

50376

1968

13

UNIVERSITÉ DE LILLE
FACULTÉ DES SCIENCES

50.376

1968

13



0300084598

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE LILLE
POUR L'OBTENTION
DU DIPLOME DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LILLE
(MENTION SCIENCES)

par

André DES ROSIERS

PREMIÈRE THÈSE

ETUDE SUR LES CLOSTRIDIUM THERMOPHILES



Soutenu le 29 Mars 1968 devant la Commission d'examen

Président : M. E. VIVIER

Examineurs : MM. R. BOURIQUET, J. GUILLAUME, Ch. GERNEZ-RIEUX

Travail effectué à l'Institut Pasteur de Lille

U N I V E R S I T E D E L I L L E

FACULTE DES SCIENCES

DOYENS HONORAIRES :

MM. PRUVOST, LEFEBVRE, PARREAU

PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. ARNOULT, BEGHIN, CAU, CHAPELON, CHAUDRON, CORDONNIER,
DE HEUVELS, DEHORNE, DOLLE, FLEURY, GERMAIN,
KOURGANOFF, LAMOTTE, LELONG, Mme LELONG, MM. MAZET,
MICHEL, NORMANT, PARISELLE, PASCAL, PAUTHENIER,
ROIG, ROSEAU, ROUBINE, WIENANN, ZAMANSKY, KAMPE
DE FERRET.

DOYEN :

Monsieur DEFRETIN, Professeur de Biologie Marine

ASSESSEURS :

| | |
|------------|---|
| MM. HEUBEL | Professeur de Chimie Minérale |
| LEBRUN | Professeur de Radioélectricité et Electronique |

PROFESSEURS :

| | |
|-------------|------------------------------|
| MM. BACCHUS | Astronomie, Calcul Numérique |
| BECART | Physique |
| BERKER | Mécanique des Fluides |
| BLOCH | Psychophysiologie |

| | |
|----------------------|--|
| MM. BONNEMAN BEMIA | Chimie et Physico-Chimie Industrielle |
| BONTE | Géologie Appliquée |
| BOUGHON | Mathématiques |
| BOUISSET | Physiologie Animale |
| BOURIQUET | Botanique |
| CELET | Géologie |
| CORSIN | Paleobotanique |
| DECUYPER | Mathématiques |
| DEDEKER | Professeur Associé de Mathématiques |
| DEHORS | Physique Industrielle |
| DELATTRE | Géologie |
| DELEAU | Géologie |
| DELHAYE | Chimie Minérale |
| DESCOMBES | Calcul différentiel et intégral |
| DURCHON | Zoologie |
| FOURET | Physique |
| GABILLARD | Radioelectricite et Electronique |
| GLACET | Chimie |
| GONTIER | Mécanique des Fluides |
| HEIM DE BALZAC | Zoologie |
| HOCQUETTE | Botanique Générale et Appliquée |
| LEBEGUE | Botanique |
| Mme LEBEGUE | Physique |
| Mlle LENOBLE | Physique |
| MM. LIEBAERT | Radioelectricité |
| LINDER | Botanique |
| LUCQUIN | Chimie Minérale |
| MARION | Chimie |
| Mlle MARQUET | Mathématiques |
| MM. MARTINOT-LAGARDE | Mécanique des Fluides |
| MENESSIER | Géologie |
| MONTARIOL | Chimie Minérale Appliquée |
| MONTREUIL | Chimie Biologique |
| MORIAEZ | Physique |
| PARREAU | Mathématiques |
| PEREZ | Physique Expérimentale |
| PHAM MAU QUAN | Mécanique Rationnelle et Expérimentale |
| POUZET | Calcul Numérique |
| PROUVOST | Géologie |
| SAVARD | Chimie Générale |
| SCHALLER | Zoologie |
| SCHILTZ | Physique |
| Mme SCHWARTZ | Analyse Supérieure |
| MM. TILLIEU | Physique |
| TRIDOT | Chimie |
| VIVIER | Biologie Animale |
| WATERLOT | Géologie et Minéralogie |
| WERTHEIMER | Physique |

MAITRES DE CONFERENCES :

| | |
|-------------------|----------------------------------|
| MM. ATTEIA | Mathématiques |
| BEAUFILS | Chimie Générale |
| BELLET | Physique |
| BLANCHARD | Chimie Organique |
| BOILLET | Physique |
| BUI TRONG LIEU | Mathématiques |
| CHASTRETTE | Chimie Générale Amiens |
| CHERRUAULT | Mathématiques |
| COMBET | Mathématiques |
| CONSTANT | Radioelectricité et Electronique |
| DERCOURT | Géologie et Minéralogie |
| DEVRAINNE | Chimie Minérale |
| Mme DRAN | Chimie Appliquée |
| MM. GOUDMAND | Chimie Physique |
| GUILLAUME | Botanique |
| HENRY | Physique Amiens |
| HERZ | Calcul Numérique |
| HUARD DE LA MARRE | Calcul Numérique |
| JOLY | Zoologie Amiens |
| LACOSTE | Botanique |
| LAMBERT | Physique Saint-Quentin |
| MAES | Physique |
| METTETAL | Zoologie Amiens |
| MOUVIER | Chimie Saint-Quentin |
| NGUYEN PHONG CHAU | Mathématiques Saint-Quentin |
| PANET | Electromécanique |
| PARSY | Mathématiques Amiens |
| RAUZY | Mathématiques |
| SAADA | Physique |
| SEGARD | Chimie Biologique |
| TUDO | Chimie Amiens |
| VAILLANT | Mathématiques |
| VAZART | Botanique Amiens |
| VIDAL | Physique Industrielle |

SECRETAIRE GENERAL, ATTACHE PRINCIPAL :

Monsieur LEGROS

Nous tenons à témoigner notre profonde reconnaissance à Monsieur le Professeur GERNEZ-RIEUX, Directeur de l'Institut Pasteur de Lille, Membre de l'Académie Nationale de Médecine, Membre correspondant de l'Académie des Sciences, pour l'honneur qu'il nous a fait en nous accueillant à l'Institut Pasteur et en nous permettant d'y entreprendre et d'y poursuivre cette thèse.

Ce travail nous a été proposé et dirigé par Monsieur le Docteur BEERENS, qui n'a cessé de nous prodiguer ses conseils éclairés, tout en nous initiant à la recherche. Nous tenons à le remercier vivement.

Notre gratitude s'adresse à Monsieur le Professeur VIVIER qui nous a fait l'honneur d'accepter la Présidence de cette thèse, ainsi qu'à Monsieur le Professeur GUILLAUME pour les encouragements et les conseils judicieux que nous avons toujours trouvés auprès de lui.

Notre gratitude va également à Monsieur le Professeur BOURIQUET, pour la bienveillance qu'il nous a témoignée en acceptant de juger ce travail.

Nous remercions chaleureusement tous ceux qui nous ont aidé au cours de notre séjour à l'Institut Pasteur, Monsieur le Professeur LECLERC, Monsieur le Professeur SAMAILLE, Monsieur le Professeur TACQUET, Monsieur le Professeur MARTIN, Monsieur le Docteur BUTTIAUX,

Monsieur le Docteur TISON, ainsi que tout le personnel technique.

Enfin, nous remercions vivement le Ministère de la Santé de la Province de Québec qui nous a permis grâce à une bourse d'études d'effectuer ce travail en France dans les meilleures conditions.

TABLE DES MATIERES

| | |
|--|----|
| INTRODUCTION | 1 |
| CHAPITRE I - <u>HISTORIQUE</u> | 2 |
| CHAPITRE II - <u>TECHNIQUES UTILISEES</u> | 10 |
| A - MILIEUX DE CULTURE - RECHERCHES PERSONNELLES ... | 11 |
| - Milieux solides | 11 |
| - Milieux d'isolement | 16 |
| - Milieux liquides | 21 |
| B - TECHNIQUES UTILISEES | 23 |
| 1 - Techniques d'isolement | 24 |
| 2 - Morphologie des colonies | 29 |
| 3 - Sporulation | 30 |
| 4 - L'étude de la mobilité | 33 |
| 5 - Le type respiratoire | 33 |
| 6 - Température limite et optima de croissance . | 33 |
| 7 - Les courbes de croissance | 34 |
| 8 - L'étude de la longévité | 34 |
| 9 - Thermorésistance | 34 |
| 10 - Action de divers agents chimiques sur les spores | 37 |
| 11 - Technique d'étude des caractères biochimi- ques | 40 |
| 12 - Recherche du pouvoir pathogène expérimental. | 45 |
| CHAPITRE III - <u>RESULTATS</u> | 47 |
| GROUPE I - <u>CLOSTRIDIUM THERMOACETICUM</u> | 50 |
| - Origine et désignation des souches | 50 |
| - Caractères cultureux | 51 |
| - température de croissance | 53 |

| | |
|--|-----------|
| - morphologie | 53 |
| - sporulation | 54 |
| - thermorésistance | 54 |
| - effet de tyndallisation | 56 |
| - longévité des formes végétatives | 59 |
| - Action des antiseptiques et du lactate de tylosine sur les spores | 59 |
| - Caractères biochimiques | 61 |
| - Pouvoir pathogène | 63 |
| - Discussion | 63 |
| GRUPE II - <u>CLOSTRIDIUM THERMOSACCHAROLYTICUM</u> | 65 |
| - Origine et désignation des souches | 65 |
| - Caractères cultureux et morphologiques | 66 |
| - température de croissance | 70 |
| - étude des courbes de croissance | 70 |
| - longévité | 74 |
| - sporulation | 81 |
| - thermorésistance | 81 |
| - Caractères biochimiques | 84 |
| - Pouvoir pathogène expérimental | 84 |
| - Discussion | 84 |
| GRUPE III - <u>CLOSTRIDIUM NON IDENTIFIES</u> | 87 |
| A - Non gazogène | |
| - sous-groupe 1 | 88 |
| B - Gazogène | |
| 1 - Non protéolytique | |
| - sous-groupe 2 | 88 |
| - sous-groupe 3 | 89 |
| - sous-groupe 4 | 91 |
| - sous-groupe 5 | 94 |
| - sous-groupe 6 | 95 |
| - sous-groupe 7 | 97 |

| | |
|-----------------------|-----|
| 2 - Protéolytique | |
| - sous-groupe 8 | 98 |
| - sous-groupe 9 | 100 |
| DISCUSSIONS GÉNÉRALES | 106 |
| CONCLUSION | 108 |
| BIBLIOGRAPHIE | 109 |

ETUDE SUR LES CLOSTRIDIUM THERMOPHILES

INTRODUCTION

On connaît les difficultés de classer les bactéries en fonction de leurs affinités thermiques. Les écarts entre les températures minimales et maximales de croissance sont tels qu'il est impossible de prendre en considération l'une et l'autre température. Par contre en tenant compte des températures minima ou maxima de développement indépendamment l'une de l'autre, on parvient plus facilement à définir des groupes. On peut ainsi concevoir que les bactéries cultivant à $50^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ et au dessus correspondent aux thermophiles, celles cultivant au dessus et en dessous de $50^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ s'identifient aux thermotrophes, enfin celles cultivant entre $6^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ et $50^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ soient qualifiées de mésophiles.

Les groupes étant ainsi définis, toutes les souches que nous présentons ici se classent soit dans les thermophiles soit le plus souvent parmi les thermotrophes.

Au cours de cette étude nous envisagerons successivement :

- I - L'historique des Clostridium thermophiles
- II - Les techniques utilisées
- III - Les résultats

CH A P I T R E I

HISTORIQUE

--:-

L'histoire des Clostridium thermophiles comprend deux périodes : la première s'étend de 1903 à 1924, elle correspond aux descriptions morphologiques imprécises ; la seconde, de 1925 à nos jours, voit apparaître un plus grand nombre de propriétés biochimiques reposant sur des bases enzymatiques.

La première espèce de Clostridium thermophiles est décrite par TSIKLINSKY (25), en 1903 ; aucun nom ne lui est donné, il est dénommé "Bacille N° 2. Il est trouvé dans les selles d'un enfant et répond aux caractères suivants : bâtonnet immobile, assez épais, Gram positif, optimum de croissance 56° - 57°, pousse bien à 60 - 62°, léger développement à 37°, à cette température il forme des spores excentriquement disposées, il ne coagule pas le lait et ne liquéfie pas la gélatine.

En 1922, VEILLON (26) décrit trois espèces de thermophiles strictement anaérobies isolées du fumier : thermophile α ; thermophile β ; thermophile γ , seule l'espèce α est sporogène.

Thermophile α : gros bacille Gram négatif, immobile, allongé, avec bouts carrés à 37°, très allongé à 55° avec extrémités pointues, les spores sont terminales, elles résistent 30 minutes à 80° ; il digère l'albumine cuite.

Thermophile β : Gram négatif, assez allongé plutôt grêle.

Thermophile γ : petit bacille grêle et court à Gram négatif.

Les 3 espèces peuvent se développer entre 20° et 58°, elles coagulent le lait, digèrent plus ou moins la caséine et fermentent les sucres en donnant les acides acétique, propionique et butyrique. Elles ne sont pas pathogènes.

En 1925, DANON et FEIRER (6) décrivent quatre espèces de Clostridium thermophiles. Elles sont isolées de fécès de cheval. Ce sont de. Clostridium thermoputricum ; Clostridium thermoaerogenes : Clostridium thermoacidophilus et Clostridium thermochainus.

CLOSTRIDIUM THERMOPUTRIFICUM - possède un pouvoir putréfiant élevé. C'est un bâtonnet court et uniforme ; Gram positif ; immobile. Sur milieu à la viande, les spores sont terminales et ovales. Il fermente le lactose, le glucose, l'amidon de 37° à 55° mais sans acide ni gaz. Il fermente le maltose, le glycérol, le sucrose, le mannitol et l'inuline de 37° à 55° avec production de gaz mais sans acide. Il produit SH₂, ne donne pas d'indole, n'attaque ni les nitrates ni la gélatine. Les spores résistent 10 minutes de 110° à 120°.

CLOSTRIDIUM THERMOAEROGENES - bâtonnet de taille moyenne 7 x 1,8^μ à Gram négatif ; immobile à spores terminales ovales. Il cultive de 45 à 55°, il est tué entre 110° et 120° en 10 minutes ; il fermente les lactose, glycérol, sucrose, mannitol et glucose sans gaz ni acide, le maltose et l'inuline sont fermentés avec gaz mais sans acide. L'amidon est fermenté avec gaz et acide. Les nitrates sont réduits en nitrites, la gélatine n'est pas liquéfiée et il ne produit pas d'indole.

CLOSTRIDIUM THERMOACIDOPHILUS - long bâtonnet à extrémités arrondies 10,8 x 1,2^μ ; Gram positif immobile à spores terminales ovales. La thermorésistance est identique à celle du précédent. Il fermente les lactose, maltose, glycérol, mannitol, inuline et glucose sans production d'acide. L'amidon et le sucrose sont fermentés avec légère acidification mais sans gaz. Les nitrates sont réduits en nitrites, la gélatine n'est pas liquéfiée et il n'y a aucune production d'indole.

CLOSTRIDIUM THERMOCHALIIUS - bâtonnet de morphologie identique à celle de thermoacidophilus ; il est Gram positif et immobile. Il fermente les maltose, glycérol, lactose, mannitol, inuline et glucose sans acidification, l'amidon et le sucrose avec une légère acidification sans gaz ; les nitrates sont réduits en nitrites. La gélatine n'est pas liquéfiée et l'indole n'est pas produit.

En 1927, WERIMAN et WEAVER (28) à propos de leur étude sur les germes producteurs de sulfure de fer causant l'altération de conserves de maïs sucré, proposent le nom de Clostridium nigrificans pour cette nouvelle espèce. Les caractères fondamentaux sont les suivants : bâtonnet de 0,3 à 0,5 μ de large, 3,0 à 6,0 μ de long ; les spores sont ovales subterminales, elles déforment légèrement la cellule. Il est mobile, Gram positif. Il ne liquéfie pas la gélatine, ne produit pas d'indole, l'action sur le lait n'est pas mentionnée. Il produit de l' SH_2 à partir de la cystéine. Le glucose et les autres hydrates de carbone ne sont pas fermentés. Les nitrates ne sont pas réduits en nitrites. La température optimale de croissance est de 55°, il pousse également entre 31° et 65°. Il a été isolé du fumier de cheval et du sol. Les spores résistent 8 heures à 100° à pH 7,0.

En 1929, WERNIKIAN (27) poursuit son étude sur Clostridium nigrificans. La physiologie, l'isolement, l'origine, la description et la classification de cette espèce retiennent particulièrement son attention. Ceci dans le but d'effectuer le contrôle de l'altération des conserves de légumes.

En 1931, PAINE (21) étudie un groupe différent de Clostridium nigrificans signalé par CAMERON, WILLIAMS et THOMPSON en 1928. Les spores sont hautement résistantes, les souches produisent moins de SH_2 , elles fermentent l'arabinose et le fructose ; l'action sur les autres sucres est irrégulière. Elles sont très légèrement protéolytiques.

En 1934, Mc CLUNG (16) dans son étude : "Taxinomie des cultures d'espèces thermophiles causant le bombage des conserves alimentaires" donne le nom de Clostridium thermosaccharolyticum n. sp. à un mince bâtonnet à spores sphériques terminales déformant la cellule, mobile, Gram négatif, ne liquéfiant pas la gélatine et acidifiant le lait. La coagulation de ce dernier est lente, le caillot est ferme et n'est pas digéré ; l'indole n'est pas produit ; il est très glucidolytique, produit acide et gaz à partir des sucres à l'exception du mannitol et du glycérol, le tartrate et le lactate de calcium ne sont pas fermentés ; les nitrates non réduits en nitrites. Il a été isolé de conserves bombées et du sol.

La même année Mc CLUNG et Mc COY (18) décrivent un milieu à base de maïs et de foie particulièrement utile pour mettre en évidence les formes végétatives et les spores d'échantillon de terre et de boue.

En 1935 Mc CLUNG (17) passe en revue les Clostridium thermophiles décrits. Il signale un groupe de gazogènes ne produisant pas de H_2S mais générateur de CO_2 et d' H_2 à partir des sucres. Les cultures dégagent une odeur de fromage. La seule description comparable est celle de PAINE en 1931. Mc CLUNG confirme la description de Clostridium nigrificans de WERKMAN et WEAVER en 1927. La principale source de spores est le sol d'où leur présence dans le sucre et l'amidon.

En 1937, SJOLANDER (23) à propos de son travail : "Les produits de fermentation de Cl. thermosaccharolyticum" démontre qu'un milieu à base de malt et de $CaCO_3$ permet une plus complète utilisation des sucres par Cl. thermosaccharolyticum. Les produits de fermentation du glucose et du xylose sont CO_2 , H_2 , acide acétique, butyrique et lactique.

En 1942, FONTAINE, PETERSON, Mc COY, JOHNSON et RITTER (7) décrivent Clostridium thermoaceticum n. sp. C'est un bâtonnet de 0,4 μ x 2,8 μ , Gram positif à spores terminales presque rondes et déformant légèrement la cellule. Il est immobile en milieu liquide, mais possède des flagelles péritriches. Le lait tournesolé est légèrement réduit. Les glucose, fructose et xylose sont fortement fermentés mais sans production de gaz. Les galactose, mannose, d-arabinose, d-acide lactique, acide gluconique et esculine sont moins activement fermentés. Les nitrates sont réduits en nitrites ; la température optimale de culture est située entre 55° et 60° avec une température minima approximative de 45° et maxima de 65°. Les spores résistent 3 heures à 100° mais non 17 heures. Elles sont encore vivantes après un chauffage de 15 minutes à 120° mais non après 30 minutes. Le principal produit de fermentation est l'acide acétique. Cette espèce est isolée du fumier de cheval ; on la trouve aussi dans les matières fécales.

En 1945, IMSENECKI et SOLNEEVA (11) isolent pour la première fois une bactérie butyrique thermophile qui a les caractères de Cl. pasteurianum. Elle existe en abondance dans les sédiments des fosses à fermentation méthanique.

En 1947, GAUGHRAN (8) observe que les cultures à bactéries cellulolytiques sont fréquemment associées à des Clostridium thermophiles. Il signale Clostridium thermosaccharolyticum décrit par Mc CLUNG en 1934, Clostridium nigrificans décrit par WERKMAN et WEAVER en 1927, les Clostridium thermoacidophilum, thermoaerogenes, thermochainus, thermoputrificum tous décrits par DAIION et FEIRER en 1925. La confusion persiste car WERKMAN d'une part et Mc CLUNG d'une autre sont incapables de confirmer la nature des souches décrites et fournies par DAIION et FEIRER.

En 1948, TABACHICK et VAUGHN (24) décrivent 23 souches provenant de 18 sources différentes fermentant le d-tartrate. Toutes sauf 2 sont identifiées à Clostridium butyricum ou à des variétés ou espèces étroitement apparentées. Les produits terminaux sont les acides acétique et butyrique.

En 1949, LEBERT (13) décrit une nouvelle espèce : "Plectridium causophilum". Ce sont des bâtonnets de 5 μ à 7 μ par 0,7 à 0,8 μ ; Gram positif à spores terminales ovales déformantes ; cette espèce cultive à partir de 41° avec un optimum à 55° ; les spores résistent 30 minutes à 100° et 10 minutes à 115° en bouillon VF glucosé. Elle ne liquéfie pas la gélatine, coagule le lait en 48 heures ; fermente activement avec acide et gaz les glucose, lévulose, galactose, saccharose, lactose et maltose. Ne fermente pas la glycérine et l'amidon. Elle ne réduit pas les nitrates en nitrites, ne donne pas d'indole et produit les acides acétique, butyrique, formique, lactique. Elle est isolée du poivre et de diverses épices.

En 1951, MERCER et VAUGHN (19) reprennent l'étude de TABACHICK et VAUGHN effectuée en 1948. Ils proposent le nom de Clostridium tartarivorum dont ils donnent la description : bâtonnet long et mince ; Gram négatif à spores sphériques et terminales ; la gélatine n'est pas liquéfiée. L'espèce ne produit pas d'H₂S à partir de la tryptone mais la production est variable à partir du thiosulfate de sodium. L-arabinose, d-xylose, glucose, fructose, galactose, maltose, lactose, sucrose, salicine, mannitol et amidon de pomme de terre sont fermentés ; glycérol, inositol et cellulose ne le sont pas. Les nitrates, le sulfite et le sulfate de sodium ne sont pas réduits. La température optimale de développement est comprise entre 55° et 60° avec un minima à 37° et un maxima à 67°. Le tartrate de calcium est fermenté. On le trouve dans le sol et les produits naturels contenant du tartrate.

