance de *L. acidophilus* (Fig. 2). En effet la concentration de *L. acidophilus* dans les ferments, avec une médiane de  $8,0 \text{ lg ufc}\cdot\text{mL}^{-1}$  obtenue sur DIC, est semblable à celle obtenue sur le milieu de contrôle BIO qui est de  $8,1 \text{ lg ufc}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

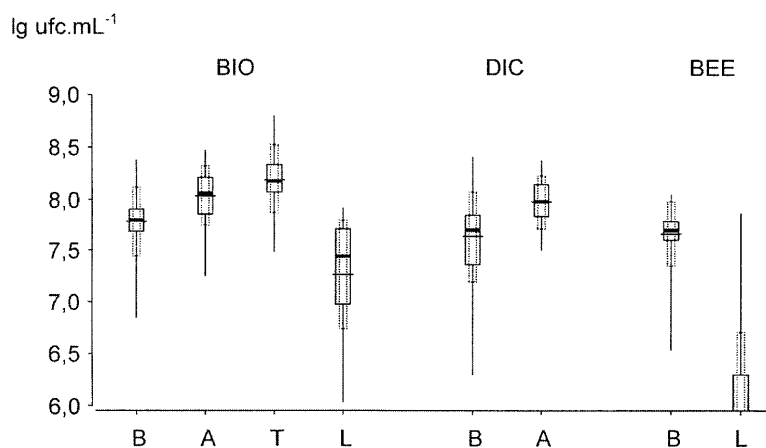
BEE permet la croissance des bifidobactéries mais aussi celle, irrégulière, de

*L. bulgaricus* (Fig. 2). La médiane est de  $5,5 \text{ lg ufc}\cdot\text{mL}^{-1}$ , avec une très grande variation de concentration allant de 1,7 à  $7,8 \text{ lg ufc}\cdot\text{mL}^{-1}$  alors que la médiane obtenue sur BIO est de  $7,5 \text{ lg ufc}\cdot\text{mL}^{-1}$  avec une concentration minimum de  $6,0 \text{ lg ufc}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

La figure 3 représente le dénombrement des ferments effectué sur BIO et DP. Ce dernier favorise uniquement la croissance des bifidobactéries. De plus la médiane obtenue sur DP ( $7,9 \text{ lg ufc}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) est semblable à celle de BIO ( $7,8 \text{ lg ufc}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).

Les box plots de la figure 4 visualisent la croissance sur BIO, DIC et BEE des micro-organismes présents dans 13 laits fermentés et lors d'une deuxième expérimentation, celle sur BIO et DP des germes de 16 autres produits. Les dénombrements furent effectués avec des produits âgés de 3 à 14 j. Aucun lait fermenté ne contient de *L. bulgaricus*. Comme observé lors de l'étude des ferments, *L. acidophilus* se multiplie sur DIC. La concentration en bifidobactéries est faible avec une médiane

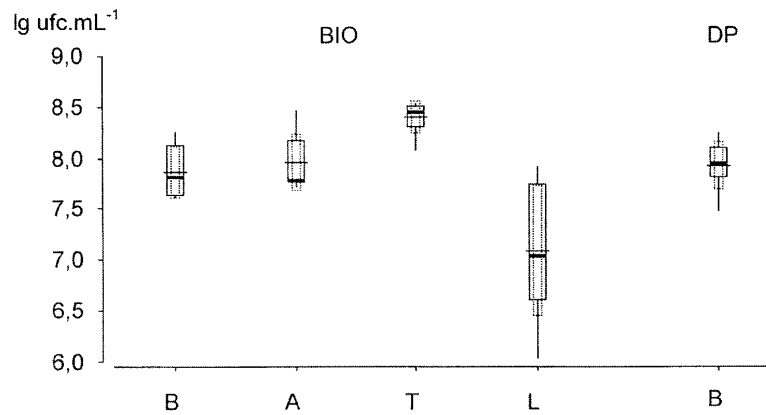
B: *Bifidobacterium*; A: *L. acidophilus*; T: *S. thermophilus*; L: *L. bulgaricus*



**Figure 2.** Dénombrement de la flore présente dans des ferments lactiques ( $n = 30$ ) sur les milieux BIO (milieu de contrôle), DIC et BEE.