En 1954, PREVOT, THOUVENOT, PITRE et BRESSOU (22) décrivent une espèce de thermophile anaérobie nouvelle : "Cillobacterium thermophilum". C'est un bâtonnet de 4 à 5 μ par 0,4 μ ; peu mobile ; Gram positif en cultures très jeunes ; les spores résistent 10 minutes à 70° en culture artificielle et 1 heure 30 à 100° dans la conserve d'où il a été isolé. La température optima de croissance est de 55°. Le minima est à 45° et le maxima à 57°. L'espèce ne liquéfie par la gélatine mais coagule le lait en 48 heures. Elle fermente les glucose, lévulose, lactose, amidon avec gaz ; ne réduit pas les nitrates, sulfites et sulfates ; elle produit les acides acétique et butyrique.

En 1957, CAMPBELL, FRANK et HALL (5) observent que les propriétés morphologiques culturales, immunologiques et biochimiques de 5 souches de Clostridium nigrificans et 4 souches de Sporovibrio desulfuricans sont identiques. Le terme Clostridium nigrificans est conservé puisqu'il a la priorité sur Sporovibrio desulfuricans (STARKEY 1938). A notre connaissance aucune autre espèce de sporulées anaérobies thermophiles n'est décrite jusqu'à nos jours. Les travaux mettent l'accent sur des études biochimiques et enzymatiques d'espèces déjà rencontrées en particulier de Clostridium nigrificans. Le tableau I résume les caractères des souches décrites dans la littérature.

| Gaz | Pouvoir réducteur | Mobilité | Latitude de température de croissance | Thermorésistance des spores | Thermosensibilité des spores | Gélatine | Indole | H ₂ S | Nitrate de Na | Sulfite de Na | Sulfate de Na | Lait | Glucose | Saccharose | Lactose | Mannitol | Glycérol | Salicine | Amidon | L + arabinose | D + xylose | Lévulose | Maltose | Galactose | D-tartrate de Ca | Acides volatils |
|-----|-------------------|----------|---------------------------------------|-----------------------------|---|----------|--------|------------------|---------------|---------------|---------------|--------|---------|------------|---------|----------|----------|----------|--------|---------------|------------|----------|---------|-----------|------------------|-----------------|
| + | + | + | 45° | | <i>Cillobacterium thermophilum</i> n. sp. | - | - | - | - | R R | R R | | A | A | A | | | A | A | | A | A | A | A | D-tartrate de Ca | Acét but. |
| - | - | - | 57° | 10' à 70° 90' à 100° | | - | - | - | - | - | - | | | | | | | | | | | | | | | |
| + | + | + | 41° | 30' à 100° | <i>Plectridium cauosophilum</i> n. sp. | - | - | - | - | - | - | C.R.A. | A A | A A | A | | | | | | | A | A | A | A | Acét but. |
| + | + | + | 60° | 25' à 114° | | - | - | - | - | - | - | | | | | | | | | | | | | | | Form but. |
| + | + | + | 30° | | <i>Clostridium tartarivorum</i> n. sp. | - | - | - | - | - | - | | | | | | | | | | | | | | | Acét but. |
| + | + | + | 67° | | | - | - | - | - | - | - | | | | | | | | | | | | | | | Acét but. |
| + | + | + | 30° | | <i>Clostridium thermosaccharolyticum</i> | - | - | - | - | - | - | | | | | | | | | | | | | | | Acét but. |
| + | + | + | 62° | | | - | - | - | - | - | - | | | | | | | | | | | | | | | Acét but. |
| + | + | + | 37° | | <i>Clostridium thermoputrificum</i> | - | - | - | - | - | - | | | | | | | | | | | | | | | Acét but. |
| + | + | + | 55° | 10' à 110° 120° | | - | - | - | - | - | - | | | | | | | | | | | | | | | Acét but. |
| + | + | + | 45° | | <i>Clostridium thermocarogenes</i> | - | - | - | - | - | - | | | | | | | | | | | | | | | Acét but. |
| + | + | + | 55° | 10' à 110° 120° | | - | - | - | - | - | - | | | | | | | | | | | | | | | Acét but. |
| + | + | + | 45° | | <i>Clostridium thermoacidophilus</i> | - | - | - | - | - | - | | | | | | | | | | | | | | | Acét but. |
| + | + | + | 55° | | | - | - | - | - | - | - | | | | | | | | | | | | | | | Acét but. |
| + | + | + | 37° | 10' à 110° 120° | | - 1 sou- | - | - | - | - | - | | | | | | | | | | | | | | | Acét but. |
| + | + | + | 55° | | | che + | - | - | - | - | - | | | | | | | | | | | | | | | Acét but. |
| + | + | + | 37° | | <i>Clostridium thermochainus</i> | - | - | - | - | - | - | | | | | | | | | | | | | | | Acét but. |
| + | + | + | 55° | | | - | - | - | - | - | - | | | | | | | | | | | | | | | Acét but. |
| + | + | + | 37° | 30' à 80° | | - | - | - | - | - | - | | | | | | | | | | | | | | | Acét but. |
| + | + | + | 55° | | | - | - | - | - | - | - | | | | | | | | | | | | | | | Acét but. |
| + | + | + | 20° | | <i>Thermophiles</i> | - | - | - | - | - | - | | | | | | | | | | | | | | | Acét but. |
| + | + | + | 58° | | | - | - | - | - | - | - | | | | | | | | | | | | | | | Acét but. |
| + | + | + | 45° | 8H à 100° | <i>Clostridium thermoacetikum</i> n. sp. | - | - | - | - | - | - | | | | | | | | | | | | | | | Acét but. |
| + | + | + | 65° | ou 15' à 120° | | - | - | - | - | - | - | | | | | | | | | | | | | | | Acét but. |
| + | + | + | 37° | | <i>Clostridium nigrificans</i> | - | - | - | - | - | - | | | | | | | | | | | | | | | Acét but. |
| + | + | + | 62° | | | - | - | - | - | - | - | | | | | | | | | | | | | | | Acét but. |
| + | + | + | 31° | 8H à 100° | | - | - | - | - | - | - | | | | | | | | | | | | | | | Acét but. |
| + | + | + | 65° | ou 10' à 120° | | - | - | - | - | - | - | | | | | | | | | | | | | | | Acét but. |

R : réduction

F : fermentation sans acidification

A : acidification (forte)

C.R.A. : coagulé-rétracté-alvéolaire

a : acidification (faible)

D : digestion

G : gaz

+ à par-

tir de

protéi-

nes

Caractéristiques des espèces décrites dans la littérature

CH A P I T R E I I

TECHNIQUES UTILISEES

--:-

S
LE

DESCRIPTION DES TECHNIQUES UTILISEES

A - MILIEUX DE CULTURE - RECHERCHES PERSONNELLES

Nous nous sommes rapidement aperçus que les milieux utilisés couramment pour cultiver les Clostridium mésophiles, en particulier ceux à base de viande, milieux de Rosenow (3), VL (extrait de viande et de levure) (3), VF (digestion pepsique de viande et de foie) ne convenaient pas à la culture des Clostridium thermophiles : ou bien de nombreuses espèces ne cultivaient pas sur ces milieux ou bien il était impossible d'obtenir une subculture au 2ème repiquage. Des essais préliminaires destinés à déterminer le milieu le plus favorable furent donc entrepris.

MILIEUX SOLIDES

Les essais préliminaires ont été réalisés avec des cultures pures des souches provenant d'un extrait de viande de baleine, d'un extrait de viande de cachalot, d'un échantillon de poudre d'algues. Les cultures liquides étaient diluées de 10^{-1} à 10^{-6} et chaque dilution ensemencée à raison de 0,50 ml. par tube de 180 x 9 contenant l'un des milieux suivants :

| | |
|--------------------|----------|
| 1 - Trypticase | 15 gr. |
| Extrait de levures | 10 gr. |
| Agar | 4 gr. |
| Eau distillée | 1000 ml. |

| | |
|--------------------|----------|
| 2 - Trypticase | 15 gr. |
| Extrait de levures | 10 gr. |
| Glucose | 0,10 gr. |
| Agar | 4 gr. |
| Eau distillée | 1000 ml. |

| | |
|--------------------|----------|
| 3 - Trypticase | 15 gr. |
| Extrait de levures | 10 gr. |
| Glucose | 0,10 gr. |
| Agar | 7 gr. |
| Eau distillée | 1000 ml. |

| | |
|-------------------------|----------|
| 4 - Trypticase | 15 gr. |
| Extrait de levures | 10 gr. |
| Glucose | 0,10 gr. |
| Chlorydrate de cystéine | 0,30 gr. |
| Agar | 4 gr. |
| Eau distillée | 1000 ml. |

| | |
|--------------------|----------|
| 5 - Soytone | 10 gr. |
| Extrait de levures | 10 gr. |
| Glucose | 0,10 gr. |
| Agar | 4 gr. |
| Eau distillée | 1000 ml. |

La lecture était effectuée après une incubation de 18 heures à 55°.

Les résultats sont exprimés dans le tableau II. Ils correspondent pour les souches extrait de viande de baleine et de cachalot aux colonies obtenues à la dilution de 10^{-5} et pour la poudre d'algues à celles de 10^{-6} .

| Milieux | Souches | | |
|---------|---------------------------------|----------------------------------|--------------------|
| | Extrait de viande de baleine | Extrait de viande de cachalot | Poudre d'algues |
| 1 | 56 gaz - | 20 1 bulle | - |
| 2 | 62 gaz - | 22 gaz 14 bulles | - |
| 3 | 68 gaz - | 63 gaz 18 bulles | - |
| 4 | 44 gaz - | 65 gaz 15 bulles | 22 |
| 5 | 42 gaz + | 65 gaz ++ | 300 gaz +++ |

Les chiffres correspondent au nombre de colonies contenues dans le tube.

Etude de 5 milieux de culture vis à vis de 3 souches de Cl. thermophiles.

TABLERAU II

Ainsi le milieu à la soytone (5) est nettement plus favorable que les autres pour la souche "poudre d'algues", aucune autre formule ne lui convient. Il est très satisfaisant pour les deux autres souches. Ainsi la peptone de soja est donc un ingrédient de choix pour les Clostridium thermophiles. Sa concentration optimale s'est révélée de 10 gr par litre.

Recherche d'un facteur naturel favorisant la croissance

Etait-il possible d'augmenter encore la qualité du milieu à la soytone en lui ajoutant des extraits des produits naturels desquels on les isole le plus souvent.

Pour cela il fallait utiliser les ingrédients d'origine végétale ou animale soit à l'état naturel soit sous forme d'extraits.

Nous avons adopté un milieu de base simple dépourvu d'inhibiteur de la croissance sur lequel les différentes souches isolées ne donnaient pas de culture. La formule est la suivante :

| | |
|-----------------|--|
| Soytone | 1 gr. |
| Cystéine (chte) | 0,60 gr. |
| Agar | 4 gr. |
| Eau distillée | 1000 ml. répartis en tubes de 180 x 9, stérilisés à l'autoclave 20 minutes à 120°. |

Les extraits végétaux ont été obtenus en agitant les végétaux en poudre avec de l'eau distillée. Cette préparation était soit autoclavée (A) soit chauffée au bain-marie bouillant (C). Le liquide obtenu était alors ajouté à raison de 10% de base. Les extraits d'origine animale, baleine, cachalot, viande de boeuf étaient soit autoclavés, soit stérilisés par filtration sur membrane (F) et ajoutés à la concentration de 1%. Deux témoins ont été utilisés d'une part la base à la soytone, d'autre part le milieu 5 qui avait donné les meilleurs résultats lors des précédents essais. Les souches ont été ensemencées à partir d'une culture en milieu de Rosenow dans 3 tubes, par épuisement à la pipette Pasteur fermée.

Les résultats sont consignés dans le tableau III.

| Extraits | Souches | | | | |
|----------------------------|--------------|-----------|-----------|-----------|-------------------|
| | Potage 63 | Baleine | Potage 72 | Algue | Farine de poisson |
| Pomme de terre | A : - | - | - | + | - |
| | C : - | - | - | + | + |
| Poireau | A : ++ | + | - | ++ | - |
| | C : ++ | ++ | ++ | + | + |
| Persil | A : ++ | + | + | ++ | + |
| | C : - | - | illis. | illis. | illis. |
| Oignon d'Egypte | A : - | - | - | ++ | - |
| | C : - | + | - | ++ | - |
| Pois | A : ++ gaz + | ++ | ++ gaz | +++gaz+++ | - |
| | C : + | + (+) | + (+) | ++ | - |
| Cresson | A : - | - | + | + | - |
| | C : - | - | - | - | - |
| Moutarde | A : - | - | - | + | - |
| | C : - | - | - | + | - |
| Chou fleur | A : - | + | - | ++ | - |
| | C : + | - | - | ++ | - |
| Farine de poisson | A : - | - | + | (+) | - |
| Extrait de baleine | A : + | ++ | + | + | - |
| | F : - | ++ | + | + | - |
| Extrait de cachalot | A : + | + | + | + | + |
| | F : - | + | - | - | - |
| Extrait de viande de boeuf | A : + | - | - | + | - |
| | F : - | - | - | + | - |
| Témoin base | - | - | - | - | - |
| Témoin soytone 5 | ++ gaz + | ++ 1bulle | +++gaz+++ | +++gaz+++ | - |

Action de différents extraits de produits naturels sur la croissance de 5 souches de Clostridium thermophiles



TABLEAU III

Certains extraits sont peu favorables à la croissance : l'extrait de pomme de terre, d'oignon d'Egypte, de cresson, de moutarde, de chou-fleur, de viande de boeuf.

L'extrait de persil active la croissance lorsqu'il est utilisé sans chauffage préalable, de même l'extrait de cachalot. Enfin deux extraits favorisent le développement ; l'extrait de poisson et l'extrait de pois avec un net avantage pour ce dernier. Les résultats confirment les travaux de MERCER et Coll. (19) qui recommandaient les milieux aux pois pour cultiver les Clostridium thermophiles. Ainsi la soytone 1°/∞ + extrait de pois donne des résultats identiques au milieu soytone 15°/∞ + extrait de levures. Ce dernier milieu est cependant préférable, sa préparation est simple et les constituants sont standardisés. Nous l'avons en conséquence adopté au cours de ce travail.

MILIEU D'ISOLEMENT (1)

Nous avons constaté que le milieu soytone-extrait de levures-glucose-gélosé à 7 °/∞ d'agar réparti en tubes de 180 x 9 pour l'isolement en profondeur manquait de sélectivité. Il permet l'isolement des Clostridium thermophiles à condition qu'ils ne soient pas accompagnés de Bacillus cultivant à haute température. Dans ce cas en effet les Bacillus masquent complètement les Clostridium. D'une part ils cultivent plus rapidement que les anaérobies et d'autre part ils envahissent les milieux par diffusion dans le gel d'agar à la faveur des fragmentations de la colonne de milieu provoquées par les gaz produits par les Clostridium associés.

Nous avons donc recherché les possibilités d'ajouter le milieu à la soytone d'agents sélectifs. L'association sulfite de sodium-sulfadiazine polymyxine s'est révélée la plus intéressante. Les milieux suivants ont été essayés :

1 - Témoin soytone

| | |
|--------------------|--------------------|
| Soytone | 10 gr. |
| Extrait de levures | 10 gr. |
| Glucose | 0,10 gr. |
| ClNa | 5 gr. |
| Agar difco | 7 gr. |
| Eau distillée | 1000 ml. pH 7,2 |

- 2 - Milieu 1 additionné de 0,50 gr. pour 1000 de sulfite de sodium et de 0,50 pour 1000 de nitrate de fer.
- 3 - Milieu 1 additionné de 0,01 pour 1000 de sulfate de polymixine.
- 4 - Milieu 1 additionné de 0,10 pour 1000 de sulfadiazine.
- 5 - Milieu 1 additionné de sulfate de polymixine (0,01‰) et de sulfadiazine (0,10‰).
- 6 - Milieu 1 additionné de sulfite de sodium 0,50 pour 1000, sulfate de polymixine 0,01 pour 1000, sulfadiazine 0,10 gr. pour 1000, citrate de fer 0,50 gr. pour 1000.

Sept produits naturels contenant des Clostridium thermophiles associés à des Bacillus thermophiles ont été sélectionnés pour les essais : poudre d'algues, extrait de cachalot, extrait de baleine, farine de viande, farine de poisson, deux échantillons de potage déshydraté.

Les résultats sont consignés dans le tableau IV.

| Milieux | Poudre d'algues | Extrait de cachalot | Extrait de baleine | Potage 72 | Potage 63 | Farine de viande |
|---|--|--|--|--|--|---|
| 1 (Témoïn base) | $\frac{\text{Bacillus}}{\text{G} = 0}$ | $\frac{\text{Bacillus}}{\text{G} = 0}$ | $\frac{\text{Bacillus}}{\text{G} = 0}$ | $\frac{\text{Bacillus}}{\text{G} = 0}$ | $\frac{\text{Bacillus}}{\text{G} = 0}$ | $\frac{\text{Bacillus}}{\text{G} = +}$ |
| 2 (SO ₃) | $\frac{\text{Bacillus}}{\text{G} = 1 \text{ bulle}}$ | $\frac{\text{Bacillus}}{\text{G} = 0}$ | $\frac{\text{Bacillus}}{\text{G} = 0}$ | $\frac{\text{Bacillus}}{\text{G} = 0}$ | $\frac{\text{Bacillus}}{\text{G} = 0}$ | $\frac{\text{Bacillus}}{\text{G} = +}$ |
| 3 (Polymixine) | - | - | - | - | - | - |
| 4 (Sulfadiazine) | $\frac{\text{Bacillus}}{\text{G} = +}$ | $\frac{\text{Bacillus}}{\text{Cl. th. = nb col.}} \text{ G} = +++$ | $\frac{\text{Bacillus}}{\text{G} = +}$ | $\frac{\text{Bacillus}}{\text{G} = 0}$ | $\frac{\text{Bacillus}}{\text{G} = 0}$ | $\frac{\text{Clostr. ther-}}{\text{mophile pur}}$ |
| 5 (Sulfadiazine + polymixine) | - | - | - | - | - | - |
| 6 (SO ₃ + sulfadiazine + polymixine) | Anaerobie strict colonie bl. | Anaerobie strict 28 colonies N: 10 colonies bl. | Anaerobie strict colonies houppeuses | Anaerobie strict 7 colonies N: 1 colonie bl. | Anaerobie strict colonies diffuses | Anaerobie strict colonies bl. |

- = Pas de culture ; G = gaz ; bl. = blanches ; N = noires.

Action de divers agents sélectifs sur l'isolement des Clostridium thermophiles à partir de produits naturels.



TABLEAU IV

Ils autorisent les constatations suivantes :

1 - Le milieu à la soytone ne permet l'isolement des Clostridium thermophiles d'aucun des 6 échantillons. Les Bacillus cultivent seuls dans 5 d'entre eux. Cette observation est confirmée par l'absence de gaz. Les cultures obtenues à partir de la farine de viande sont gazogènes, le Clostridium s'est développé mais les Bacillus ont envahi le milieu.

2 - Le sulfite de sodium n'inhibe pas le développement des Bacillus.

3 - La polymixine seule inhibe à la fois les Bacillus et les Clostridium thermophiles.

4 - La sulfadiazine seule diminue le nombre des Bacillus mais il est encore impossible d'isoler les Clostridium thermophiles dans la plupart des cas.

5 - L'association sulfadiazine polymixine donne des résultats identiques à ceux obtenus avec la polymixine seule.

6 - L'association sulfite - sulfadiazine - polymixine se révèle favorable. Le sulfite supprime le pouvoir inhibiteur de la sulfadiazine + polymixine tout en permettant la croissance des Clostridium thermophiles. Dans tous les cas les Bacillus sont inhibés mais les Clostridium se développent rapidement en donnant des colonies isolées. Leur isolement devient possible. Les souches gazogènes disloquent la colonne d'agar. Ce milieu nous a rendu de grands services. Il a été utilisé systématiquement au cours de ce travail. Nous l'avons dénommé SSSP : abréviation de soytone, sulfite, sulfate, polymixine.

Formule du milieu SSSP

| | |
|--------------------|--------|
| Extrait de levures | 10 gr. |
| Soytone | 10 gr. |

| | |
|----------------------|----------|
| Chte de cystéine | 0,60 gr. |
| Glucose | 1 gr. |
| Agar | 7 gr. |
| Sulfite de sodium | 0,50 gr. |
| Citrate de fer | 0,50 gr. |
| Polymixine (sulfate) | 0,01 gr. |
| Sulfadiazine | 0,12 gr. |
| Eau distillée | 1000 ml. |

Ajuster le pH à 7,2 - 7,4.

Ce milieu n'est cependant pas efficace dans tous les cas. Il ne permet pas la croissance de Cl. thermoaceticum par exemple. Certains autres Clostridium thermophiles échappent aussi à l'isolement. Ainsi dans certains cas le dégagement du gaz observé dans un milieu liquide ensemencé avec un produit suspect et incubé à 55° témoigne de la présence d'un Clostridium thermophile. Ce dernier est transmissible de milieu liquide en milieu liquide, mais son isolement échoue par défaut de culture sur milieu sélectif, ce dernier ~~inhibant~~ à la fois les Cl. thermophiles et les Bacillus qui leur sont associés. Dans ces cas des essais ont été réalisés en remplaçant la soytone par la trypticase à raison de 10 gr. par litre. Les résultats furent comparables.

Le milieu à la soytone additionné de 15 pour 1000 d'agar coulé en boîte de Pétri a été éprouvé pour isoler les souches en surface en anaérobiose réalisées soit par la technique au pyrogallol (20 , 2) soit par la jarre de Mac Intosh (15). Les résultats furent décevants, les Clostridium thermophiles cultivent mal en surface, ils s'accomodent mieux des milieux profonds.

Aussi les milieux d'isolement utilisés sont de deux types :

- 1 - Milieu à la soytone simple
- 2 - Milieu à la soytone sélectif (SSSP)

MILIEUX LIQUIDES

Le milieu :

| | |
|--------------------|----------|
| Soytone | 10 gr. |
| Extrait de levures | 10 gr. |
| Chte de cystéine | 0,60 gr. |
| Glucose | 1 gr. |
| ClNa | 5 gr. |
| Eau distillée | 1000 ml. |

pH ajusté à 7,2 - 7,4, réparti en tubes de 180 x 16 et stérilisé à 120° pendant 20 minutes convient à la croissance des Clostridium thermophiles à condition de réaliser les cultures en anaérobiose soit en tubes scellés sous vide soit dans une jarre de Mac Intosh et Fildes. Néanmoins, le milieu enrichi par un fragment de cervelle permet d'obtenir une culture plus abondante et plus rapide. L'addition de vert janus comme indicateur de pH permet par le virage du mauve au jaune de déceler plus facilement la culture des souches non gazogènes et non acidifiantes.

Le milieu dénommé "milieu soytone-cervelle-vert janus" se prépare ainsi :

mélanger les ingrédients

| | |
|--------------------|----------|
| Soytone | 10 gr. |
| Extrait de levures | 10 gr. |
| Chte de cystéine | 0,60 gr. |
| ClNa | 5 gr. |
| Glucose | 1 gr. |

Phosphate monopotassique 1 gr.

Phosphate disodique 12 H₂O 3,107 gr.

Solution de vert janus à 1% 2,5 ml.

Eau distillée 1000 ml., dissoudre en faisant bouillir, ajuster le pH à 7,2, reporter à l'ébullition pendant 10 minutes, filtrer sur papier mouillé, répartir 12 ml. par tube de 160 x 16 dans lesquels on a placé au préalable un petit morceau de marbre blanc du volume d'une noisette et un fragment du volume d'une grosse noisette de cervelle de bœuf ou de mouton durcie par séjour à la chambre froide et débarrassée des méninges et vaisseaux superficiels. On stérilise à l'autoclave à 115°.

La conservation de ce milieu n'est pas infinie. A la température du laboratoire il s'altère rapidement (après 15 jours environ) par dégradation de l'extrait de cervelle. Après ce délai, même la régénération au bain-marie bouillant est incapable de lui restituer sa valeur primitive.

Utilisation du milieu

1°) Le milieu soytone-cervelle-vert janus doit être "régénéré" immédiatement avant l'ensemencement. Pour cela il suffit de le placer dans un bain-marie bouillant durant 15 à 20 minutes ; à trois ou quatre reprises, au cours du chauffage, on donne des petits coups sur la paroi du tube afin de permettre au gaz dissous de s'échapper plus facilement. On refroidit le tube sous un courant d'eau froide avant de l'ensemencer. L'absence de régénération n'inhibe pas, cependant, le développement des anaérobies ; le temps de latence précédant la croissance est seulement plus long.

Après ensemencement, on recouvre la surface d'un travers de doigt de paraffine stérile préalablement fondue ou d'une couche de gélose blanche.

Paraffine destinée à être coulée à la surface du milieu : paraffine (point de fusion 50 - 55°C : 20 ml. par tube de 200 x 20). On bouche au coton cardé et on stérilise à l'autoclave 20 minutes à 120°. On fait fondre au bain-marie bouillant ou en passant rapidement le tube dans la flamme d'un bec Bunsen au moment de l'emploi.

2°) Le fragment de cervelle facilite la culture de très nombreuses espèces.

3°) Le prélèvement des bactéries ayant cultivé s'effectue au niveau du fragment de cervelle. Pour y parvenir on perce la paraffine le long de la paroi du tube à l'aide d'une tige métallique chauffée dans la flamme d'un bec Bunsen. Au cours de cette opération on incline le tube à 45° environ pour éviter que la paraffine fondue obstrue l'orifice ainsi ménagé. C'est par ce dernier que l'on introduit l'effilure de la pipette Pasteur servant au prélèvement.

4°) Le milieu possède une teinte marron clair. Il devient jaunâtre après réduction provoquée par la croissance microbienne.

B - TECHNIQUES UTILISEES

Nous ne détaillerons pas ici les techniques générales d'études des anaérobies. Elles sont décrites en détail dans la monographie de H. BEERENS et MM. TAHON CASTEL "Infections humaines à bactéries anaérobies non toxigènes"(3). Nous décrirons seulement les procédés particuliers utilisés au cours de ce travail. Nous envisagerons successivement :

Les techniques relatives

- 1 - à l'isolement suivant la nature du produit envisagé
- 2 - à l'étude de la morphologie des colonies
- 3 - à l'étude de la morphologie des bactéries et de la sporulation
- 4 - à l'étude de la mobilité
- 5 - à l'étude du type respiratoire
- 6 - à l'étude des températures minima et maxima de croissance
- 7 - à l'étude des courbes de croissance
- 8 - à l'étude de la longévité
- 9 - à l'étude de la thermorésistance
- 10 - à l'étude de la résistance des spores aux agents chimiques et de la sensibilité au lactate de tylosine
- 11 - à l'étude des caractères biochimiques
 - a) production de gaz
 - b) production de SH_2
 - c) réduction des NO_3 en NO_2
 - d) réduction des SO_3
 - e) recherche des fermentations des substances hydrocarbonées (sucres - sels d'acides organiques)
 - f) détermination des acides volatils
 - g) action sur la gélatine
 - h) production d'indole
 - i) action sur le lait
 - j) recherche du pouvoir cellulolytique
- 12 - à l'étude du pouvoir pathogène pour l'animal

1 - TECHNIQUE D'ISOLEMENT

Les dilutions des produits à examiner ont été systématiquement réalisées dans le milieu tryptone sel de formule :

tryptone 1 gr.

ClNa 8 gr.

Eau distillée 1000 ml. Faire dissoudre. Ajuster le pH à 7,00, filtrer et répartir en flacons de 100 ml. Autoclaver 20 minutes à 120°.

Le mode d'isolement varie en fonction de la nature des produits.

Sucre et mélasse

Une solution de sucre ou de mélasse à 50 % dans de l'eau distillée est utilisée. Après un examen microscopique direct on procède à l'ensemencement des milieux d'isolement.

1) On introduit 4 ml. de la solution dans un tube de milieu soytone-cerveille-vert janus préalablement régénéré et recouvert d'une couche de gélose blanche fondue. On incube à 55°. On observe quotidiennement pendant 8 jours. Les milieux supportant une culture sont alors ensemencés par épuisement dans 5 tubes de milieu SSSP entube de 180 x 9 mm. On incube à nouveau à 55° et on repique les différents types de colonies développées par épuisement dans trois tubes de milieu à la soytone contenant 7‰ d'agar réparti en tubes de 180 x 9. Cette dernière est repiquée dans un milieu soytone-cerveille-vert janus.

Parallèlement à cet isolement en profondeur on effectue des cultures en surface sur le milieu soytone à 15‰ d'agar coulé en boîte de Pétri incubées en anaérobiose réalisée par la technique au pyrogallol alcalin. Après incubation à 55° les différents types de colonies sont repiqués sur milieu à la soytone en tube de 180 x 9 mm et finalement en milieu liquide soytone-cerveille-vert janus.

L'ensemencement direct en milieu liquide soytone-cerveille-vert janus est indispensable car le pouvoir inhibiteur de l'association sulfite + polymixine + sulfadiazine s'oppose à la germination des spores ensemencées avec la solution sucrée.

2) Les spores sont dénombrées en ensemençant 2 ml. de la solution sucrée à 50 ‰ dans des tubes de 200 x 20 mm. contenant le milieu à la soytone à 7‰ d'agar sans sulfite de sodium ni polymixine ni sulfadiazine. Ici les résultats sont en général décevants, les colonies de Bacillus fréquents dans ces produits, interfèrent avec celles des Clostridium et tout dénombrement spécifique devient impossible. Seuls sont interprétables les résultats provenant de solutions contenant les Clostridium thermophiles non associés aux Bacillus.

Préparations spéciales pour l'enfance(PSE)

Les échantillons nous parviennent habituellement en flacons de 150 gr. fermés par un bouchon métallique. Différents types de préparations ont été examinés, en particulier : poulet-légumes composée de carottes, pommes de terre, poireaux, amidon de maïs, sel, sucre ; "veau jardinière" composée de pommes de terre, carottes, pois, oignon, farine de maïs, sel, sucre. Tous ces aliments sont autoclavés à des températures voisines de 125° pendant 20 minutes.

L'examen de ces produits comprend :

- une incubation du flacon à 55° pendant 8 jours, puis un examen microscopique direct après étalement sur une lame porte-objet et coloration par la méthode de Gram
- enfin des ensemencements selon le protocole ci-dessous décrits :

Dilution - 1 gr. de produit est trituré avec un agitateur stérile dans 10 ml. de tryptone sel, répartir dans un verre à pied stérile. On obtient ainsi une dilution au 1/10.

1 ml. de cette dernière est introduit dans 9 ml. de sol. de tryptone sel pour obtenir une dilution à 1/100.

Insemencement - Il est réalisé à partir des dilutions chauffées ou non chauffées.

Produit non chauffé

1°) 1 ml. de chacune des dilutions (1/10 et 1/100) est ensemencé dans un tube de milieu à la soytone contenant 7 gr. pour 1000 d'agar réparti en tube de 200 x 20 à raison de 25 ml. par tube. Une couche d'huile de vaseline est répartie à la surface de chaque milieu pour éviter l'évaporation.

2°) 1 ml. de chaque dilution est ensemencé dans deux tubes de milieu liquide : Rosenow et milieu soytone-cervelle-vert janus, répartir à raison de 12 ml. par tube de 160 x 16 préalablement régénérés et recouverts d'une couche de paraffine.

Produit chauffé

Les mêmes opérations sont pratiquées à partir des dilutions préalablement chauffées 10 minutes à 80°C.

L'incubation est réalisée à 55°C pendant 10 jours.

Milieux solides profonds - Les colonies sont recherchées à la loupe (x 10). Elles sont en général difficiles à observer en raison des débris végétaux constituant l'inoculum et répartis dans la masse du milieu.

Milieux liquides - En milieu de Rosenow - La modification apparente du milieu est à peine décelable, seul le soulèvement de la paraffine dans le cas de la présence d'une bactérie gazogène permet de suspecter une culture. Par contre dans le milieu à la soytone + vert janus, dès qu'une bactérie anaérobie se développe, l'indicateur est réduit et le milieu vire au jaune. Dès lors un examen microscopique après coloration de Gram révèle la présence de bactéries ainsi que leur aspect morphologique. Dans le cas des PSE nous n'avons jamais rencontrer de Bacillus mais seulement des Clostridium thermophiles. De ce fait un

repiquage de la culture et un ensemencement par épuisement de 12 tubes de milieu profond à la soytone permettaient d'obtenir des colonies isolées et les souches pures correspondantes. Les milieux sont recouverts d'une couche d'huile de vaseline et incubés à 55°.

Nous pouvons assimiler à ces produits les conserves d'épinards qui nous sont adressées par boîtes serties de 5 kilos stérilisées par autoclavage.

Lorsque la souche est pure elle est repiquée sur un milieu liquide soytone-cervelle-vert janus. En général les bactéries que nous avons rencontrées dans les PSE ne sont pas gazogènes.

Potages, farine de bétail, extrait d'algues, extraits de balcine et de cachalot

Un gramme de produit est introduit d'une part dans un tube de milieu de Rosenow cystéiné régénéré paraffiné, d'autre part dans un tube de milieu liquide à la soytone-vert janus régénéré et paraffiné. L'incubation est réalisée à 55°C. Dès qu'une culture se manifeste, soit par décoloration de l'indicateur soit par la production de gaz, un isolement est pratiqué sur milieu sélectif SSSP réparti en tubes de 180 x 9. L'expérience nous a montré que dans la plupart des cas les Clostridium thermophiles étaient associés à des Bacillus. Le milieu SSSP les élimine et seuls les anaérobies cultivent. L'isolement et la purification des souches s'effectuent par repiquage de divers types de colonies en milieu profond à la soytone. Lorsque la souche est pure elle est repiquée dans un milieu liquide soytone-cervelle-vert janus.

Les dénombrements sont effectués en milieu liquide utilisant la technique du nombre le plus probable. Dans ce cas le produit est homogénéisé au moyen d'un mixer dans une solution

de tryptone sel pour obtenir une dilution à 1/10. On procède alors à des dilutions à 10^{-2} , 10^{-3} , on ensemence 1 ml. de chacune d'elles à raison de 1 ml. par tube de milieu soytone-vert janus et Rosenow régénéré paraffiné. Les inoculum correspondent donc à 0,10 gr., 0,01 gr., 0,001 gr. L'incubation est réalisée à 55°. Les résultats sont donnés en nombre de spores par gramme de produit.

La recherche des spores hautement résistantes à la chaleur a été réalisée en homogénéisant 1 gr. du produit à étudier dans 5 ml. d'une solution de saccharose à 50 % et en soumettant celle-ci à la température de 120°C pendant 1 heure dans un bain de paraffine. L'ensemencement était ensuite réalisé dans un milieu soytone-cerveille-vert janus incubé à 55°C.

Milieus naturels et fécès animales

On procède de façon identique à celle décrite dans le paragraphe précédent.

2 - MORPHOLOGIE DES COLONIES

Les cultures en surface ont été réalisées à partir de souches pures par isolement au fil droit en stries à la surface d'un milieu à la soytone additionné de 15% d'agar coulé en boîte de Pétri (2). L'anaérobiose était réalisée soit par le procédé au pyrogallol soit par la technique de Mac Intosh et Fildes. Après incubation à 55° le temps nécessaire à l'obtention des colonies, l'observation s'effectue à la loupe binoculaire au grossissement de 20 diamètres. Dans ces conditions cependant la croissance des Clostridium thermophiles n'a jamais été entièrement satisfaisante. Nous en rendons responsable la trop forte concentration en agar du milieu : les Clostridium thermophiles cultivent mieux dans des milieux à a w élevé.

Pour cette raison les milieux profonds ne contenant que 6 à 8^o/₁₀₀ d'agar donnent de meilleurs résultats. Les colonies sont obtenues par la méthode classique d'épuisement de l'inoculum à la pipette Pasteur fermée dans des milieux répartis entubes de 180 x 9 mm. Les colonies sont observées à la loupe à un grossissement de 8 diamètres.

3 - SPORULATION

L'étude de la position de la spore est capitale dans la détermination des Clostridium. La plupart des Clostridium thermophiles sporulent difficilement dans les milieux artificiels. Il était donc opportun de rechercher les conditions favorisant la sporulation. Les techniques suivantes ont été mises en oeuvre :

a) Milieu à la soytone additionné de sulfate de Mn, Mg, NH₄ enrichis de différents produits naturels.

| | |
|--------------------------------|--------------------|
| Milieu de base : soytone | 1 gr. |
| cystéine (Chte) | 0,60 gr. |
| agar (Difco) | 4 gr. |
| eau distillée | 1000 ml. pH 7,2 |

Autoclaver 20 minutes à 120°, répartir 20 ml. par tube de 200 x 20. Trois milieux en dérivent :

| | |
|---|----------|
| 1 - Base | 1000 ml. |
| SO ₄ Mn | 0,10 gr. |
| 2 - Base | 1000 ml. |
| SO ₄ Mg | 0,05 gr. |
| SO ₄ (NH ₄) ₂ | 0,05 gr. |
| 3 - Base | 1000 ml. |
| SO ₄ Mn | 0,10 gr. |
| SO ₄ Mg | 0,05 gr. |
| SO ₄ (NH ₄) ₂ | 0,05 gr. |

Chacun d'eux est enrichi par l'un des extraits suivants : pois cassés, baleine, cachalot, farine de poisson, potage déshydraté "volaille-vermicelle" ; légumes déshydratés : cresson, épinards, poireaux, persil, moutarde, chou-fleur ; terre de jardin et un mélange constitué de 63 % de substances végétales (poivre 2 gr., oignon d'Égypte 2 gr., cresson 4 gr., vermicelle 7,5 gr., poireaux 7 gr., épices 2 gr., farine de blé 4 gr., amidon 4 gr.) + 20 % de substances d'origine animale (lait écrémé 10 gr.) + 17 % de sel. Ces produits sont introduits dans les milieux de deux façons : en sachets de cellophane ou sous forme d'extraits aqueux.

Sachets de cellophane : on dépose, sur une feuille de cellophane de 10 cm² environ 1 gr. des substances envisagées, le sachet est confectionné en réunissant les bords avec un fil de lin. Il est alors introduit dans un tube de 200 x 20 contenant le milieu et stérilisé à l'autoclave 10 minutes à 120°. L'ensemencement est réalisé à partir d'une culture jeune de la souche à étudier (1 ml. environ). On recouvre d'une couche d'huile de vaseline stérile, on incube à 55°. L'examen microscopique après coloration de Gram est effectué dès l'apparition de la culture. Cette dernière est ensuite abandonnée à la température du laboratoire et examinée à intervalle d'une semaine pendant 1 mois ou plus.

Extraits aqueux : le produit est introduit dans un ballon, il est dilué au 1/10ème dans de l'eau distillée, agité pour obtenir une suspension homogène, divisé en deux parties ; l'un est autoclavée 10 minutes à 120°, l'autre est chauffée 20 minutes à 100°. Les extraits obtenus sont filtrés sur papier. Ceux provenant de la partie autoclavée sont stérilisés par autoclavage à 120° pendant 10 minutes, ceux obtenus à partir de l'extrait chauffé à 100° sont à nouveau soumis à ce traitement thermique. La répartition dans les milieux s'effectue stérilement à la pipette à raison de 3 ml. par tube de 25 ml. de milieu.

L'ensemencement et la recherche des spores sont réalisés comme dans le cas de la technique des sachets.

b) Milieu au sérum coagulé (4)

Deux séries de milieu ont été préparées :

- 1) sérum de cheval + extrait de viande 1^o/₁₀₀ + sulfate de magnésium 0,05 gr. ^o/₁₀₀.
- 2) sérum de cheval + soytone 1^o/₁₀₀ + sulfate de magnésium 0,05 gr. ^o/₁₀₀ + sulfate d'ammonium 0,05 gr. ^o/₁₀₀ + sulfate de manganèse 0,10 ^o/₁₀₀.

Répartir en tubes de 160 x 16 à raison de 3 ml. par tube. Coaguler en position inclinée par chauffage de 2 heures à 75°C.

Les milieux sont ensemencés en déposant à leur surface 10 gouttes d'une culture jeune en milieu soytone-cerveille de la souche à étudier. Les tubes sont alors scellés sous vide et incubés à 55° pendant 8 à 10 jours. La recherche des spores est effectuée par examen microscopique après coloration de Gram ou par ensemencement après chauffage à 80° pendant 10 minutes de quelques gouttes de la suspension de bactéries récoltée au fond du tube.

c) Milieu D R C H de GIBBS et FRAIE (9)

Ce milieu permet la sporulation de nombreuses espèces de Clostridium. Il a pour formule : peptone (Evans) 10 gr., Lab-Lenco (oxoid) 10 gr., acétate de sodium hydraté 5gr., extrait de levures 1,50 gr., amidon soluble 1 gr., glucose 1 gr., L. cystéine 0,50 gr., eau distillée 1000 ml. pH 7,1, 7,2. Il est réparti à raison de 20 ml. par tube de 200 x 20 régénéré et ensemencé à partir d'une culture en milieu à la soytone-cerveille. L'incubation à 55° est maintenue plusieurs jours et l'examen microscopique effectué après coloration de Gram. Les cultures sont conservées à la température ambiante pendant plusieurs mois et examinées à intervalles réguliers. ./.

d) Le milieu de Rosenow cystéiné et le milieu soytone-vert janus

4 - L'ETUDE DE LA MOBILITE est réalisée à partir de culture de quelques heures en milieu soytone-cerveille, obtenue à la température optimale de croissance, par examen microscopique entre lame et lamelle.

Les cils ont été recherchés par la technique de Leifson (14).

5 - LE TYPE RESPIRATOIRE a été déterminé par culture en milieu à la soytone à 8^o/_{oo} d'agar réparti en tubes de 180 x 9. Nous avons ainsi retenu dans cette étude les souches anaérobies strictes et microaérophiles anaérobies de prédilection. Le caractère anaérobie strict a été confirmé par l'absence de culture sur milieu à la soytone en surface en aérobiose à la température optimale de croissance de la souche étudiée.

6 - TEMPERATURE LIMITE ET OPTIMA DE CROISSANCE

Cette détermination a été réalisée par culture à la fois en milieu liquide à la soytone-cerveille-vert janus et en milieu solide profond à la soytone à 8^o/_{oo} d'agar. Les milieux étaient incubés dans un bain-marie dont la température était réglée à $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$. La température de 55° était prise comme base : toutes nos souches cultivant à cette température. De nouveaux essais étaient réalisés à des températures décroissantes de 2 en 2°C (53-51-49 etc...) ou croissantes de 2 en 2°C (57-59-61 etc...) jusqu'à ce qu'aucune culture ne se manifeste à la fois en milieu liquide et en milieu solide.

Des essais d'adaptation à cultiver à des températures subminimales ont été tentés pour certaines souches. Plusieurs repiquages successifs ayant été réalisés en milieu liquide soytone-cerveille-vert janus à la température minima de croissance, les milieux ensemencés avec cette souche étaient incubés à la

température minima moins 1° entraînée à nouveau à cette température par 5 ou 6 passages successifs pour réaliser un essai identique en abaissant la température de 1°.

7 - LES COURBES DE CROISSANCE ont été obtenues avec l'appareil enregistreur de BONNET, MAURY et JOUAN permettant d'obtenir des températures variant de 37 à 52° utilisant le milieu de base soytone 10 gr., extrait de levures 10 gr., ClNa 5 gr., Chte de cystéine 0,60 gr., eau distillée 1000 ml. pH 7,2 et auquel des quantités variables de glucose étaient ajoutées.

8 - L'ETUDE DE LA LONGEVITE a été réalisée sur différents milieux : Rosenow cystéiné, soytone + épinards en grains + vert janus, soytone-cervelle- vert janus. 48 tubes de chacun de ces milieux ont étéensemencés avec une culture de la souche à étudier. Ils ont été incubés à 55° jusqu'à l'obtention de la phase logarithmique de croissance et ainsi répartis :

12 ont été placés à - 20°C ; 12 à + 4° ; 12 à la température ambiante ; 12 ont été maintenus à + 55°C. Des dénombrements comparatifs ont été effectués à partir d'un tube de chacune des séries à intervalles réguliers s'échelonnant de 5 jours à 6 semaines.

9 - THERMORÉSISTANCE

La résistance des spores à la chaleur peut être déterminée soit à partir des produits naturels soit à partir de cultures en milieu artificiel.