**Figure 2.** Enumeration of the starter culture flora ( $n = 30$ ) on the media BIO (reference medium), DIC and BEE.

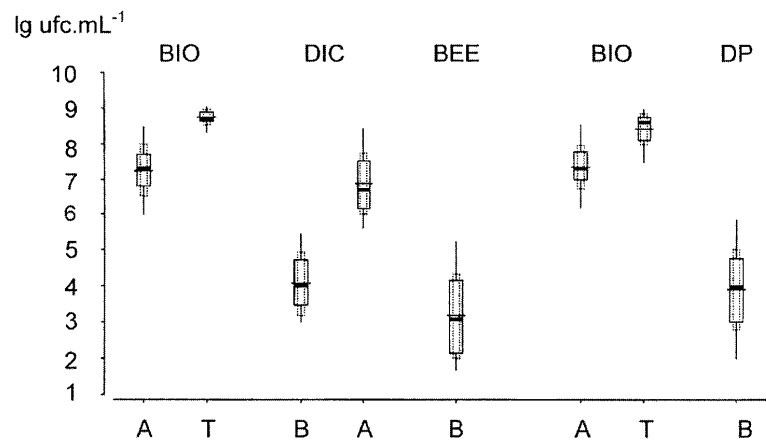
B: *Bifidobacterium*; A: *L. acidophilus*; T: *S. thermophilus*; L: *L. bulgaricus*



**Figure 3.** Dénombrement de la flore présente dans des ferments lactiques ( $n = 30$ ) sur les milieux BIO (milieu de contrôle) et DP.

**Figure 3.** Enumeration of the starter culture flora ( $n = 30$ ) on the media BIO (reference medium), and DP.

B: *Bifidobacterium*; A: *L. acidophilus*; T: *S. thermophilus*



**Figure 4.** Dénombrement de la flore présente dans des laits fermentés ( $n = 29$ ) sur les milieux BIO (milieu de contrôle), DIC, BEE et DP.

1<sup>o</sup> série :  $n = 13$  : dénombrement sur BIO, DIC et BEE.

2<sup>o</sup> série :  $n = 16$  : dénombrement sur BIO et DP.

**Figure 4.** Enumeration of the fermented milks on the media BIO (reference medium), DIC, BEE and DP.

First trial:  $n = 13$ : enumeration on BIO, DIC et BEE.

Second trial:  $n = 16$ : enumeration on BIO et DP.

de 4,0 lg ufc·mL<sup>-1</sup> sur DIC pour 13 produits et de 4,2 lg ufc·mL<sup>-1</sup> sur DP pour les 16 autres. De plus elle varie en fonction de l'âge des produits testés. La concentration en bifidobactéries est en dessous de la limite de détection (1,7 lg ufc·mL<sup>-1</sup>) dans les produits analysés 14 j après leur production et elle atteint 5,8 lg ufc·mL<sup>-1</sup> dans les yaourts testés 3 j après leur production. La flore autre étant présente en concentration beaucoup plus importante (environ 7 lg ufc·mL<sup>-1</sup> *L. acidophilus* et 9 lg ufc·mL<sup>-1</sup> *S. thermophilus*), les bifidobactéries, bien que présentes, ne sont plus dénombrables sur le milieu électif BIO.

## 4. DISCUSSION

### 4.1. Évaluation de la sélectivité

Une faible inhibition de *L. acidophilus* par le milieu DIC fut mise en évidence lors de l'étude qualitative et confirmée par l'étude quantitative. Ces résultats sont différents de ceux obtenus par Sozzi et al. [26]. Ces derniers évaluèrent la concentration minimale de dicloxacilline inhibitrice de 15 souches *L. acidophilus* dont la souche type. Les valeurs obtenues sont toutes égales ou inférieures à 1,5 mg·L<sup>-1</sup>. Or dans le milieu DIC cet antibiotique est en concentration de 2 mg·L<sup>-1</sup> et devrait inhiber la souche type *L. acidophilus* testée dans cette étude.