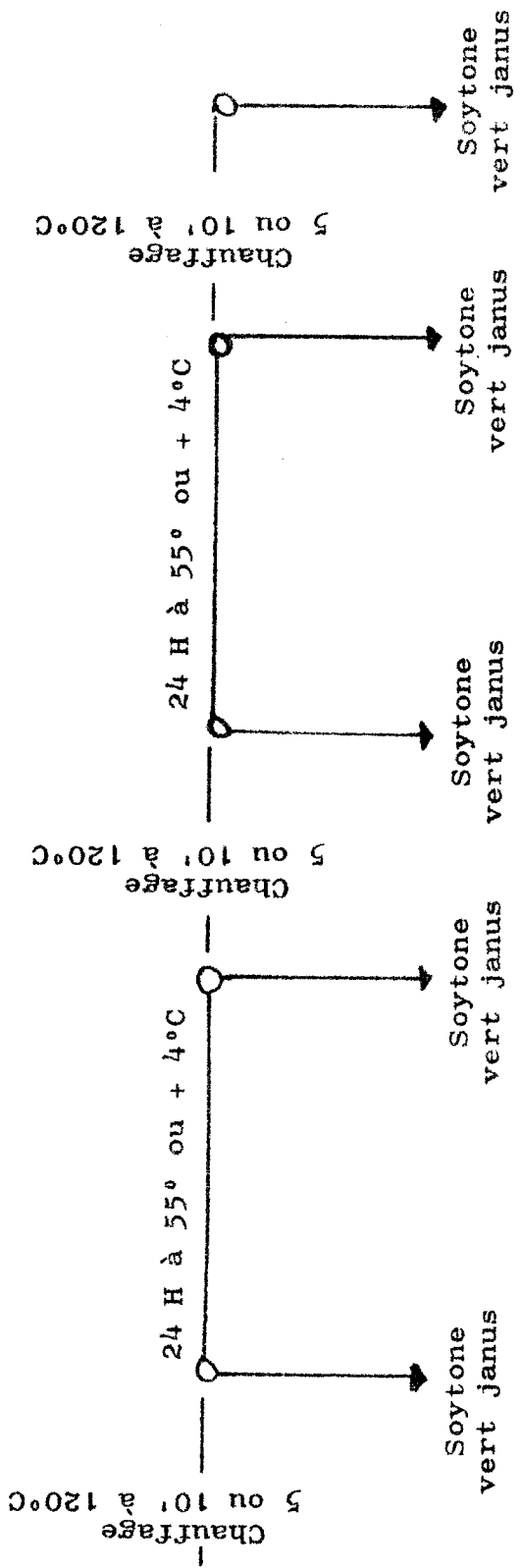
A partir des produits naturels la technique de détermination de la thermorésistance a différé selon les produits considérés.

Les sucres sont mis en solution à 50 % répartie à raison de 10 ml. par tube de 160 x 16. Une série de tubes est placée dans un bain-marie bouillant (100°C) l'autre dans un bain de paraffine chauffé à 120°C. Au cours de ces opérations il est indispensable de compléter le niveau avec de l'eau distillée chaude pour compenser l'évaporation. Les tubes sont sortis à intervalles réguliers, refroidis sous un courant d'eau froide et le contenuensemencé en milieu soytone-cervelle-vert janus à raison de 4 ml., 3ml,2ml par tube. Après avoir recouvert la surface des milieux d'une couche de paraffine, l'incubation est réalisée à 55°. Une opération identique se pratique après chauffage de 10 minutes à 80° pour vérifier la présence de spores.

Les préparations spéciales pour l'enfance sont ainsi traitées : d'une part elles sont mises en suspension au 1/2 dans une solution de tryptone sel (p/v), d'autre part elles sont diluées au 1/3 dans une solution de saccharose à 50 %. La première préparation est chauffée à 100°C; la deuxième est chauffée soit dans un bain de paraffine à 120°C soit dans un autoclave à 120°C. Dans les deux cas le volume est maintenu constant par addition d'eau distillée chaude. Les tubes sont sortis des différents bains à intervalles réguliers, refroidis sous un courant d'eau froide et le contenuensemencé en milieu soytone-cervelle-vert janus ou en milieu soytone gélosé profond pour dénombrer les spores revivifiables.

Dans certains cas nous avons procédé à une tyndallisation selon le schéma (voir page 36).

Les potages déshydratés, extraits de poissons, d'algues ou les farines de bétail ont été mis en suspensions dans une solution de tryptone sel à 50 % ou à 1/3, chauffées au bain-marie à 100° pendant des temps variant de 2 minutes à 150 minutes. Le contrôle de la survie était réalisé par ensemencement de 1 ml., 0,5 ml., 0,1 ml. de ces suspensions en milieu à la soytone et incubation à 55°C.



Les échantillons de terre, de boue, de matières fécales animales ont été mis en suspension dans une solution de saccharose à 50 %, chauffée à 120° pendant des périodes variant de 30 minutes à 3 heures. Après refroidissement ces suspensions étaient ensemencées à raison de 4 ml., 3 ml., 2 ml. en milieu liquide soytone-cerveille-vert janus incubé à 55°.

A partir de spores formées en milieu artificiel, la recherche de la thermorésistance a été pratiquée en introduisant 2 ml. de culture dans une série de tubes de 160 x 16.

Le premier est chauffé 10' à 80°C. Il est utilisé comme témoin de la sporulation ; le deuxième est chauffé 20' à 80° ; le troisième 30' à 80°.

Une opération identique est réalisée à 100°.

Après refroidissement des tubes sous un courant d'eau froide, les ensemencements ont lieu en milieu soytone-cerveille et en milieu soytone profond. Lorsque les spores résistent à la température la plus élevée pendant 30', le temps de chauffage est prolongé jusqu'à 1 H, 2 H, 4 H, 8 H.

10 - ACTION DE DIVERS AGENTS CHIMIQUES SUR LES SPORES

Il était intéressant de déterminer le comportement des spores des Clostridium thermophiles vis à vis des désinfectants utilisés dans l'industrie pour supprimer les bactéries. Nous avons retenu :

Un ammonium quaternaire : le catigène T 80

Le β propiolactone

L'hypochlorite de soude

L'oxyde d'éthylène

Le lactate de tylosine.

CATIGÈNE T 80

Deux activités ont été recherchées : sporicide d'une part, anti-germinative d'autre part.

Action sporicide

Les spores proviennent du milieu le plus favorable à la sporulation pour la souche étudiée.

On introduit 1 ml. de la culture préalablement chauffée 10' à 80° dans une série de 7 tubes de 160 x 16, puis respectivement 1 ml. de solution aqueuse de catigène à 0,2 %, 1 %, 2 %, 4 %, 10 %, 20 % le septième tube recevant 1 ml. d'eau distillée. Ainsi les concentrations de 0,10 %, 0,5 %, 1 %, 2 %, 5 %, 10 % sont réalisées. Après agitation, on laisse en contact pendant 30 mn, 60 mn, 5 heures, 24 heures. Le temps de contact écoulé, on neutralise le catigène en ajoutant 0,5 ml. de jaune d'oeuf dans chacun des tubes, puis on ensemence 10 gouttes des divers mélanges dans un tube de milieu soytone-vert janus. On recouvre d'une couche de paraffine et on incube à 55°.

Action anti-germinative

Le catigène est introduit dans une série de milieux profonds à la soytone à 80/100 d'agar répartis en tubes de 180 x 9 à des concentrations 10 fois plus faibles que celles utilisées pour étudier l'action sporicide. Les milieux sont alors ensemencés avec 2 gouttes d'un milieu contenant des spores, chauffé 5 minutes à 80°C. On incube à 55°. L'observation d'une croissance indique que la concentration n'inhibe pas la germination.

PROPIOLACTONE

La technique d'étude de cet agent est identique à celle utilisée pour le catigène. Cependant l'effet sporicide a été

recherché pour des concentrations de 0,1 - 0,25 - 0,5 - 1 % et l'effet sporostatique aux concentrations de 0,1 %, 0,01 %, 0,002 %, 0,001 %.

HYPOCHLORITE DE SODIUM

Les essais ont été réalisés à partir de produits naturels en particulier les aliments spéciaux pour l'enfance. 10 grammes de produit ont été mis en suspension dans 100 ml. d'eau distillée stérile et laissés en contact pendant 1 heure. Le surnageant est décanté et centrifugé pendant 30 minutes à 5000 tours/mn. Le culot contenant les spores est repris par 10 ml. d'eau distillée. 2 ml. de cette suspension sont introduits respectivement dans 8 tubes de 160 x 16. On ajoute à chacun d'eux une quantité déterminée d'hypochlorite pour obtenir la concentration de 3,3 mg. de HClO par litre. On agite. Après des délais de 5 mn, 10 mn, 15 mn, 30 mn, 1 heure, 2 heures, 3 heures on neutralise le Cl par un excès d'hyposulfite de sodium et on ensemence la totalité dans un milieu soytone-cerveille-vert janus. On incube à 55°.

OXYDE D'ETHYLENE

Sur une bande de papier filtre de 5 x 1 cm, on dépose 10 gouttes de milieu contenant des spores. Les bandes sont mises à sécher dans une boîte de Pétri à 37°. Chacune est introduite dans un sac de polyéthylène fermé avec soin. Il est placé dans un autoclavé à oxyde d'éthylène. La bande de papier est ensuite ensemencée dans un milieu soytone-cerveille-vert janus paraffiné puis incubé à 55°. Une bande de papier préparée dans les mêmes conditions mais non autoclavée sert de témoin.

LACTATE DE TYLOSINE

Le lactate de tylosine étant un antibiotique labile, nous avons pensé que son utilisation pouvait avoir quelque

intérêt pour stériliser certaines conserves contaminées par des Clostridium thermophiles hautement thermorésistants. Nous nous sommes adressés à des préparations spéciales pour l'enfance.

Au préalable nous avons déterminé la dose minima inhibitrice (DMI) du développement des formes végétatives en introduisant l'antibiotique en solution aqueuse dans des tubes de milieu soytone-cerveille-vert janus ensemencé avec la souche à étudier. Les concentrations suivantes ont été adoptées :

1 Mg/ml. - 0,5 Mg/ml. - 0,1 Mg/ml. - 0,05 Mg/ml. - 0,025 Mg/ml.
0,01 Mg/ml. - un tube de milieu sans antibiotique ensemencé dans les mêmes conditions servait de témoin.

Après avoir recouvert la surface des milieux d'une couche de paraffine, ils étaient incubés à 55°. La décoloration du vert janus indique que la culture est positive et par conséquent que le lactate de tylosine ne s'est pas montré actif.

A un échantillon de P S E nous avons alors ajouté 2 DMI de tylosine. Nous l'avons incubé à 55° pendant 3 et 10 jours, afin de provoquer la germination des spores. Des quantités variables progressivement décroissantes de produit étaient alors ensemencées en milieu liquide soytone-cerveille-vert janus pour apprécier la diminution des Clostridium survivants.

11 - TECHNIQUE D'ETUDE DES CARACTERES BIOCHIMIQUES

a) Production de gaz

Elle peut être observée en milieu solide profond à la soytone ou en milieu liquide soytone-cerveille-vert janus.

Dans le premier cas les bulles apparaissent dans la colonne d'agar. Lorsque la production est intense, la colonne est disloquée et fragmentée.

Dans le deuxième cas l'appréciation du dégagement gazeux est difficilement appréciable. Le disque de paraffine, liquéfié à 55°, ne se soulève pas sous la pression des gaz et seule l'observation de bulles remontant du fond du tube au niveau du morceau de cervelle rend compte du pouvoir gazogène.

b) Production de SH₂

Le milieu utilisé a pour formule :

Soytone 10 gr., extrait de levures 10 gr., chlorure de sodium 5 gr., Chte de cystéine 0,60 gr., agar (Difco) 0,50 gr., sulfate ferreux 0,20 gr., hyposulfite de sodium 0,30 gr., eau distillée 1000 ml. Ajuster le pH à 7,2. Répartir à raison de 4,5 ml. par tube de 160 x 16 et stériliser 20 minutes par autoclavage à 120°C. Ce milieu est ensemencé à partir d'une culture en milieu soytone-cervelle-vert janus à raison d'une demi pipette Pasteur par tube et incubé à 55°. L'intensité du noircissement permet d'apprécier la production de SH₂.

c) Réduction des nitrates en nitrites

Soytone 10 gr., extrait de levures 10 gr., chlorure de sodium 5 gr., Chte de cystéine 0,60 gr., agar (Difco) 0,50 gr., glucose 2 gr., nitrate de sodium 5 gr., eau distillée 1000 ml. Ajuster le pH à 7,2. L'ensemencement est réalisé comme précédemment. Après incubation à 55° on ajoute 5 gouttes d'acide sulfanilique à 8‰ dans de l'acide acétique 5 N et 5 gouttes d'une solution d' α naphthylamine à 5 % dans de l'acide acétique 5 N. La présence de nitrite est révélée par une coloration rouge pourpre.

Lorsque la réaction est négative il est indispensable de rechercher si le stade nitrite n'est pas dépassé et si le radical NO_2 n'a pas été transformé en azote. Pour cela il suffit de rechercher les nitrates. Leur présence signifie que la réduction est négative c'est-à-dire que les NO_3 n'ont pas été réduits en NO_2 . L'absence de nitrites et de nitrates indique une utilisation des nitrites formés à partir des nitrates.

On ajoute donc une pincée de poudre de zinc. En présence de NO_3 la coloration rouge se développe, dans le cas contraire aucune coloration ne se produit. Un milieu non ensemencé sert de témoin à la réaction.

d) Réduction des sulfites

Milieu :

Soytone 10 gr., extrait de levures 10 gr., chlorure de sodium 5 gr., Chte de cystéine 0,60 gr., agar (Difco) 10 gr., sulfite de sodium 2,50 gr., eau distillée 1000 ml. Ajuster le pH à 7,2. Répartir à raison de 4,5 ml. par tube de 130 x 9. Stériliser par autoclavage 20 minutes à 120° . Ajouter extemporanément à chaque tube une solution d'alun de fer à 5 ‰ à raison de 2 gouttes par tube. On ensemence à partir d'une culture en milieu soytone-vert janus avec une pipette Pasteur fermée. On incube à 55° . Le noircissement du milieu indique que les sulfites ont été réduits en sulfure.

e) Action sur les substances hydrocarbonées ou sels d'acides organiques.

Hydrates de carbone

Le milieu de base semi-solide à la soytone a été utilisé. il a pour formule : soytone 10 gr., extrait de levures 10 gr.

chlorure de sodium 5 gr., Chte de cystéine 0,60 gr., agar (Difco) 0,50 gr., eau distillée 1000 ml., ajuster le pH à 7,4 - 7,5 et répartir à raison de 4,5 ml. par tube de 180 x 9 ou 9 ml. par tube de 160 x 16. Stériliser à 120°C pendant 20 minutes à l'autoclave. Au moment de l'emploi le milieu est placé dans un bain-marie bouillant pour être régénéré ; on lui ajoute alors 0,5 ml. d'une solution stérilisée par filtration d'hydrate de C à 10 % pour obtenir une concentration finale de 1 %. L'ensemencement est réalisé après refroidissement à 45 °C à partir d'une culture en milieu soytone-cerveille-vert janus en introduisant 0,5ml. approximativement au fond du tube. Un milieu de base ne contenant pas de sucre, ensemencé dans les mêmes conditions sert de témoin. L'incubation à 55°C est prolongée le temps nécessaire à l'obtention d'une culture maxima ; dès lors, le tube de milieu témoin est divisé en deux parties égales. La première est utilisée pour rechercher l'indole par la réaction à l'acide nitrique nitreux. La deuxième est additionnée de 20 gouttes d'indicateur universel pour apprécier le pH. Tous les tubes contenant les milieux sucrés reçoivent en surface le même volume d'indicateur. Une légère agitation permet de le mélanger avec le tiers supérieur de la colonne liquide. Trois teintes peuvent être retenues et interprétées :

verte : pas d'acidification

jaune : faible acidification (a)

orangée ou rouge : forte acidification (A)

Dans tous les cas la teinte de l'indicateur contenu dans les milieux sucrés sera comparée à celle du milieu témoin sans sucre. L'abondance de la culture est indiquée par + à +++.

Les hydrates de C. suivants ont été retenus : glucose, saccharose, lactose, mannitol, glycérol, salicine, amidon, L + arabinose, D + xylose.

Sels d'acides organiques

D tartrate de calcium, lactate de calcium, citrate de calcium ont été ajoutés au milieu de base ajusté à pH 6,6 pour obtenir une concentration finale de 5 ‰. Un milieu ajusté à un pH identique ne contenant pas de sels sert de témoin. L'utilisation des substrats est appréciée par acidification décelée par l'indicateur universel.

f) Détermination des acides volatils

Les acides volatils ont été déterminés par la technique de GUILLAUME, BEERENS et OSTEUX (10) à partir de cultures en milieu à la soytone de formule : soytone 10 gr., extrait de levures 10 gr., glucose 1 gr., chlorure de sodium 5 gr., cystéine (Chte) 0,60 gr., eau distillée 1000 ml., pH 7,2.

g) Action sur la gélatine

Nous avons adopté la méthode de KOHN (12) adaptée à la technique anaérobie et décrite par BEERENS et TAYON CASTEL (3) où le milieu de Rosenov est remplacé par le milieu soytone-cerveille-vert janus. L'incubation est réalisée à 55°C et la lecture effectuée au 12ème jour. Après ce délai, en effet, on assiste à une liquéfaction spontanée du disque de gélatine en raison de la température d'incubation élevée.

h) Recherche de l'indole

La mise en évidence de l'indole se pratique sur les

cultures obtenues dans le milieu de base à la soytone décrit précédemment (f). La technique à l'acide nitrique nitreux est la seule utilisable en raison de l'abaissement considérable du pH au cours du développement microbien.

i) Action sur le lait cystéiné

A 1000 ml. de lait écrémé on ajoute 0,8 gr. de Chte de cystéine. Le pH est ajusté à 7,3 - 7,4 ; on répartit à raison de 12 ml. par tube de 160 x 16 et on stérilise 30 minutes à 110°C. L'ensemencement est effectué, après régénération et refroidissement, avec une pipette Pasteur d'une culture en milieu soytone-cerveille-vert janus. On incube à 55°C pendant 8 à 12 jours. Après avoir observé les modifications on ajoute 10 gouttes d'indicateur universel pour apprécier le pH.

j) Recherche du pouvoir cellulolytique

L'activité cellulolytique a été recherchée sur le papier filtre. Des bandelettes de 3 x 0,5 cm ont été stérilisées séparément par autoclavage. Au moment de l'emploi l'une d'elle était introduite dans un tube de milieu soytone-cerveille-vert janus, ensemencée à partir d'une culture sur un milieu identique paraffiné puis incubé à 55° pendant 30 jours.

12 - RECHERCHE DU POUVOIR PATHOGENE EXPERIMENTAL

Le pouvoir pathogène des différentes espèces isolées a été recherché en inoculant par voie intrapéritonéale à la souris 0,5 ml. d'une culture en milieu soytone-cerveille-vert janus et par voie sous-cutanée au cobaye 1 ml. de cette même culture.

Les animaux étaient observés pendant 1 mois puis sacrifiés et autopsiés.

En outre, les préparations spéciales pour l'enfance contenant des Clostridium thermophiles ont été administrées comme aliment à des souris blanches pendant 3 jours.

CH A P I T R E III

RESULTATS

-:-

Dans le double dessein d'obtenir une gamme étendue d'espèces et de vérifier secondairement le caractère ubiquitaire de certaines d'entre elles, nous nous sommes efforcés de varier la nature des échantillons susceptibles d'héberger les bactéries thermophiles.

Quelques souches proviennent de prélèvements d'origine humaine, animale ou végétale, la majorité, cependant, a été obtenue à partir de produits alimentaires de consommation courante : sucre, conserves d'épinards, aliments pour l'enfance, potages ; quelques unes proviennent de mélasses, de farine de riz. D'autres, enfin, ont été isolées à partir du sol : terre de bruyère, terre de jardin, terre de champs cultivés ou à partir de boue primaire conditionnée. Cent une souches de Clostridium thermophiles ont été isolées. Les origines sont représentées dans le tableau V.

Les caractères envisagés dans le chapitre précédent ont permis d'établir trois groupes distincts :

Le groupe I comporte 19 souches identifiées à Cl. thermoaceticum.

Le groupe II comporte 64 souches identifiées à Cl. thermosaccharolyticum.

Le groupe III comporte 18 souches dont aucune n'a été identifiée à une espèce connue ; nous l'avons subdivisé en 9 sous-groupes.

| Origine | Nombre de souches isolées | Désignation des souches |
|---|---------------------------|--|
| Sucre | 63 | 10 - 11 - 15 à 18 - 21 à 23 - 26-27-29-30-33-37-39-40-44-46-47-48 S - 48 SPS - 49 S - 50 SPS - 50 S - 51 S - 51 SPS - 52 SPS R - 52 SPS D - 53 - 53 B - 54 - 55 AS - 55 B SPS - 56 A - 56 B - 57 - 57 SPS D - 58 - 58 A - 69 - 70 SPS - 71 S - 71 A - 71 B - 87-92 - 93-94-95-97-98- 99 A - 99 B - 100-101-105-106-107A-107B-108-109-110 |
| Poudre d'algues | 1 | 2 |
| Mélasse | 2 | 112 A - 112 B |
| Potage | 2 | 1 - 3 |
| Extrait de cachalot | 1 | 4 |
| Extrait de baleine | 1 | 5 |
| Farine de bétail | 1 | 6 |
| Epinards en conserves | 4 | 9 - 14 - 19 - 24 |
| Préparations spéciales pour l'enfance (PSE) | 8 | 59 - 61 - 64 - 65 - 66 - 67 - 72 A - 73 A |
| Selle humaine | 1 | 74 |
| Jambon en boîte | 2 | 81 A - 81 B |
| Boue primaire conditionnée | 4 | 113 A - 113 B - 113 C - 113 D |
| Fécès de cobaye | 1 | 115 |
| Fécès de poule | 1 | 116 |
| Fumier de cheval | 1 | 117 |
| Terre | 8 | 118 A - 118 B - 119 - 119 A - 120 - 120 A - 121 - 121 A |

Origine des 101 souches étudiées

TABLEAU V



GROUPE I - CLOSTRIDIUM THERMOACETICUM - 19 souches

ORIGINE ET DESIGNATION DES SOUCHES

L'origine des souches est très variée. La plupart ont été isolées de conserves de végétaux :

| <u>Désignation des souches</u> | <u>Provenance</u> |
|--------------------------------|--|
| 9 - 14 - 19 - 24 - 67 | Conserves dépinards |
| 61 - 65 - 72 A | PSE poulet-légumes (carottes pomme de terre, poireau, ami- don de maïs, sel, sucre). |
| 66 - 73 A - 64 | PSE veau jardinière (pomme de terre, carottes, pois, oi- gnon, farine de maïs, sel, sucre) |
| 59 | Farine de riz |
| 58 A | Sucre |
| 113 D | Boue primaire conditionnée |
| 118 B | Terre de jardin |
| 119 | Terre de bruyère |
| 120 | Terre prélevée à Anvers |
| 121 | Terre de la région du Nord |
| 74 | Matières fécales humaines |

La technique d'isolement de cette espèce a été décrite lorsque nous avons envisagé l'examen des PSE page 35.

Nous pouvons cependant souligner que la forte thermorésistance des spores facilite l'isolement. La plupart des spores résistent en effet à l'autoclavage et il suffit ainsi de chauffer le produit en suspension dans une solution saccharosée à 50 % stérile pendant 80 minutes dans un bain de paraffine à 120° pour éliminer les spores de la plupart

des autres espèces présentes. On l'ensemence dans un milieu liquide soytone-cerveille-vert janus, on incube à 55° pendant 2 à 3 jours et on obtient une culture pure.

CARACTERES CULTURAUX

Le milieu soytone-cerveille, le milieu de Rosenow sont les plus satisfaisants. La croissance cependant est lente ; à partir des produits naturels elle se manifeste souvent après 10 jours d'incubation à 55° ; à partir des souches de collection, la période de latence atteint encore 48 heures. Aussi avons nous tenté d'améliorer la qualité du milieu soytone-cerveille profond à 7‰ d'agar en remplaçant l'eau distillée du milieu par un extrait de conserves d'épinards obtenu ainsi :

- des épinards de conserve sont mis en suspension à raison d'une partie pour dix d'eau distillée. La préparation est stérilisée par autoclavage de dix minutes à 120° puis filtrée sur papier. Le liquide obtenu est utilisé comme solvant des produits constituant le milieu à la soytone ou à la soytone-cerveille précédemment décrit.

Les essais ont été réalisés avec 9 souches de collection cultivées en milieu soytone-cerveille diluées dans la solution tryptone sel. 0,5 ml. de chacune de ces dilutions était ensemencé dans un tube de milieu soytone témoin sans épinards et de milieu soytone à l'extrait d'épinards additionné de 7 ‰ d'agar répartis en tubes de 180 x 9. Les résultats sont consignés dans le tableau VI.

Le jus d'épinards favorise la croissance puisque à la dilution 10^{-8} on décèle encore des colonies pour 6 souches

| Souches | Milieu à la soytone témoin | | | | | | | Milieu à la soytone additionné de jus d'épinards | | | | | | | | | |
|---------|----------------------------|-----|-----------|---|---|-------|-------|--|-------|-------|-----|-----------|---|---|-------|-------|-------|
| | - 4 - | 5 - | Dilutions | | | - 6 - | - 7 - | - 8 - | - 9 - | - 4 - | 5 - | Dilutions | | | - 6 - | - 7 - | - 8 - |
| 9 | | | 18 | - | - | - | | | | | ∞ | 15 | 2 | - | | | |
| 14 | | | ∞ | 4 | - | - | | | | | ∞ | 12 | 1 | - | | | |
| 19 | | | 10 | - | - | - | | | | | 32 | 3 | - | - | | | |
| 24 | | | ∞ | 9 | - | - | | | | | ∞ | 29 | 1 | - | | | |
| 59 | | | 75 | 9 | - | - | | | | | ∞ | 25 | 2 | - | | | |
| 60 | | | 25 | 1 | - | - | | | | | 8 | - | 1 | - | | | |
| 61 | 26 | | 1 | - | - | - | | | | | 25 | 7 | - | - | | | |
| 64 | | | | 8 | 1 | - | | | | | ∞ | 25 | 1 | - | | | |
| 67 | 25 | - | - | - | - | - | | | | 65 | 6 | - | - | - | - | | |

LILLE
 Comparaison de la croissance entre les milieux liquides soytone-cerveille et extrait d'épinards
 Soytone-cerveille en milieu à 7‰ d'agar répartis en tubes de 180 x 9.
 Les chiffres indiquent le nombre de colonies.
 ∞ = colonies confluentes.

TABLEAU VI

sur 9 alors que dans le milieu témoin une seule souche donne une colonie à cette dilution. A la dilution 10^{-7} le nombre de colonies est toujours supérieur dans le milieu à l'épinard à celui du milieu témoin.

Milieux liquides - Dans le milieu soytone-cerveille-épinards la croissance apparaît entre 24 et 72 heures suivant l'importance de l'inoculum.

Température de croissance :

La détermination a été effectuée en milieux à la soytone solide et à la soytone-cerveille liquide, incubés au bain-marie à différentes températures. Parmi 14 souches testées :

- 7 ont une température minima de croissance de 49°C et maxima de 69°C .
- 7 ont une température minima de croissance de 49°C et maxima de 63°C .

Il s'agit donc d'une espèce thermophile stricte.

Morphologie :

Dans les conserves alimentaires où l'enrichissement a été obtenu par incubation de 10 jours à 55° , deux aspects morphologiques peuvent être observés. Il peut s'agir soit d'un bâtonnet à Gram + de $3 \text{ à } 4 \mu \times 1 \mu$ isolé ou en diplobacille, soit d'un mélange de bâtonnets de $3 \text{ à } 4 \mu$ présentant une spore terminale et de bâtonnets sans spores. Ces derniers sont toujours plus abondants que les formes sporulées.

Dans les milieux artificiels, la morphologie est identique, la sporulation est exceptionnelle.

Sporulation :

Aucun milieu particulier ne favorise l'apparition des spores. Une seule fois les souches 59 et 65 ont donné des spores en milieu de Rosenow, elles n'en ont plus produites au cours des subcultures. Des milieux à la soytone additionnés de sulfate de Mn, de Mg, d' NH_4 seuls ou associés, des milieux à l'épinard ou à la terre, le milieu DRCM n'ont pas été plus favorables. Une seule fois le milieu à l'épinard additionné des sulfates de Mn, Mg et NH_4 a permis la sporulation de la souche 72 A. Les subcultures ne présentaient plus de spores.

Thermorésistance :

à 100° : Les essais ont été réalisés avec les préparations spéciales pour l'enfance incubées 10 jours à 55°, diluées dans une solution de tryptone sel (tryptone 1 gr., ClNa 8 gr., eau distillée 1000 ml.). Le chauffage a été effectué au bain-marie bouillant pendant une durée variant de 10 minutes à 8 heures. Les contrôles de survie ont été obtenus par ensemencement en milieu liquide à la soytone-cerveille et en milieu à la soytone en profondeur. Les résultats sont exprimés dans le tableau VII. Aucune diminution du nombre des spores n'est enregistrée après chauffage de 8 heures à 100°.

à 120° : Divers essais ont été réalisés avec les préparations spéciales pour l'enfance. 3 gr. environ d'aliment ont été ajoutés à 6 ml. d'une solution de saccharose à 50 % et le chauffage effectué dans un bain de paraffine à 120°. Après une heure, le volume était reconstitué par addition d'eau distillée.

| Souches | Temps de chauffage en heures | | | | | | | | |
|---------|------------------------------|---------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|
| | 0 H 10 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| 65 | 4 col. | 4 col. | 4 col. | 4 col. | 3 col. | 3 col. | 3 col. | 3 col. | 3 col. |
| 66 | 4 col. | 4 col. | 4 col. | 4 col. | 3 col. | 4 col. | 4 col. | 3 col. | 3 col. |
| 72 A | 30 col. | 30 col. | | | | | | | 28 col. |
| 73 A | 50 col. | 50 col. | | | | | | | 55 col. |

Thermorésistance des spores de Cl. thermoaceticum à 100°C



TABLEAU VII

Après les différents temps adoptés pour le contrôle de la survie des spores, 1 ml. du mélange a été ensemencé d'une part en milieu profond à la soytone et 2 ml. en milieu liquide soytone-cervelle. Les résultats sont rapportés dans le tableau VIII. Dans ces conditions, les spores des souches 65,66 et 73 A résistent à 120°. La souche 72 A résiste deux heures à cette température, elle est détruite en 2 H15, mais une réduction du nombre des spores est apparue après une heure de chauffage.

Des essais comparatifs ont été réalisés en soumettant les spores de la souche 72 A à l'autoclavage à 120°. Les résultats furent légèrement différents, elles n'ont résisté qu'1 H15 dans ces conditions.

Les spores de la souche 72 A formées en milieu artificiel aux épinards et testées en solution saccharosée résistent aussi 2 heures à 120° dans le bain de paraffine.

Effet de tyndallisation :

2 ml. de préparation spéciale pour l'enfance contenant des formes sporulées ont été mélangés à 6 ml. de solution de saccharose à 50 % et le chauffage effectué dans un bain de paraffine à 120°. La survie des spores a été contrôlée par ensemencement de 2 ml. dans un milieu soytone-cervelle. Le protocole de l'expérimentation est schématisé ainsi :

1er essai

1er chauffage 5' 120° culture +
incubation à 55° 24 heures
contrôle de survie = +

| Souches | Temps de chauffage en minutes | | | | | | | | | |
|---------|-------------------------------|--------|--------|--------|--------|----|-----|-----|--|--|
| | 5 | 10 | 15 | 30 | 60 | 80 | 100 | 120 | | |
| 65 | + | + | + | + | + | - | - | - | | |
| | 6 col. | 5 col. | 5 col. | 5 col. | 5 col. | - | - | - | | |
| 66 | + | + | + | + | + | - | - | - | | |
| | 4 col. | 2 col. | 2 col. | 2 col. | 2 col. | - | - | - | | |
| 72 A | + | + | + | + | + | + | + | + | | |
| | 4 col. | 3 col. | 3 col. | 3 col. | 3 col. | - | - | - | | |
| 73 A | + | + | + | + | + | - | - | - | | |

soytone-cervelle liquide
soytone profond
Col. = colonies

Thermorésistance des spores de Cl. thermoaceticum à 120°C
en fonction du temps de chauffage

TABLEAU VIII

2ème chauffage 5' 120° culture +
incubation à 55° 24 heures
contrôle de survie = +

3ème chauffage 5' 120° culture -

2ème essai

1er chauffage 10' 120° culture +
incubation à 55° 24 heures
contrôle de survie = +

2ème chauffage 10' 120° culture -

1er chauffage 10' 120° culture +
incubation à 4° 24 heures
contrôle de survie = +

2ème chauffage 10' 120° culture +
incubation à 4° 24 heures
contrôle de survie = +

3ème chauffage 10' 120° culture +

Ainsi 3 expositions de 5' à 120° à 24 H d'intervalle entre chaque opération sont nécessaires pour tuer les spores de C1. thermoaceticum à condition d'incuber le produit à 55° après chauffage.

2 expositions de 10' à 120° à 24 H d'intervalle entre les deux opérations suffisent à tuer les spores à la condition d'incuber le produit à 55° après le 1er chauffage.

Lorsque dans les mêmes conditions on incube à 4° au lieu de 55 entre deux chauffages, les spores survivent. Ce résultat laisse présumer que le chauffage agit sur les formes végétatives issues des spores ayant germées à 55° et non sur les spores elles-mêmes.

Longévité des formes végétatives :

Le nombre restreint de spores contenues dans les cultures en milieux liquides permet de les éliminer par dilution. C'est ainsi que les dilutions à 10^{-4} des cultures en milieu de Rosenow ou à la soytone-cervelle ne contiennent que des formes végétatives. Il était donc possible d'étudier la longévité des bactéries en ensemençant en milieu profond à la soytone des dilutions à 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} de cultures conservées 9 jours et 28 jours à la température ambiante et de dénombrer ainsi les bactéries revivifiables. Cette expérience a été réalisée avec 3 milieux différents : Rosenow, soytone-cervelle-épinards, soytone-cervelle. Les résultats sont consignés dans le tableau IX.

Ils démontrent une longévité variable selon les souches et les milieux utilisés ; il ressort cependant que le milieu soytone-cervelle convient dans la majorité des cas.

ACTION DES ANTISEPTIQUES ET DU LACTATE DE TYLOSINE SUR LES SPORES :

La β propiolactone à la concentration de 0,25 % stérilise en 30 minutes les spores de la souche 72 A contenue dans la préparation légumes-poulet.

Le catigène T 80 détruit les spores de la même souche après 18 heures de contact à la concentration de 0,10 %, après 10 heures avec 0,50 % et après 5 heures avec 1 %. La recherche de la survie a été réalisée par ensemencement du produit en milieu soytone-cervelle additionné de lécithine.

| | Rosenow | Soytone-cervelle épinards | Soytone-cervelle |
|------|--|------------------------------|-------------------------|
| 66 | 9 jours - 4 - 5 - 6 - 7 - - - - - + + 170 | - 4 - 5 - 6 - 7 + + 170 | - 4 - 5 - 6 - 7 14 4 |
| | 28 jours - - - - - | - - - - - | 6 1 - |
| 65 | 9 jours 10 3 - - | 8 3 1 1 | 25 1 - |
| | 28 jours 31 5 - - | - - - - - | 6 1 - - |
| 72 A | 9 jours ∞ ∞ ∞ 200 | 60 9 1 - | 13 3 1 |
| | 28 jours 39 3 - - | 3 - - - - | - - - - - |
| 58 A | 9 jours ∞ 45 | 55 - - - - | 95 |
| | 28 jours ∞ ∞ 100 | ∞ ∞ ∞ 30 | ∞ ∞ 35 |

Les chiffres indiquent le nombre de colonies à la dilution envisagée correspondant au nombre de bactéries revivifiables.

∞ = colonies impossible à dénombrer
- = pas de culture

Longévité des formes végétatives de 4 souches cultivées dans 3 milieux liquides



L'oxyde d'éthylène détruit les spores de la souche 72 A en 1 heure 30. Les essais ont été effectués en déposant une culture sporulée sur une languette de papier filtre séchée et introduite dans un appareil à stérilisation commercial.

La tylosine inhibe la croissance des formes végétatives de la souche 72 A à la concentration de 0,025 μ g par ml. de milieu soytone-cerveille-vert janus.

L'antibiotique ajouté à la dose de 2 DMI à une préparation spéciale pour l'enfance aux légumes-poulet contenant la souche 72 A a permis de réduire le nombre de Clostridium de 10 fois après incubation de 10 jours à 55° comme l'indique le tableau X.

CARACTÈRES BIOCHIMIQUES

Les 19 souches présentent les caractères suivants :

Mobilité : +

Gaz : -

Odeur : acétique légère

Gélatine non liquéfiée

Lait non modifié

SH₂ : +

Indole : -

Nitrates : réduits en nitrites

Sulfites : non réduits

Glucose : + (pH 3,07)

Xylose : + (14 souches), - (5 souches)

Saccharose, lactose - mannitol, glycérol,

salicine, amidon, arabinose, cellulose :

non fermentés.

Type fermentaire : acides volatils : acétique.

| PSE légumes-poulet (souche 72 A) + Lactate de tylosine 0,05 ^M g/g (2 DMI) | PSE légumes-poulet (souche 72 A) sans lactate de tylosine (témoins) | | | | |
|--|--|---|------|------|------|
| Quantité de PSE en grammeensemencée dans 15 ml. de milieu soytone-cervelle- vert janus : | 2 | 1 | 0,50 | 0,25 | 0,10 |
| Incubation 3 jours à 55°C | + | + | | | |
| Incubation 10 jours à 55°C | + | + | + | + | + |

Action du lactate de tylosine sur la souche
72 A dans une PSE légumes-poulet

TABLEAU X



POUVOIR PATHOGENE

Il est nul pour le cobaye (voie sous-cutanée) et la souris (voie intrapéritonéale) après inoculation de cultures en milieu à la soytone-cervelle. En outre, les souris nourries avec les préparations spéciales pour l'enfance n'ont présenté aucun symptôme anormal.

DISCUSSION

Le problème consiste à discuter de la présence de C1. thermoaceticum dans les conserves. L'origine tellurique de cette espèce explique sa fréquence dans les conserves de légumes. Les procédés classiques d'appertisation ne sont certes jamais suffisants pour détruire les spores. Il faut donc pour s'en préserver éviter leur présence dans les aliments ; pour cela, une désinfection préalable des végétaux semble le seul procédé efficace. Un autre remède consisterait à ajouter de la tylosine à la concentration de 0,2^µg par gramme, par exemple.

L'altération des conserves infectées par C1. thermoaceticum est peu apparente ; la souche n'est pas gazogène et peu glucidolytique. L'odeur n'est pas modifiée. Les flacons dans lesquels nous l'avons mise en évidence accusaient un vide compris entre 220 mm de Hg et 400 mm de Hg avec une moyenne située entre 320 et 340 mm de Hg (normale = 400) ; le pH le plus bas enregistré a été de 4,2 et le plus élevé 5,7. Aucune relation n'existant entre ces constantes et le nombre de bactéries observées à l'examen microscopique direct après incubation à 55° pendant 10 jours. L'enrichissement par ce procédé est d'ailleurs variable et, dans certains cas, seules les cultures sont capables de déceler les bactéries, l'examen microscopique direct demeurant négatif.

Dans d'autres cas, les éléments microbiens sont très nombreux mais l'acidité ou la diminution du vide ne sont pas obligatoirement les témoins d'une présence massive du Clostridium.

Ces observations nous obligent à considérer un problème d'ordre plus général : celui de la stérilité des conserves alimentaires. Il ne fait aucun doute que de nombreux lots de conserves de légumes ne peuvent être obtenues stériles en raison de la thermorésistance élevée de certaines spores hébergées par les plantes. Lorsque ces espèces altèrent le produit ou sont nuisibles à la santé publique elles sont intolérables et les préparations les hébergeant doivent être refusées. Dans le cas contraire c'est-à-dire lorsque les produits renferment des spores incapables de germer à la température ambiante et lorsque même une multiplication des formes végétatives se produisant aucune altération du goût, de la couleur, de l'odeur et de la consistance du produit n'est constatée, il est tolérable de soumettre la conserve à la consommation. Le problème de la stérilité commerciale ou biologique se trouve une fois de plus évoqué.

GRUPE II - CLOSTRIDIUM THERMOSACCHAROLYTICUM : 64 souches

ORIGINE ET DESIGNATION DES SOUCHES

La plupart des souches isolées proviennent d'échantillons de sucre cristallisé comme en témoigne le tableau XI.

| Nature des échantillons examinés | Nombre d'échantillons examinés | Nombre de souches isolées |
|----------------------------------|--------------------------------|---------------------------|
| Sucre | 50 | 62 |
| Poudre d'algues | 1 | 1 |
| Mélasses | 1 | 1 |

Origine des 64 souches de Clostridium thermosaccharolyticum

TABLEAU XI

La technique d'isolement a été décrite précédemment. Les résultats des dénombrements de spores réalisés à partir des différents échantillons examinés sont les suivants :

| Nombre de spores dans un gr. de sucre | Nombre d'échantillons |
|---------------------------------------|-----------------------|
| 30 | 4 |
| 16 | 8 |
| 14 | 8 |
| 12 | 6 |
| 8 | 8 |
| 6 | 10 |
| 4 | 12 |

1 gr. de mélasse contenait 60 sp./gr.

1 gr. de poudre d'algues contenait 2000 sp./gr.

CARACTERES CULTURAUX ET MORPHOLOGIE

En milieu soytone liquide la croissance est rapide. La phase logarithmique est courte (4 heures), la production de gaz très abondante. Le trouble est homogène.

En profondeur les cultures sont anaérobies strictes.

Les colonies en milieu à la soytone à 7°/100 d'agar sont de deux types souvent observées dans un même tube pour une même souche. Il s'agit de colonies lenticulaires ou irrégulières translucides ou opaques atteignant 1 à 1,5 mm de diamètre. Toutefois la forme de ces colonies est difficile à constater en raison de l'éclatement précoce de la colonie provoqué par les gaz disloquant la colonne d'agar.

Les colonies de surface obtenues sur milieu à la soytone ont été observées à la loupe binoculaire à un grossissement de 20 diamètres en éclairage oblique. Ainsi 17 variétés de colonies ont été dénombrées. Elles sont décrites et schématisées dans la figure 1 et classées en fonction de la morphologie des bactéries correspondantes.

Ainsi deux groupes principaux ont été constitués. Le premier comprend les bactéries présentant l'aspect d'un Lactobacille en l'absence de toute forme sporulée apparente. La deuxième correspond à des formes sporulées. Il s'agit de bâtonnets identiques à ceux du premier groupe présentant des spores rondes, terminales. Enfin, un troisième groupe constitué par une seule souche (48 S) ; elle se présente en bâtonnet large droit ou incurvé souvent cloisonné. Toutes sont mobiles par cils péritriches.

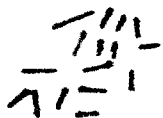
Aspect des colonies de Clostridium thermosaccharolyticum

FIGURE I

1) Type non sporulé



Bombée, contour régulier,
centre opaque blanc,
périphérie translucide.



Contour régulier,
centre opaque,
périphérie légèrement R.



Contour irrégulier,
granuleuse plate,
reflet bleu verdâtre.



Translucide,
centre opaque,
contour irrégulier.



Granuleuse,
opaque au centre,
irrégulière.



Transparente,
excentrique blanc
opaque.



Périphérie granuleuse, opaque,
reflet blanc ou rosé, centre opaque lisse,
contour régulier.



Très petites, transparentes,
1/4 à 1/2 mm de diamètre.



Irrégulière, plate centre légèrement
opaque, contour plus transparent,
grosses granulations blanches.



Blanche, opaque, plate,
rugueuse, contour irrégulier
3 mm de diamètre.



Translucide, rugueuse,
plate, contour irrégulier.



2) Type sporulé



Granuleuse, bleu verdâtre, contour plus ou moins régulier.



Granuleuse, bleu verdâtre, contour plus ou moins régulier mais plus découpé.



Granuleuse, contour irrégulier.



Contour irrégulier, granuleuse, reflet bleu verdâtre, 1 mm de diamètre.

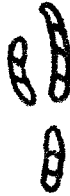


C. régulier



Centre opaque blanc, mamelonnée, périphérie translucide légèrement muqueuse, partiellement R.
2 à 3 mm de diamètre.

3) Forme anormale



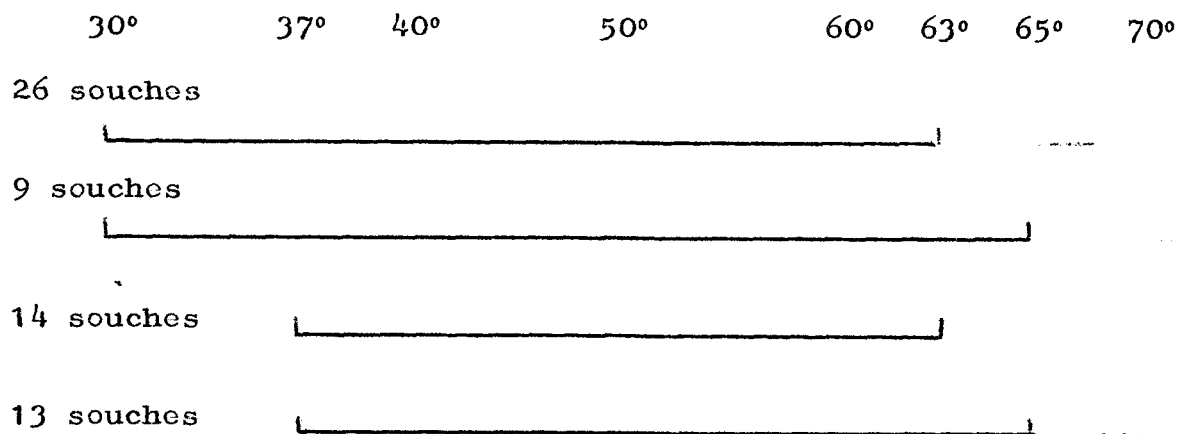
Translucide, centre opaque blanc, contour irrégulier.



Les techniques d'isolement de cette espèce sont rapportées dans le chapitre II. Nous insisterons toutefois sur la fréquence toute particulière des Bacillus thermophiles dans le sucre. En l'absence de milieu sélectif l'isolement des Clostridium eut été impossible.