La capacité de croissance de *L. acidophilus* sur les milieux théoriquement sélectifs pour bifidobactéries n'est pas propre à DIC mais a été observée sur d'autres milieux [2, 5, 19].

De même la capacité de croissance de *L. bulgaricus* sur BEE a été observée par Hartemink et al. et Payne et al. [5, 19].

Le milieu DP est sélectif. Il inhibe la croissance des souches appartenant aux espèces *L. acidophilus*, *L. bulgaricus* et *S. thermophilus* incluses dans cette étude.

Avec l'explosion sur le marché des laits fermentés contenant des *L. casei*, la croissance de ces germes sur DP a été étudiée dans le cadre d'analyses de routine effectuées dans différents laboratoires de contrôles. La sélectivité alors observée est dépendante de la souche utilisée. La majorité d'entre elles ne peuvent pas se multiplier sur DP. Dans le cas d'une croissance de *L. casei*, dont les colonies sont généralement de couleur blanche plus laiteuse que les bifidobactéries, une confirmation par observation microscopique est nécessaire. *L. casei* apparaît sous forme de bâtonnets courts et réguliers alors que des bâtonnets en forme de massue ou ramifiés sont caractéristiques des bifidobactéries.

### 4.2. Évaluation de la productivité de DP

Selon Reuter [21] un milieu est productif si la concentration en micro-organismes recherchés obtenue sur le milieu sélectif est au maximum 1 lg ufc·mL<sup>-1</sup> inférieure à celle obtenue sur un milieu électif. Les médianes obtenues pour DP étant égales et parfois même légèrement supérieures à celle de BIO, la productivité de DP est donc très bonne.

DP et deux autres milieux de cultures utilisés en analyse de routine pour le dénombrement des bifidobactéries font actuellement l'objet d'une étude comparative de leur productivité. Chaque laboratoire analyse avec son propre milieu des produits laitiers issus du même lot de production. Les résultats préliminaires laissent apparaître que les 3 milieux possèdent une productivité semblable. En revanche seul le milieu DP inhibe totalement la flore accompagnante.

## 5. CONCLUSION

DP inhibe totalement la croissance de *L. acidophilus*, *L. bulgaricus* et *S. thermophilus* et la majorité des *L. casei* et possède

donc une bonne sélectivité. De plus il favorise une croissance optimale des bifidobactéries et possède ainsi une bonne productivité.

DP, ayant une composition relativement simple, peut donc être conseillé en analyse de routine pour le dénombrement des bifidobactéries dans la majorité des laits fermentés probiotiques présents sur le marché européen.

### REMERCIEMENTS

Cette étude a été effectuée en grande partie à l'institut de l'hygiène et technologie de la viande de l'université libre de Berlin, Allemagne, sous la direction du Prof. Dr. G. Reuter et a été soutenue financièrement par la Société SKW Biosystems GmbH, division Cultures et Enzymes, Bönen, Allemagne.