Température de croissance

Les températures s'échelonnent entre 30 et 65°C comme l'indique la figure II. Toutes les souches cultivent à des températures inférieures à 40°C.



Températures limites de croissance des souches de Cl. thermosaccharolyticum

FIGURE II

Il s'agit donc d'une espèce thermotrophe.

Etude des courbes de croissance en milieu soytone liquide en fonction de la température d'incubation et de la concentration en glucose

Cette espèce se prêtait tout particulièrement à une telle étude en raison des facilités de culture. Nous avons choisi la souche 52 SPSR.

Nous avons réalisé :

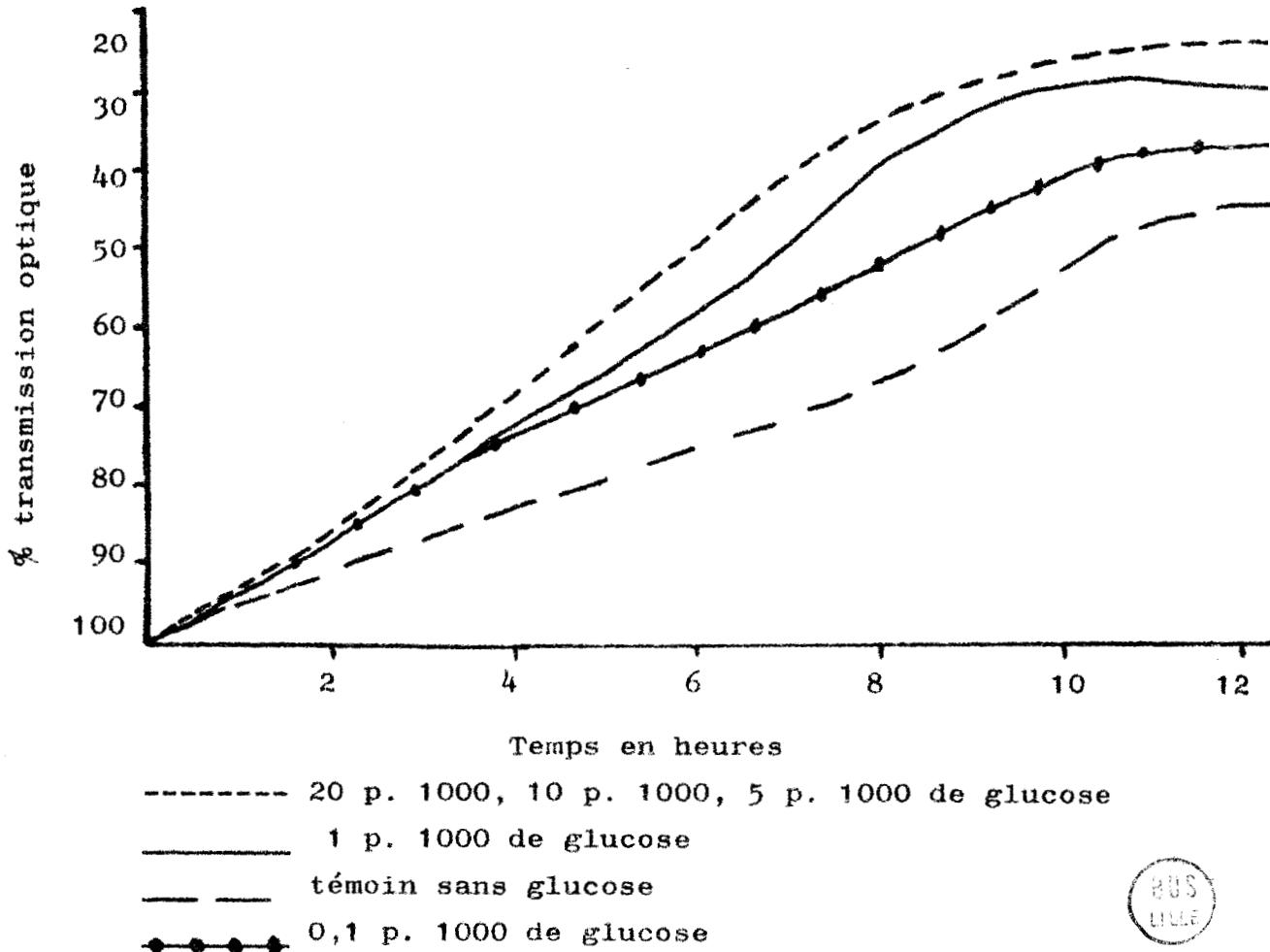
- 1°) l'étude de la croissance à 37° aux concentrations de 0,10 - 1 - 5 - 10 - 20 pour 1000 de glucose
- 2°) l'étude de la croissance à 52° aux concentrations de 0,10 - 1 - 5 - 10 - 20 pour 1000 de glucose.

L'examen des courbes autorise les commentaires suivants :

Le glucose possède une action stimulatrice quelle que soit la concentration et la température d'incubation (figures III et IV).

A 37° (figure III) l'action la plus favorable s'observe pour les concentrations de 5 - 10 - 20 pour 1000 : aucune différence sensible ne se manifeste entre elles. Toutes trois sont plus favorables que la concentration de 1‰ et cette dernière l'est davantage que 0,1‰. La concentration optimale se situe donc entre 1 et 5 pour 1000. La phase logarithmique de croissance s'étale sur 10 heures.

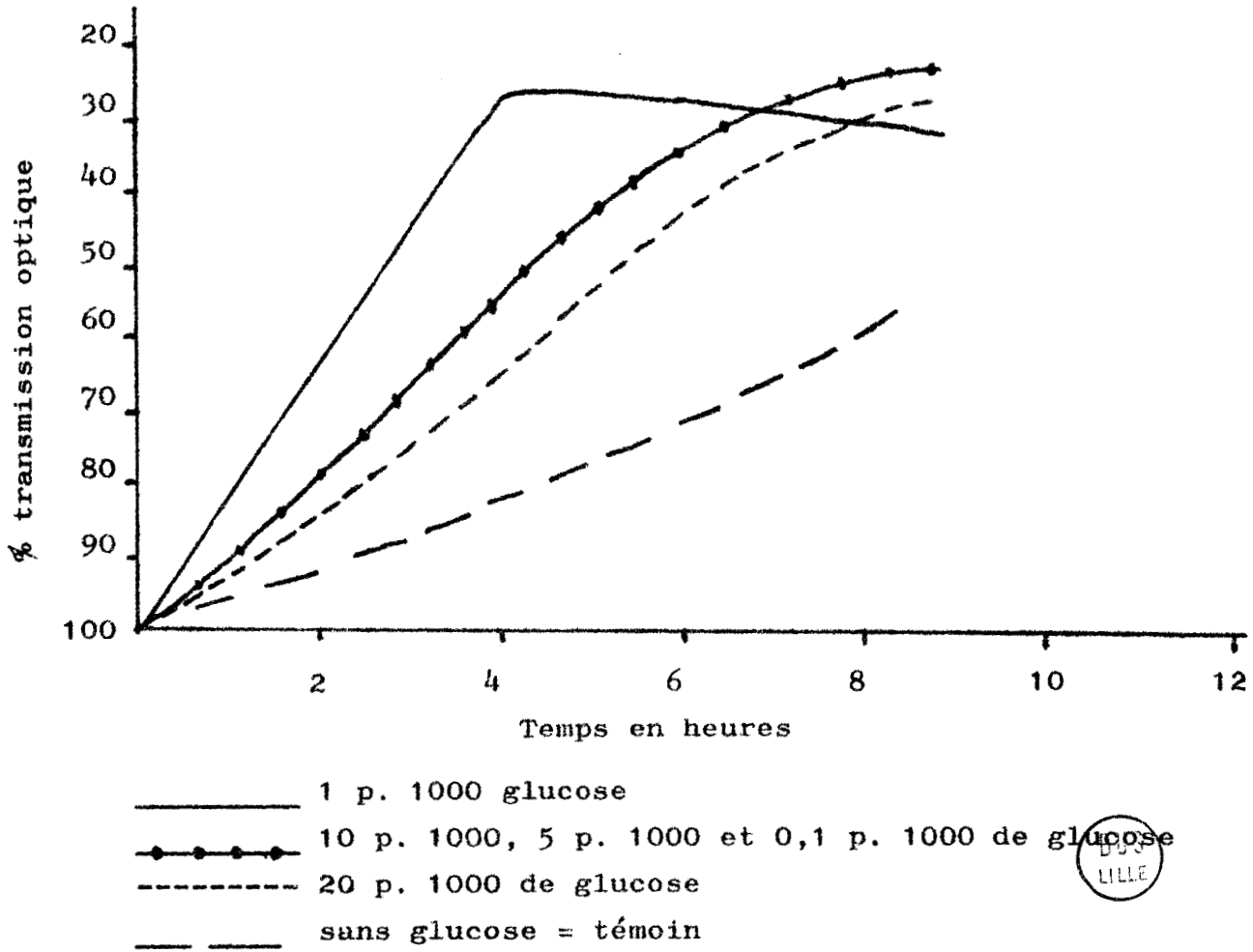
A 52° (figure IV) on assiste à une modification profonde des résultats. La concentration optimale en glucose devient 1‰. La phase logarithmique de croissance est de 4 heures et rapidement la densité optique diminue indiquant un début d'autolyse bien connu chez les thermophiles. Il s'agit de la température optimale de développement car aucune inflexion de la courbe n'est observée dans les premières heures comme c'est le cas à 37°. Les concentrations de 10 - 5 - 0,1‰ donnent des résultats superposables plus satisfaisants que ceux obtenus à la concentration de 20‰ qui semble inhibitrice.



Concentrations variables en glucose - Croissance à 37°

FIGURE III





Concentrations variables en glucose - Croissance à 52°

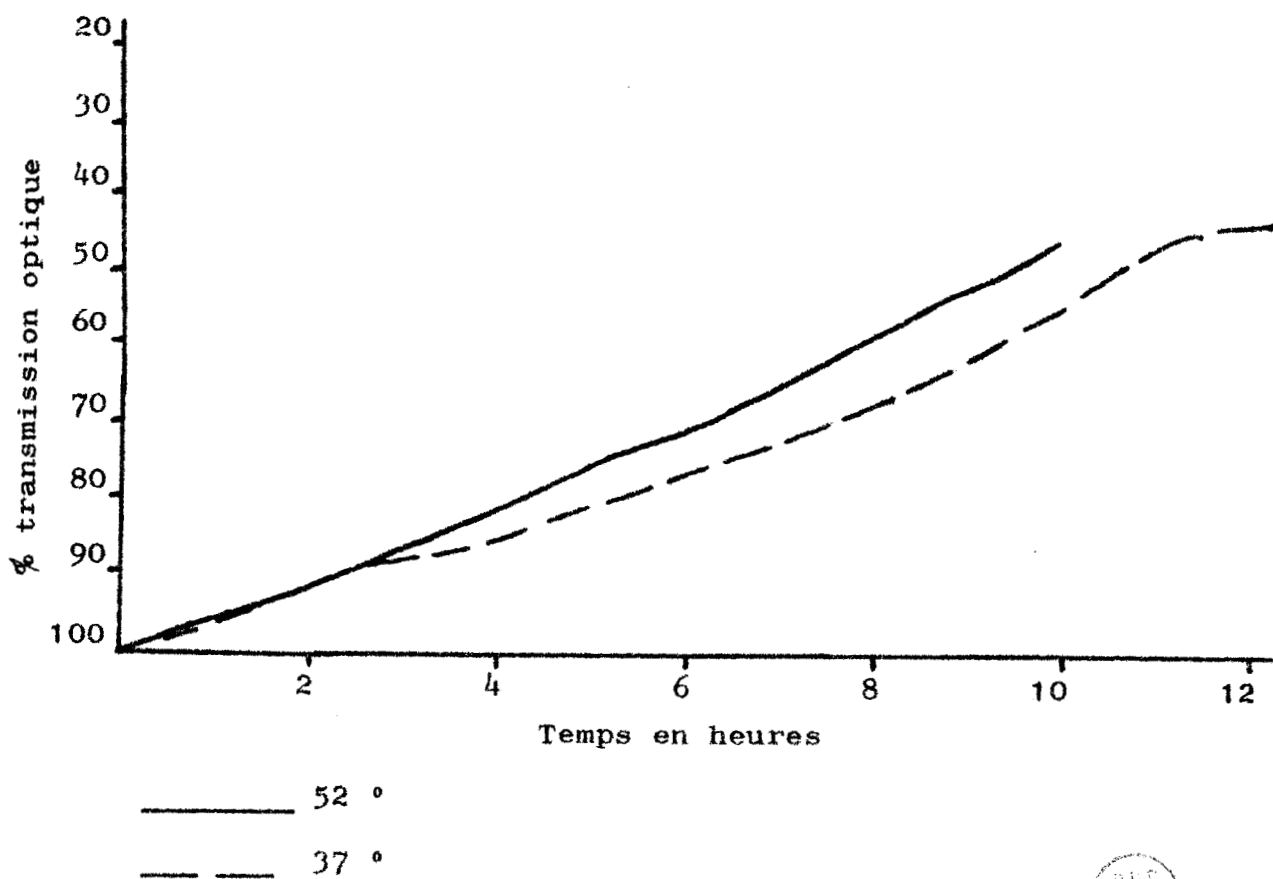
FIGURE IV

Des dénombrements de formes végétatives effectués à la 12ème heure sur chacun des échantillons révèlent que dans les deux cas le nombre de bactéries est sensiblement identique quelle que soit la concentration en glucose ou la température envisagée. Le nombre des formes revivifiables oscille entre 3×10^8 et 5×10^8 par ml. Les témoins sans glucose méritent une attention particulière : à 52° le nombre de germes atteint 5×10^6 ; à 37° à la 12ème heure il est de $5,5 \times 10^8$. Ainsi le nombre de germes est différent selon que la culture s'opère à 37° ou à 52°C.

Cette comparaison entre les températures de 37° et 52° est reprise individuellement pour les témoins sans glucose et avec les diverses concentrations en glucose dans les figures V - VI - VII - VIII - IX. Dans tous les cas la croissance est plus rapide à 52° qu'à 37°. L'écart le plus important concerne la concentration de 1 pour 1000 (figure VII) à 52°. La phase logarithmique dure 4 heures au lieu de 10 à 37°. Ainsi se trouve confirmé le choix de 1‰ de glucose dans le milieu à la soytone recommandé pour cultiver les Clostridium thermophiles.

Longévité :

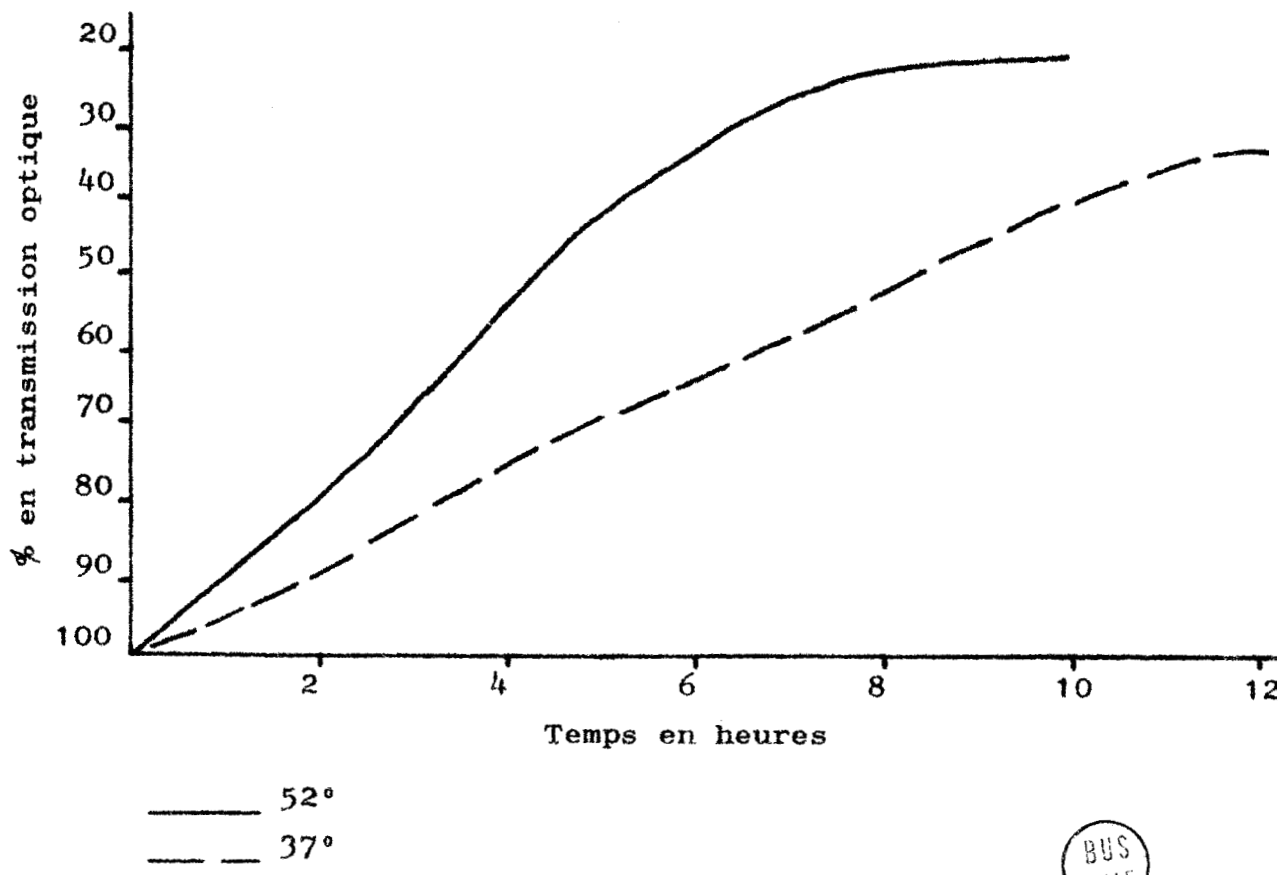
Toutes les cultures sont revivifiables après un séjour de 6 semaines en milieu soytone-cerveille-vert janus aux températures de - 20°C , + 4°C , + 20°C , +55°C. Un essai particulier a été effectué avec la souche 53 B. Il a consisté à dénombrer les bactéries revivifiables après un séjour de 10 jours et 28 jours dans trois milieux différents. Le tableau XII indique qu'après 10 jours les milieux de Rosenow, soytone-cerveille-vert janus enrichi ou non d'extrait d'épinards possèdent la même valeur :