### RÉFÉRENCES

- [1] Ackermann H., BIAS: Biometrische Analyse von Stichproben, Epsilon, Hochheim-Darmstadt, Allemagne, 1994.
- [2] Arroyo L., Cotton L.N., Martin J.H., AMC Agar – A composite medium for selective enumeration of *Bifidobacterium longum*, *Cult. Dairy Prod. J.* 30 (1995) 12–15.
- [3] Beerens H., An elective and selective isolation medium for *Bifidobacterium* spp., *Lett. Appl. Microbiol.* 11 (1990) 155–157.
- [4] Charteris W.P., Kelly P.M., Morelli L., Collins J.K., Selective detection, enumeration and identification of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in mixed bacterial populations, *Int. J. Food Microbiol.* 35 (1997) 1–27.
- [5] Hartemink R., Kok B.J., Weenk G.H., Rombouts F.M., Raffinose-Bifidobacterium (RB) agar, a new selective medium for bifidobacteria, *J. Microbiol. Methods* 27 (1996) 33–43.
- [6] Hilliam M., The market for functional food, *Int. Dairy J.* 8 (1998) 349–353.
- [7] International Dairy Federation, Guideline for the enumeration of bifidobacteria in fermented dairy products, *Bull. Int. Dairy Fed.* 340 (1999) 19–23.
- [8] International Dairy Federation, proposed draft standard for fermented milks (A-11) step, 3 September 1999, pp. 15–18.
- [9] Ishibashi N., Shimamura S., Bifidobacteria: research and development in Japan, *Food Technol.* 47 (1993) 126–136.
- [10] Kneifel W., Bonaparte C., Trends bei gesundheitlich relevanten Lebensmitteln: 1. Probiotica, *Ernährung* 22 (1998) 357–363.
- [11] Lapiere L.P., Undeland P., Cox L.J., Lithium chloride – sodium propionate agar for the enumeration of bifidobacteria in fermented dairy products, *J. Dairy Sci.* 75 (1992) 1192–1196.
- [12] Lim K., Huh C., Baek Y.J., A selective enumeration medium for bifidobacteria in fermented dairy products, *J. Dairy Sci.* 78 (1995) 2108–2112.
- [13] Martin J.H., Chou K.M., Selection of bifidobacteria for use as dietary adjuncts in cultured dairy foods: I. Tolerance to pH of yoghurt, *Cult. Dairy Prod. J.* 27 (1992) 21–26.
- [14] Modler H.W., Mc Kellar R.C., Yaguchi M., Bifidobacteria and bifidogenic factors, *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* 23 (1990) 29–41.
- [15] Mossel D.A.A., van Rossem F., Koopmanns M., Hendriks M., Verouden M., Eelderink I., Quality control of solid culture media: a comparison of the classic and the so-called ecometric technique, *J. Appl. Bacteriol.* 49 (1980) 439–454.
- [16] Mossel D.A.A., Introduction and prospective, quality assurance and quality control of microbiological culture media, *Int. J. Food Microbiol.* 2 (1985) 1–7.
- [17] Nebra Y., Bianchi A.R., A new selective medium for *Bifidobacterium* spp., *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (1999) 5173–5176.
- [18] Pacher B., Kneifel W., Development of a culture medium for the detection and enumeration of bifidobacteria in fermented milk products, *Int. Dairy J.* 6 (1996) 43–64.
- [19] Payne J.F., Morris A.E.J., Beers P., Note: Evaluation of selective media for the enumeration of *Bifidobacterium* sp. in milk, *J. Appl. Microbiol.* 86 (1999) 353–358.
- [20] Rada V., Koc J., The use of mupirocin for selective enumeration of bifidobacteria in fermented milk products, *Milchwissenschaft* 55 (2000) 65–67.
- [21] Reuter G., Mikrobiologische Analyse von Lebensmitteln mit selektiven Medien, *Arch. Lebensmittelhyg.* 21 (1970) 30–35.
- [22] Reuter G., Bifidobacteria cultures as components of yoghurt-like products, *Bifidobact. Microfl.* 9 (1990) 107–118.
- [23] Reuter G., Present and future of probiotics in Germany and in Central Europe, *Biosci. Microfl.* 16 (1997) 43–51.
- [24] Roy D., Mainville I., Mondou F., Selective enumeration and survival of bifidobacteria in fresh cheese, *Int. Dairy J.* 7 (1997) 785–793.
- [25] Samona A., Robinson R.K., Enumeration of bifidobacteria in dairy products, *J. Soc. Dairy Technol.* 44 (1991) 64–66.



- [26] Sozzi T., Brigidi P., Mignot O., Matteuzzi D., Use of dicloxacillin for the isolation and counting of bifidobacteria from dairy products, *Lait* 4 (1990) 357–361.
- [27] Teraguchi S., Uehara M., Ogasa K., Mitsuoka T., Enumeration of bifidobacteria in dairy products, *Jap. J. Bacteriol.* 33 (1978) 753–761.
- [28] Vinderola C.G., Reinheimer J.A., Culture media for the enumeration of *Bifidobacterium bifidum* and *L. acidophilus* in the presence of yoghurt bacteria, *Int. Dairy J.* 9 (1999) 497–505.
- [29] Wood J.B., *The lactic acid bacteria in health and disease*, Elsevier Applied Science, London, England, 1992.