Témoin sans glucose
Température de croissance 52 et 37°



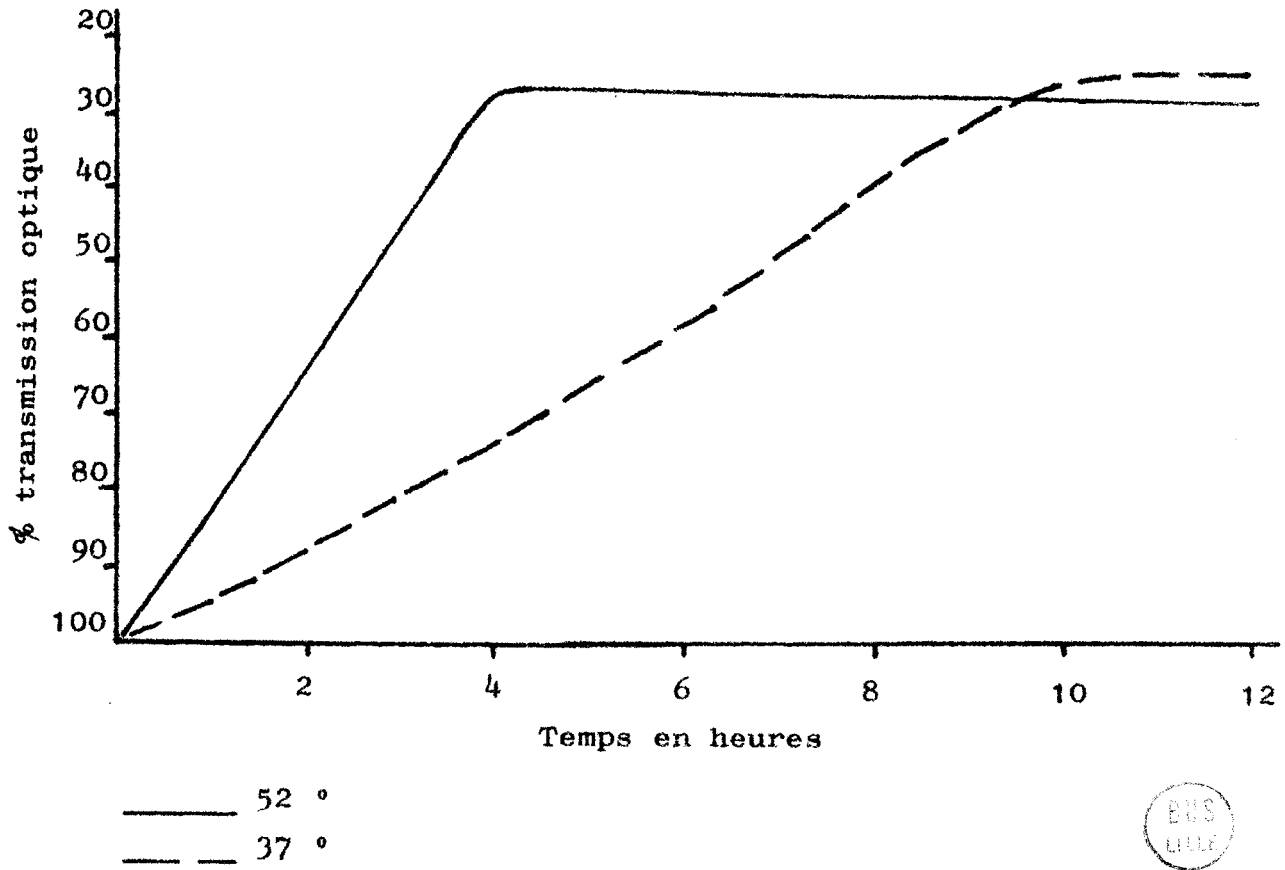
FIGURE V



Concentration en glucose 0,1 p. 1000
Température de croissance 52 et 37°

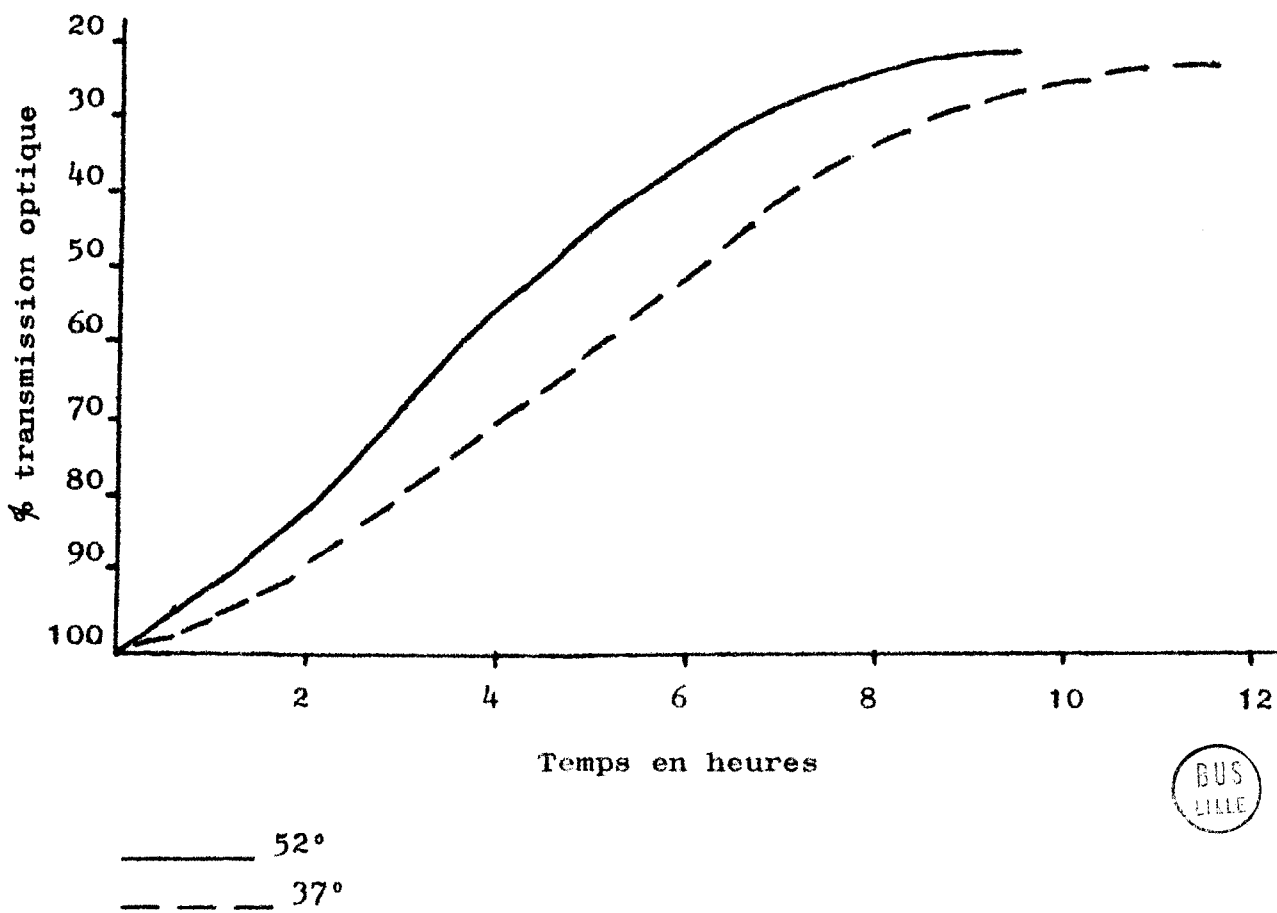


FIGURE VI



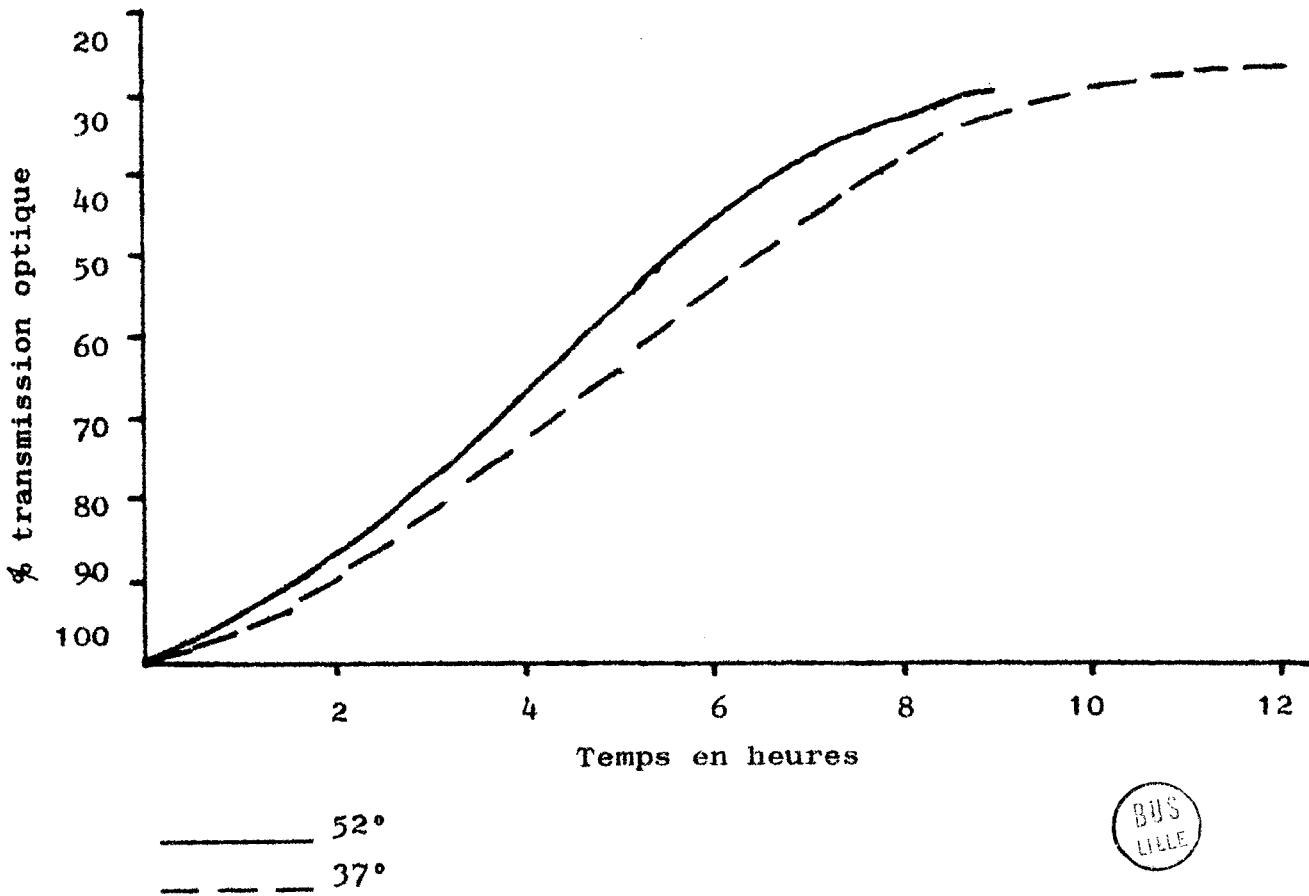
Concentration en glucose 1 p. 1000
Température de croissance 52 et 37°

FIGURE VII



Concentration en glucose 10 et 5 p. 1000
Températures de croissance 52 et 37°

FIGURE VIII



Concentration en glucose 20 p. 1000
Température de croissance 52 et 37°



FIGURE IX

la survie est identique dans les trois cas. Après 28 jours les milieux les plus favorables sont soytone-cervelle-vert janus avec et sans extrait d'épinards ; tous deux contiennent encore des bactéries revivifiables à la dilution 10^{-5} . Le milieu de Rosenow n'en contient qu'à la dilution 10^{-4} .

Sporulation :

Les résultats des essais sont consignés dans le tableau XIII. Il ressort que le milieu contenant les sulfates de Mn, Mg, NH_4 enrichis par de l'extrait de pois cassés ainsi que le milieu de Rosenow conviennent le mieux à la sporulation : 3 souches sur 7 (dans le premier cas) 4 sur 7 (dans le second) ont produit des spores visibles à l'examen microscopique. La terre et le mélange complexe sont moins favorables. L'extrait d'épinards, le DRCM, le sérum coagulé n'ont pas été satisfaisants.

Thermorésistance :

Les résultats sont exposés dans les tableaux XIV et XV.

| Temps de chauffage à 100°C | Désignation des souches ayant résisté | | | |
|----------------------------|---------------------------------------|------|----|----|
| 5 H 30 | 2 | 53 | 52 | |
| 4 H 40 | 58 | | | |
| 3 H 30 | 51 | | | |
| 2 H 30 | 54 | | | |
| 1 H 30 | 55 | 56 A | 71 | 48 |
| 0 H 30 | 50 | 70 | | |

Thermorésistance des spores en suspension dans des solutions saccharosées à 50 % chauffées à 100°C puisensemencées en milieu soytone-vert janus à raison de 4 ml. par tube correspondant à 2 gr. de sucre.

| Désignation des souches | Pois cassés + 3 sulfates | Mélange complexe + 3 sulfates | Epinars + 3 sulfates | Terre + 3 sulfates | DROM | Rosenow cystéiné | Sérum coagulé - extrait de viande SO ₄ Mg. |
|-------------------------|--------------------------|-------------------------------|----------------------|--------------------|------|------------------|---|
| 56 A | + assez nb. | - | - | + rares | - | + assez nb. | - |
| 51 soytone | - | - | - | - | - | + nombreux | - |
| 51 SSPS | + | + très nb. | - | - | - | + rares | - |
| 71 | - | - | - | - | - | + très nb. | - |
| 54 | + rares | - | - | + rares | - | - | - |
| 48 | - | - | - | - | - | - | - |
| 50 | - | - | - | - | - | - | - |

+ = présence de spores à l'examen microscopique
 - = absence de spores à l'examen microscopique



Sporulation de 7 souches de C1. thermosaccharolyticum dans 7 milieux différents

TABLEAU XIII

Les spores de la souche 2 (poudre d'algues) en suspension dans le milieu soytone-vert janus où elles ont été produites résistent 2 H 30 à 100° au lieu de 5 H 30 en solution saccharosée.

| Temps de chauffage à 120°C | Désignation des souches ayant résisté | | | |
|----------------------------|---------------------------------------|----|----|----|
| I H | 54 | 10 | 58 | 52 |
| 0 H 30 | 48 | 55 | | |
| 0 H 15 | 53 | 71 | | |
| 0 H 5 | 50 | 51 | | |
| 0 H 1 | 56 A | | | |

Thermorésistance des spores en suspension dans une solution de saccharose à 50 % chauffées à 120°C dans un bain-marie de paraffine puis ensemencées en milieu soytone-vert janus à raison de 4 ml. par tube.

TABLEAU XV

On remarque que les souches les plus résistantes à 100° ne sont pas toujours celles qui résistent le plus à 120°. Cette apparente discordance relève de l'absence d'homogénéité dans la population. Or les sucres utilisés pour réaliser cette expérience contiennent de très faibles quantités de spores, il est donc possible que l'échantillon de 2 gr. chauffé à 100° renferme une spore plus résistante que l'échantillon chauffé à 120° ou vice versa. Cette faible quantité de spores nous a d'ailleurs interdit toute possibilité de dénombrement au cours du chauffage et d'établir ainsi la courbe de disparition en fonction du temps.

CARACTÈRES BIOCHIMIQUES

Les principaux caractères biochimiques motivant la réunion de 64 souches sont :

- 1°) d'être gazogènes
- 2°) de ne posséder aucun pouvoir protéolytique
- 3°) d'être fortement glucidolytique (glucose, saccharose, lactose, salicine, amidon, arabinose, xylose fermentés, glycérol et cellulose non fermentés)
- 4°) de coaguler le lait
- 5°) de produire uniformément les acides acétique et butyrique.

Ce sont les caractères essentiels de l'espèce Clostridium thermosaccharolyticum. Cependant 2 groupes peuvent être envisagés, 51 souches ne fermentent pas le mannitol et 13 le fermentent ; donc chacun d'eux pourrait se diviser en 2 sous-groupes selon que les sulfites sont réduits ou non. Le tableau XVI rend compte de cette différenciation.

POUVOIR PATHOGENE EXPERIMENTAL

Les cultures des souches 70 SPS, 108, 37, 71 inoculées au cobaye par voie sous-cutanée et à la souris par voie intrapéritonéale n'ont présentées aucun pouvoir infectieux.

DISCUSSION

1) Les caractères nous permettant d'identifier nos souches avec l'espèce Clostridium thermosaccharolyticum correspondent exactement à ceux décrits dans la littérature en ce qui concerne les 51 souches mannitol négatives. Nous avons pourtant trouvé 13 souches fermentant cet hydrate de carbone sans qu'il soit possible de les assimiler à une autre espèce.

| Nombre de souches | Milieu | | Gaz | Couleur | Mobilité | Gélatine | Témoïn | Indole | SH ₂ | Nitrates | Sulfites | Lait | Cellulose | Glucose | Saccharose | Lactose | Mannitol | Glycérol | Salicine | Amidon | L-arabïnose | D-xylose | d-tartrate | Lactate | Citrate | Ac. volatils |
|-------------------|------------------------------|----------|-----|---------|----------|----------|--------|--------|-----------------|----------|----------|-----------|-----------|---------|------------|---------|----------|----------|----------|--------|-------------|----------|------------|---------|---------|--------------|
| | Soytone-cervelle vert jaunus | Mobilité | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 16 | + | jaune | + | | | - | - | - | - | - | - | CRA acid. | - | + | + | + | - | - | + | + | + | + | - | - | - | A.B. |
| 35 | + | jaune | + | | | - | - | - | - | - | R | CRA acid. | - | + | + | + | - | - | + | + | + | + | - | - | - | A.B. |
| 12 | + | jaune | + | | | - | - | - | - | R | R | CRA acid. | - | + | + | + | - | - | + | + | + | + | - | - | - | A.B. |
| 1 | + | jaune | + | | | - | - | - | - | - | - | CRA acid. | - | + | + | + | - | - | + | + | + | + | - | - | - | A.B. |



Caractères de 64 souches de C. l. thermosaccharolyticum

TABLEAU XVI

Pour cette raison nous avons divisé les souches en deux groupes. En fait il semble justifié de considérer qu'il existe une variété Clostridium thermosaccharolyticum mannitol + qui ne diffère de l'espèce type par aucune autre différence.

2) L'origine des souches de Clostridium thermosaccharolyticum isolées est assez uniforme. Nous l'avons rencontrée essentiellement dans des échantillons de sucre raffiné (62 souches sur 64). Bien que le nombre de spores contenu dans 1 gramme de produit soit relativement faible, en moyenne 10 par gramme, le problème de l'élimination de ces spores se pose. L'origine de la contamination est sans nul doute la betterave sucrière souillée par la terre. Or, parmi les nombreuses espèces de Clostridium thermophiles susceptibles de contaminer la betterave, seul Cl. thermosaccharolyticum - espèce saccharolytique par excellence - parvient à se maintenir à travers toute la chaîne des nombreuses opérations conduisant au sucre raffiné. On se trouve ainsi en présence d'un tropisme de l'espèce pour les produits sucrés et seule une désinfection efficace et fréquente du matériel devrait améliorer la qualité bactériologique des sucres.

GROUPE III - CLOSTRIDIUM NON IDENTIFIES

Ce groupe comprend 18 souches que nous n'avons pu rattacher à une espèce connue. Nous les avons arbitrairement divisées en 9 sous-groupes pour lesquels une clef de détermination a été établie (tableau XVII).

| | Sous-groupe |
|------------------------|-------------|
| A - Non gazogène | I |
| B - Gazogène | |
| 1) Non protéolytique | |
| a - indole - | 2 |
| aa - indole + | |
| b - mannitol - | |
| 1 - saccharose - | 3 |
| 2 - saccharose + | 4 |
| bb - mannitol + | |
| c - xylose - | 5 |
| cc - xylose + | |
| d - nitrates - | 6 |
| dd - nitrates + | 7 |
| 2) Protéolytique | |
| a - nitrates + | 8 |
| aa - nitrates - | 9 |

2 se différencie de 3 par indole -, saccharose +, mannitol +, SH₂ +.

2 se différencie de 6 par indole -, xylose +.

3 se différencie de 4 par saccharose -, SH₂ -, amidon-.

4 se différencie de 5 par sulfite -, mannitol -, salicine -.

5 se différencie de 6 par xylose -.

6 se différencie de 7 par NO₃ -, lactose -, amidon +, salicine-.

8 se différencie de 9 par nitrates +, saccharose +, mannitol +, salicine +, amidon +.

Clef de détermination des Clostridium du groupe III

Les caractères différentiels sont groupés dans les tableaux XXVI et XXVII.

SOUS-GROUPE 1

Il est représenté par une seule souche (112 A)

Origine

L'isolement a été obtenu à partir d'un échantillon de mélasse. Il contenait 30 spores par gramme.

Morphologie

Dans le milieu soytone-cerveille les bactéries se présentent sous forme de bâtonnets droits non sporulés à Gram + du type Lactobacille.

Caractères culturaux

L'absence de production de gaz constitue le principal caractère de différenciation. Il n'a pas été possible d'obtenir de colonies en surface. En profondeur les colonies sont irrégulières.

La température minima de croissance est de 37° ; la température maxima de 61°.

Les caractères biochimiques figurent dans le tableau XXVI. Cette espèce très particulière acidifie fortement le milieu témoin non sucré dont le pH s'abaisse à 5,7. La culture en milieu glucosé atteint un pH de 4,8.

SOUS-GROUPE 2 (2 souches)(81 A - 81 B)

Origine

Les deux souches ont été isolées de jambon en boîte.

Morphologie

Il s'agit de bacilles à Gram + à cils péritriches dont les spores sont centrales ou subterminales, déformantes.

Caractères cultureux

La souche 81 A présente des colonies transparentes, muqueuses, à contours irréguliers et à centre opaque.

La souche 81 B donne des colonies translucides, plates à centre opaque, aux contours réguliers. Elles mesurent 0,5 à 1 mm de diamètre.

En profondeur les colonies sont lenticulaires ou mamelonnées et houppeuses. La température de croissance est comprise entre 37 et 61°C.

Caractères biochimiques

Ils sont présentés dans le tableau XXVI.

SOUS-GROUPE 3 (1 souche) (N° 5)

La seule souche représentant ce sous-groupe a été isolée d'un échantillon de viande de baleine déshydraté contenant 20 spores de cette espèce par gramme.

Morphologie

La forme non sporulée est un bacille à Gram + présentant l'aspect d'un Lactobacillus. La forme sporulée apparaît dans un milieu au potage "volaille vermicelle" enrichi en sulfates de Mn, Mg, NH₄. Le tableau XVIII rend compte de la sporulation en fonction du temps et de quelques milieux essayés.

| Temps d'incubation | Pois cassés + sulfates | Extrait de baleine + sulfates | Farine de poisson + sulfates | Potage Volaille vermicelle + sulfates | Potage au cresson + sulfates | Terre + sulfates |
|-----------------------|------------------------------|-------------------------------------|---|---|------------------------------------|---|
| 6 | - | - | - | Quelques spo- res centrales ou subtermi- nales | - | - |
| 73 | - | - | Rares spores centrales ou subterminales | Nombreuses spo- res centrales ou subterminales | - | Rares spores centrales ou subterminales |

Essais de sporulation de la souche du sous-groupe 3
en fonction du temps et du milieu utilisé

TABLEAU XVIII



La thermorésistance des spores est de 30 minutes à 80° et 1 minute à 100° lorsqu'elles proviennent de milieux artificiels. A partir du milieu naturel la thermorésistance à 100° s'est élevée à 30 minutes. Les spores ont été détruites après chauffage de 1 heure à 100°.

Les caractères cultureux

En surface les colonies sont transparentes, elles ont des contours irréguliers et un centre opaque. En milieu liquide les températures extrêmes de croissance sont de 37° et 61°. La longévité à 55° est de 25 jours. A - 20°C, + 4°C, + 20°C elle dépasse 40 jours.

Les caractères biochimiques de la souche sont exposés dans le tableau XXVI.

SOUS-GROUPE 4

Il est représenté par 2 souches (4 - 6)

Origine

Elle est indiquée dans le tableau XIX.

| Nature des échantillons | Nombre d'échantillons examinés | Désignation des souches isolées | Nombre de spores par g. de produit |
|-------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|------------------------------------|
| Extrait de viande de chalot | I | 4 | 400 |
| Extrait de viande pour bétail | I | 6 | 160 |

Origine des souches du sous-groupe 4

TABLEAU XIX

Morphologie

La forme non sporulée est représentée par des bâtonnets à Gram + droits présentant l'aspect de Lactobacilles. Les cils sont péritriches.

La forme sporulée a été obtenue dans les conditions décrites dans le tableau XX en fonction du milieu utilisé. Les spores sont subterminales, centrales, ovales et déformantes.

| Souches | Pois cassés | Extrait de baleine | Farine de poisson | Potage volaille-vermicelle | Potage au cresson | Terre |
|------------|-------------|--------------------|-------------------|----------------------------|-------------------|-------|
| 6 | + | - | - | + | + | - |
| 4 | | | | | | |
| 6ème jour | - | - | - | - | + | - |
| 73ème jour | + | - | + | + | + | + |

Sporulation des souches du sous-groupe 4 en fonction de différents milieux

TABLEAU XX

On remarque que les milieux enrichis en potage au cresson sont les plus favorables.

Thermorésistance des spores à 100°C - Elle est indiquée dans le tableau XXI.

| Souches | Milieux | Temps de chauffage en minutes à 100°C | | | | | |
|---------|-----------------------------|---------------------------------------|----|----|----|----|-----|
| | | 1 | 10 | 20 | 30 | 60 | 150 |
| 4 | artificiel | + | + | + | | | |
| | naturel (Ext. cachalot) | + | + | + | + | + | + |
| 6 | artificiel | + | | | | | |
| | naturel (Ext. de viande) | + | + | | | | |

Thermorésistance à 100° des souches du sous-groupe 4

TABLEAU XXI

Pour les deux souches la thermorésistance à 100° est plus élevée pour les spores contenues dans le milieu naturel que celle obtenue avec les spores formées dans le milieu artificiel à la soytone. Pour la souche 4 elle varie de 20 minutes à 150 minutes et pour 6 de 1 à 10 minutes.

Caractères culturaux

En surface deux types de colonies sont observés : l'un (souche 4), transparent à contour irrégulier, à centre opaque ; l'autre (souche 6), transparent à contour irrégulier.

En profondeur les colonies sont soit lenticulaires soit mamelonnées ou houppeuses.

Les températures de croissances sont comprises entre 37 et 61°.

La longévité dépasse 30 jours à 55° pour la souche 4, elle est inférieure à 30 jours pour la souche 6.

Les caractères biochimiques des 2 souches sont exposés dans le tableau XXVI.

SOUS-GROUPE 5 (7 souches) (113 A - 113 B - 113 C - 118 A -
119 A - 120 A - 121 A)

Origine - Les 7 souches proviennent soit de boue primaire conditionnée soit d'échantillons de terre (tableau XXII).

| Nature des échantillons examinés | Nombre d'échantillons examinés | Nombre de souches isolées |
|----------------------------------|--------------------------------|---------------------------|
| Boue primaire conditionnée | 1 | 3 |
| Terre | 4 | 4 |

Origine des souches du sous-groupe 5

TABLEAU XXII

Elles ont été décelées à raison de 1 par gr. de l'échantillon de boue et respectivement, une et deux, pour les échantillons de terre.

Morphologie

Il s'agit de bacilles à Gram + à cils péritriches et à spores centrales ou subterminales déformantes se formant facilement sur les milieux à la soytone. La thermo-résistance des spores est constante pour les 7 souches. A partir des milieux naturels et dans une solution saccharosée à 50 % dans un bain de paraffine les spores ont résisté 60 minutes à 120° et ont été détruites après 80 minutes.

Caractères culturaux

En surface les souches 113 A et 121 A donnent des colonies transparentes, plates à contours dentelés ; les souches 113 B, 119 A, 120 A des colonies transparentes, rondes à contours réguliers ; la souche 113 C des colonies granuleuses de 1 mm de diamètre à contours irréguliers. En profondeur les colonies sont lenticulaires, mamelonnées ou houppeuses.

Température de croissance

Les températures extrêmes de développement sont de 30 et 63°C.

Les caractères biochimiques sont exposés dans le tableau XXVI.

SOUS-GROUPE 6 (1 souche) (N° 1)

Origine

La souche a été isolée d'un échantillon de potage déshydraté.

Morphologie

Les bactéries sont des bâtonnets à Gram + à cils péritriches sporulant difficilement. Le tableau XXIII rend compte des essais réalisés pour obtenir les spores.

L'extrait de pois cassés apparaît plus favorable que les autres extraits utilisés et l'association des 3 sulfates de Mn, Mg, d'ammonium semble bénéfique. Les spores sont subterminales, centrales, déformantes. Elles résistent 30 minutes à 80°C et 15 minutes à 100°C ; elles sont détruites après chauffage de 20 minutes à 100°C.

| Nature des sels minéraux ajoutés à l'extrait désigné | | | |
|--|--------------------|---|---|
| Extraits | Mn SO ₄ | Mg SO ₄ (NH ₄) ₂ SO ₄ | Mn SO ₄ Mg SO ₄ (NH ₄) ₂ SO ₄ |
| Pois cassés | - | Nombreuses spores sub-terminales et centrales et les déformantes | Nombreuses spores sub-terminales et centrales et déformantes |
| Extrait de baleine | - | - | - |
| Farine de poisson | - | - | - |
| Potage volaille vermicelle | - | - | Nombreuses spores sub-terminales et centrales |
| Potage au cresson | - | - | Rares spores subterminales et centrales |
| Telle | - | - | - |

Sporulation de la souche 1 (sous-groupe 6) en fonction du milieu utilisé

TABLEAU XXIII



Caractères cultureux

En surface les colonies sont transparentes, à contours irréguliers et à centre opaque. En profondeur elles sont lenticulaires, mamelonnées ou houppeuses.

Les températures extrêmes de croissance sont de 37 et 61°C.

La souche est encore revivifiable après un séjour de 39 jours à 55°C.

Les Caractères biochimiques sont décrits dans le tableau XXVI.

SOUS-GROUPE 7 (1 souche)(117)

Origine

La souche a été isolée de fumier de cheval.

Morphologie

Il s'agit de bâtonnets à Gram + sporulant facilement sur les milieux à la soytone. Les spores sont subterminales ou centrales, ovales et déformantes. Elles résistent 50 minutes à 120° et sont tuées après 1 heure de chauffage à cette température.

Caractères cultureux

En surface les colonies sont granuleuses à contours irréguliers. Elles mesurent 1 mm de diamètre. Les températures extrêmes de croissance sont de 30° et 63°C.

Les caractères biochimiques

Ils sont décrits dans le tableau XXVI.

Les sous-groupes 8 et 9 comprennent des espèces protéolytiques liquéfiant la gélatine et digérant le lait.

SOUS-GROUPE 8 (1 souche) (N° 3)

Origine

La souche a été isolée d'un potage déshydraté. Il contenait 40 spores par 1 gramme.

Morphologie

Il s'agit de bâtonnets à Gram + non sporulés dans les milieux ordinaires de culture, mobiles par cils péritriches. La sporulation est hautement favorisée par l'association des sulfates de Mn, de Mg et d'ammonium comme l'indique le tableau XXIV. Le sulfate de manganèse semble défavorable à la sporulation. Les milieux les plus satisfaisants sont ceux au potage "volaille vermicelle" et au potage au cresson.

Thermorésistance des spores

Les spores résistent 30 minutes à 80°C et 15 minutes à 100°C. Elles sont détruites après 20 minutes de chauffage à 100°C. La longévité dépasse facilement 39 jours à 55°C.

Caractères cultureux

Les colonies de surface sont transparentes et présentent des contours réguliers. En profondeur elles sont lenticulaires, mamelonnées ou houppeuses.

Les températures extrêmes de croissance sont 24 et 61°C.

Caractères biochimiques

Ils sont exposés dans le tableau XXVI.

| Nature des sels minéraux ajoutés à l'extrait désigné | | |
|--|---|---|
| Extraits | Mn SO ₄ Mg SO ₄ (NH ₄) ₂ SO ₄ | Mn SO ₄ Mg SO ₄ (NH ₄) ₂ SO ₄ |
| Pois cassés | - | Rares spores subterminales déformantes |
| Extrait de baleine | - | Quelques spores subterminales déformantes |
| Farine de poisson | - | Rares spores déformantes |
| Potage volaille vermicelle | Rares spores déformantes | Nombreuses spores subterminales déformantes |
| Potage au cresson | Rares spores ovales déformantes | Nombreuses spores subterminales déformantes |
| Terre | - | Nombreuses spores subterminales déformantes |

Sporulation des souches du sous-groupe 8 (souche 3) en fonction du milieu utilisé

TABLEAU XXIV



SOUS-GROUPE 9 (2 souches) (N° 115 et 116)

Les différences essentielles entre les sous-groupes 8 et 9 doivent être recherchées dans la réduction des nitrates et les fermentations sucrées.

La souche du sous-groupe 8 réduit les nitrates et fermente fortement les glucose, saccharose, amidon alors que les souches du sous-groupe 9 fermentent faiblement le glucose mais non le saccharose et l'amidon.

Origine des souches

La souche N° 115 provient de matières fécales de cobaye, la souche N° 116 de fécès de poule.

Morphologie

Ce sont des bâtonnets à Gram + du type Lactobacille pour lesquelles il ne nous a pas été donné d'observer les spores par examen microscopique. Nous avons cependant déterminé leur thermorésistance : elles résistent 30 minutes à 120° mais sont détruites après 50 minutes de chauffage en solution saccharosée.

Caractères cultureux

Il n'a pas été possible d'obtenir de colonies sur les milieux solides en surface. En profondeur leur forme varie dans un même tube de milieu.

Les températures extrêmes de croissance sont 30° et 63°C.

Caractères biochimiques

Les deux souches diffèrent par la production d'indole comme l'indique le tableau XXVI.

DISCUSSION

1) Les origines variées de chacune de ces espèces indiquent une très large répartition des Clostridium thermophiles dans la nature. Ce sont des germes telluriques (tableau XXV)

| Sous-groupes | Nombre de souches | Origine |
|--------------|-------------------|-------------------------------|
| 1 | 1 | Mélasses |
| 2 | 2 | Jambon en boîte |
| 3 | 1 | Viande de baleine déshydratée |
| 4 | 1 | Extrait de viande de cachalot |
| | 1 | Extrait de viande pour bétail |
| 5 | 3 | Boue primaire conditionnée |
| | 4 | Terre |
| 6 | 1 | Potage déshydraté |
| 7 | 1 | Fumier de cheval |
| 8 | 1 | Potage déshydraté |
| | 1 | Fécès de poule |
| 9 | 1 | Fécès de cobaye |

Origine des espèces du groupe III

TABLEAU XXV

2) Le classement des 18 souches en sous-groupes se justifie en étudiant les relations existantes entre les souches. Toutes sont des Clostridium thermotrophes à spores subterminales ou centrales, déformantes. Elles possèdent le même type fermentaire aceto butyrique et ne sont pas pathogènes pour l'animal.

| | Milieu soytone cervelle | Gaz | Couleur | Mobilité | Gélatine | Cellulose | Témoin | Indole | H ₂ S | Nitrate de Na | Sulfite de Na | Lait | Glucose | Saccharose | Lactose | Mannitol | Glycérol | Salicine | Amidon | L + arabinose D + xylose | Tartrate de Ca | Lactate de Ca | Citrate de Ca | Acides volatils | |
|---------------------|-------------------------------|-----|---------|----------|----------|-----------|------------------------------|----------------|------------------|---------------|----------------------------------|----------------|-------------|------------|---------|----------|----------|----------|--------|-----------------------------|----------------|---------------|---------------|--------------------|-----------------------|
| Sous- groupe 1 : | - | j | + | - | - | - | A acidi- fié pH 5,7 | - | + | - | R | C.A. neutre | A pH 4,8 | A | A | A | A | A | A | A | A | - | - | - | acétique butyrique |
| Sous- groupe 2 : | +++ | j | + | - | - | - | - | - | + | - | - | neutre | A | A | - | A | - | a | a | a | - | - | - | - | acétique butyrique |
| Sous- groupe 3 : | ++ | j | + | - | - | - | - | + | - | - | - | - | A | - | - | - | - | a | - | - | - | - | - | - | acétique butyrique |
| Sous- groupe 4 : | ++ | j | + | - | - | - | - | + | + | - | R | neutre | A | A | - | - | - | - | A | - | - | - | - | - | acétique butyrique |
| Sous- groupe 5 : | +++ | j | + | - | - | - | - | +++ | + | - | colle- rette ou (118 A) | - neutre | A | A | - | a | - | a | a | a | - | - | - | - | acétique butyrique |
| Sous- groupe 6 : | +++ | j | + | - | - | - | - | + | + | - | - | - | A | A | - | A | - | a | - | - | - | - | - | - | acétique butyrique |
| Sous- groupe 7 : | ++ | j | + | - | - | - | acide | +++ | + | R | - | lég. acide | A | A | a | A | - | - | A | - | - | - | - | - | acétique butyrique |
| Sous- groupe 8 : | +++ | j | + | 24H | - | - | - | + | + | R | - | D neutre | A | A | - | a | - | a | A | a | - | - | - | - | acétique butyrique |
| Sous- groupe 9 : | +++ | j | + | 24H | - | - | - | +++ ou - | + | - | - | D neutre | a | - | - | - | - | - | - | a | A | - | - | - | acétique butyrique |

Caractères biochimiques des souches des sous-groupes 1-2-3-4-5-6-7-8-9 du groupe III

TABLEAU XXVI

Le sous-groupe 1 non gazogène se différencie des six autres tous gazogènes. Il est en outre fortement glucidolytique et acidifie même le milieu témoin non sucré de façon non négligeable.

Les sous-groupes 8 et 9 sont protéolytiques. 8 réduit les nitrates et fermente les sucres. 9 est nitrate - et faiblement glucidolytique.

Les sous-groupes 2 - 3 - 4 - 5 - 6 - 7 présentent des caractères apparemment rapprochés ne permettant pas toutefois de les confondre les uns avec les autres. Les principaux critères de différenciation se trouvent réunis dans le tableau XXVII.

Les sous-groupes rapprochant le plus sont 6 et 7, 4 et 5 ; 6 et 7 diffèrent par la réduction des nitrates, la fermentation de l'amidon et les températures extrêmes de croissance ; 4 et 5 par la réduction des sulfites, la fermentation du mannitol et de l'amidon.

3) Les températures extrêmes de croissance ne sont pas homogènes et ne permettent pas de rapprocher les sous-groupes possédant une certaine affinité biochimique comme les sous-groupes 8 et 9, 4 et 5 par exemple.

| Températures | Sous-groupes |
|--------------|-------------------|
| 37 - 61°C | I - 2 - 3 - 4 - 6 |
| 30 - 63°C | 5 - 7 - 9 |
| 24 - 61°C | 8 |

| Sous groupe | Indole | SH ₂ | NO ₃ | SO ₃ | Sacch. | Mannitol | Xylose | Amidon |
|-------------|--------|-----------------|-----------------|-----------------|--------|----------|--------|--------|
| 2 | - | + | - | - | + | + | - | - |
| 3 | + | - | - | - | - | - | - | - |
| 4 | + | + | - | - | + | - | - | + |
| 5 | + | + | - | + | + | a | - | - |
| 6 | + | + | - | - | + | + | + | - |
| 7 | + | + | + | - | + | + | + | + |

Caractères différentiels des Clostridium
du groupe III

TABEAU XXVII

4) Est-il possible d'identifier l'un de ces sous-groupes avec des espèces décrites dans la littérature ?

En comparant les tableaux I et XXVI on remarque qu'aucune espèce antérieurement décrite ne s'identifie avec les espèces mentionnées. Le petit nombre de souches étudiées ne permet cependant pas d'établir des espèces nouvelles.

5) Les thermorésistances des souches envisagées sont toujours élevées.

A 100° le temps de survie le moins élevé est de 20 minutes et le plus long de 150 minutes.

A 120° en suspension dans une solution saccharosée et en bain de paraffine, nous avons enregistré des survies de 50 et 60 minutes.

DISCUSSIONS GENERALES

L'étude de 101 souches de Clostridium thermophiles autorise quelques commentaires. Ils concernent essentiellement :

- 1) la nature des espèces isolées et leur fréquence
- 2) les températures extrêmes de croissance
- 3) la sporulation
- 4) la thermorésistance des spores
- 5) l'isolement

1 - Malgré l'origine tellurique évidente des espèces rencontrées et étudiées au cours de ce travail, une certaine sélection s'opère en fonction de la nature du produit contaminé. Ainsi parmi les 50 échantillons de sucre examinés nous n'avons isolé qu'une seule espèce : Cl. thermosaccharolyticum. Il est cependant rationnel de supposer que d'autres espèces thermophiles et thermorésistantes soient susceptibles de contaminer le sucre au cours des différentes étapes de sa fabrication. Seule Cl. thermosaccharolyticum s'est maintenue et même enrichie. Cl. thermosaccharolyticum trouve donc des conditions favorisant son développement dans le matériel des sucreries. Son affinité pour les hydrates de carbone en est une explication, elle n'est cependant pas suffisante. Il en est de même pour les préparations spéciales pour l'enfance où nous n'avons trouvé qu'une seule espèce : Cl. thermoaceticum. Par quel mécanisme ce Clostridium s'est-il ainsi maintenu alors que les légumes sont également contaminés par des spores aussi thermorésistantes que celle de thermosaccharolyticum ?

2 - Les températures extrêmes de croissance ne sont pas constantes pour une espèce déterminée. Ainsi, à cet égard, les souches de Cl. thermoaceticum se divisent en deux catégories : la première comprend les souches cultivant de 49 à 69° ; la deuxième, celles se développant de 49 à 63°. Il en est de même pour Cl. thermosaccharolyticum : 4 groupes se constituent 30 - 63 ; 30 - 65 ; 37 - 63 ; - 37 - 65. Aucun n'est en rapport avec la faculté de fermenter ou non le mannitol ou de réduire ou non le sulfite.

3 - La sporulation des Clostridium thermophiles est en général difficile à obtenir. Nous n'avons trouvé aucune règle conditionnant l'apparition de la spore. Les résultats varient d'une souche à l'autre quelle que soit l'espèce envisagée.

4 - La thermorésistance des spores des Clostridium thermophiles est souvent très élevée. Cette thermorésistance est toujours plus accentuée pour les spores formées dans les conditions naturelles que pour celles obtenues dans des milieux artificiels. Il s'agit là d'un phénomène non encore expliqué. Il est cependant regrettable de ne pouvoir établir la courbe de disparition des spores en fonction du temps de chauffage. La difficulté d'obtenir des spores d'une part, l'absence de garantie d'une germination totale dans les milieux de culture utilisés nous interdit d'établir une telle statistique. Nous avons tenté de le faire pour Cl. thermoaceticum mais le nombre insuffisant de spores contenu dans nos milieux ne nous a pas donné de résultats significatifs.

5 - Tous les Clostridium thermophiles ne bénéficient pas du milieu soytone-sulfite-sulfadiazine-polymixine pour l'isolement. De nombreuses espèces ne cultivent pas sur ce milieu et de ce fait, lorsqu'elles sont associées à des Bacillus thermophiles, ne peuvent être mises en évidence ou isolées.

CONCLUSION

Les Clostridium thermophiles soulèvent de multiples problèmes intéressant autant la bactériologie générale, que la bactériologie alimentaire ou la microbiologie du sol. Les systèmes enzymatiques aussi complexes que ceux permettant d'obtenir un métabolisme à des températures aussi différentes que 24 et 63° méritent une attention particulière. La thermorésistance aussi élevée, la sporulation difficile sont autant de phénomènes à expliquer. La description des espèces enfin est loin d'être complète.

Le bactériologiste alimentaire se trouve constamment aux prises avec ces Clostridium aussi largement répandus dans la nature d'une part parce qu'ils sont insuffisamment connus et d'autre part parce qu'ils sont toujours difficiles à supprimer. Certes les conditions de température favorables au développement des thermophiles sont rarement réalisées mais les Clostridium thermotrophes ne sont pas à négliger et occasionnent souvent des altérations désagréables. Les remèdes demeurent difficiles à trouver surtout lorsque la thermorésistance des souches en cause dépasse les températures recommandées par les barèmes de stérilisation. Seules les notions de propreté et de désinfection du matériel sont dès lors susceptibles de solutionner le problème.

Ainsi les Clostridium thermophiles constituent un champ d'investigation très large qui mérite d'être prospecté.

BIBLIOGRAPHIE

-:-:-:-:-:-:-:-

- (1) ANGELOTTI R., HALL H.E., FORSTER M.J., LEWIS K.H.
Quantitation of Clostridium perfringens in foods.
Appl. Microbiol., 1962, 10, 193-199.
- (2) BEERENS H., CASTEL M.M.
Procédé simplifié de culture en surface des bactéries anaérobies.
Comparaison avec la technique utilisant la culture en profondeur.
Ann. Inst. Pasteur Lille, 1958, 10, 183-192.
- (3) BEERENS H., TAHON CASTEL M.M.
Infections humaines à bactéries anaérobies non toxigènes.
Presses Acad. Europ. Bruxelles, 1965, 1 vol., 194.
- (4) BEERENS H., TAHON CASTEL M.M.
En préparation.
- (5) CAMPBELL L.L.JR., FRANK H.A., HALL E.R.
Studies on thermophilic sulfate reducing bacteria.
Identification of "Sporovibrio desulfuricans" as "Clostridium nigrificans".
J. Bact., 1957, 73, 516-521.
- (6) DAMON S.R., FEIRER W.A.
Anaerobic sporulating thermophiles. Some observations on a new group of bacteria.
J. Bact., 1925, 10, 37-46.
- (7) FONTAINE F.E., PETERSON W.H., Mc COY E., JOHNSON M.J., RITTER G.J.
A new type of glucose fermentation by Clostridium thermoaceticum n. sp.
J. Bact., 1942, 43, 701-715.
- (8) GAUGHRAN E.R.L.
The termophilic microorganisms.
Bact. Rev., 1947, 11, 189-225.

- (9) GIBBS B.M., FRAME B.
Methods for the recovery of Clostridia from foods.
J. appl. Bact., 1965, 28, 95-111.
- (10) GUILLAUME J., BEERENS H., OSTEUX R.
Etude des acides volatils aliphatiques de C₁ à C₆ produits par 215 souches de bactéries anaérobies.
Ann. Inst. Pasteur, 1956, 90, 229.
- (11) IMSENECKI A.A., SOLNZEVA L.I.
Bactéries butyriques thermophiles.
Microbiol., 1945, 14, 324-329.
- (12) KOHN J.
A preliminary report of a new gelatine liquefaction.
J. Clin. Path., 1953, 6, 249.
- (13) LEBERT F.
Etude d'une bactérie anaérobie thermophile nouvelle des conserves de viande et légumes : Plectridium causophilum n. sp.
Ann. Inst. Pasteur, 1949, 76, 548-550.
- (14) LEIFSON E.
Staining, shape and arrangement of bacteria flagella.
J. Bact., 1951, 62, 337-389.
- (15) MAC INTOSH J., FILDES P.
A new apparatus for the isolation and cultivation of anaerobic microorganisms.
Lancet, 1916, 1, 768-770.
- (16) Mc CLUNG L.S.
Taxonomy of cultures of a thermophilic species causing swells of canned foods.
J. bact., 1934, 29, 189-203.
- (17) Mc CLUNG L.S.
Studies on anaerobic bacteria, historical review and technique of culture of certain thermophilic anaerobes.
J. Bact., 1935, 29, 173-187.

- (18) Mc CLUNG L.S., Mc COY E.
A corn liver medium for the detection and dilution counts of various anaerobes.
J. Bact., 1934, 28, 267-277.
- (19) MERCER W.A., VAUGHN R.H.
The characteristics of some thermophilic, tartrate-fermenting anaerobes.
J. Bact., 1951, 62, 27-37.
- (20) NOSSEL D.A.A., GOLDSTEIN BROUWERS G.W.M., DEBRUIN A.S.
A simplified method for the isolation and study of obligate anaerobes.
J. Path. Bact., 1959, 78, 290-291.
- (21) PAINE F.S.
Some observations on thermophilic anaerobes.
Zbl. Bakt., 1931, 85, 122-129.
- (22) PREVOT A.R., THOUVENOT H., PITRE J., BRESSOU M.
Etude d'une espèce thermophile anaérobie nouvelle : Cillobacterium thermophilum n. sp.
Ann. Inst. Pasteur, 1954, 86, 776-778.
- (23) SJOLANDER N.O.
Studies on anaerobic bacteria XII. The fermentation products of Cl. thermosaccharolyticum.
J. Bact., 1937, 34, 419-428.
- (24) TABACHICK J., VAUGHN R.H.
Characteristics of tartrate-fermenting species of Clostridium.
J. Bact., 1948, 56, 435-443.
- (25) TSIKLINSKY P.
Sur la flore microbienne thermophile du canal intestinal de l'homme.
Ann. Inst. Pasteur, 1903, 17, 217-240.
- (26) VEILLON R.
Sur quelques microbes thermophiles strictement anaérobies.
Ann. Inst. Pasteur, 1922, 36, 422-438.

(27) WERKMAN C.H.

Bacteriological studies on sulfide spoilage of canned vegetables.

Iowa Agr. Expt. State Res. Bul., 1929, 117, 163-180.

(28) WERKMAN C.H., WEAVER H.J.

Studies in the bacteriology of sulphur stinker spoilage of canned sweet corn.

Iowa State Col. J. Sci., 1927, 2, 57-67.

