

# THESE

Présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE TROISIÈME CYCLE

(Biologie cellulaire mention Microbiologie)

par

**Claude DEFIVES**

ETUDE DE LA CRYORESISTANCE DES  
SPORES DE BACILLACEAE.



030 027021 2



Soutenu le **5 MAI 1977** devant la COMMISSION D'EXAMEN

MM.	J.B. GUILLAUME	Président
	J.C. DERIEUX	Rapporteur
	B. MONTUELLE	} Examineurs
	J. KREMBEL	

Ce travail a été réalisé à l'Institut Pasteur  
de Lille (Domaine du C.E.R.T.I.A.) et au  
Laboratoire de Microbiologie de l'Université  
des Sciences et Techniques de Lille.

Ce travail a été effectué sous la direction scientifique et avec les précieux conseils de Monsieur le Professeur GUILLAUME que je tiens à remercier tout particulièrement.

J'exprime ma gratitude à Monsieur le Professeur DERIEUX pour le bienveillant intérêt avec lequel il a suivi notre étude.

Je suis très reconnaissant à Messieurs les Professeurs MONTUELLE et KREMBEL d'avoir bien voulu accepter de juger cette thèse.

J'apprécie beaucoup l'ambiance dans laquelle j'ai pu réaliser mes travaux. J'en remercie tous mes collègues et amis, qui, à divers titres, m'ont apporté aide et sympathie.

J'exprime mes vifs remerciements :

- à Monsieur le Professeur P. SCHAEFFER (Institut de Microbiologie ORSAY) et Madame le Professeur A. RYTER (Institut Pasteur Paris) pour le don des souches de Bacillus subtilis Marburg.
  - à Messieurs WARTEL et BELSOT pour les dosages d'eau.
  - à Monsieur CHERON pour les analyses d'acides aminés.
  - à Messieurs PRENSIER et DUBREMETZ pour leur aide amicale en microscopie électronique.
  - à la Société AIR-LIQUIDE pour l'aide apportée.
- - - - -

AVANT PROPOS .....	1
INTRODUCTION .....	3
I CONSIDERATIONS PHYSICO-CHIMIQUES .....	4
=====	
II ALTERATIONS SUBIES PAR LES MICROORGANISMES SOUMIS A	
=====	
LA CONGELATION .....	5
=====	
A) <u>DOMMAGES MECANIQUES</u> .....	5
B) <u>ALTERATIONS STRUCTURALES</u> .....	6
C) <u>ALTERATIONS METABOLIQUES</u> .....	7
D) <u>ALTERATIONS GENETIQUES</u> .....	8
E) <u>ALTERATIONS PHYSIOLOGIQUES</u> .....	8
III FACTEURS INFLUENCANT LES MICROORGANISMES SOUMIS	
=====	
A LA CONGELATION .....	8
=====	
A) <u>L'ESPECE BACTERIENNE</u> .....	9
B) <u>ETAT PHYSIOLOGIQUE DE LA CULTURE</u> .....	9
C) <u>CONDITIONS DE SUBCULTURE</u> .....	9
D) <u>LE MILIEU DE CONGELATION</u> .....	10
E) <u>CONCENTRATION DE LA SUSPENSION CELLULAIRE</u> .....	10

F) <u>METHODES DE CONGELATION ET DECONGELATION</u> .....	10
G) <u>INFLUENCE DU MILIEU DE NUMERATION</u> .....	12
IV MECANISMES DE REPARATION DES ALTERATIONS NON LETALES..... =====	13
V CONCLUSION .....	13
=====	

## C H A P I T R E I

### S U R V I E D E M I C R O O R G A N I S M E S C O N G E L E S S U R S U P P O R T S O L I D E

I MATERIEL ET METHODES .....	15
=====	
A) <u>MICROORGANISMES UTILISES ET SUBCULTURES</u> .....	15
1 - <u>Bacilles à Gram négatif</u> .....	15
2 - <u>Coccis à Gram positif</u> .....	15
3 - <u>Bacilles à Gram positif</u> .....	15
4 - <u>Spores de moisissures</u> .....	16
5 - <u>Levures</u> .....	16
6 - <u>Subcultures</u> .....	16

B) SUPPORT SOLIDE DE CONGELATION ..... 16

C) PREPARATION DES ECHANTILLONS ET TEMOINS ..... 18

D) CONGELATIONS ..... 18

E) DECONGELATION ..... 20

F) MISE EN EVIDENCE DES MICROORGANISMES SURVIVANTS ..... 21

III RESULTATS ET DISCUSSION ..... 21  
 =====

IV CONCLUSION ..... 26  
 =====

CHAPITRE II

CRYORESISTANCE DES SPORES DE BACILLUS  
RELATION AVEC LA THERMORESISTANCE

I MATERIEL ET METHODES ..... 28  
 =====

A) SOUCHES UTILISEES ..... 28

B) OBTENTION DES SPORES ..... 28

C) CULTURE DES FORMES VEGETATIVES ..... 28

D) PREPARATION DES ECHANTILLONS ..... 29

E) CONGELATIONS- DECONGELATION - MISE EN EVIDENCE  
DES GERMES SURVIVANTS ..... 29

F) THERMORESISTANCE DES SPORES ..... 29

II RESULTATS ET DISCUSSION ..... 30  
=====

III CONCLUSION ..... 33  
=====

CHAPITRE III

APPARITION DE LA CRYORESISTANCE ET  
DE LA THERMORESISTANCE AU COURS DE  
LA SPORULATION

I MATERIEL ET METHODES ..... 34  
=====

A) ETABLISSEMENT DES RESISTANCES AU COURS DE LA SPORULATION 34

B) UTILISATION DE MUTANTS ASPOROGENES ..... 36

C) MICROSCOPIE ELECTRONIQUE ..... 37

II RESULTATS ET DISCUSSION .....	38
=====	
III CONCLUSION .....	46
=====	

## C H A P I T R E   I V

### E T U D E   D E   D I F F E R E N T S   F A C T E U R S   E N R E L A T I O N   A V E C   L A   C R Y O R E S I S T A N C E D E S   S P O R E S

I LA THEORIE DU CORTEX CONTRACTILE .....	49
=====	
II MATERIEL ET METHODES .....	52
=====	
A) <u>MICROSCOPIE ELECTRONIQUE</u> .....	52
1 - <u>Spores chauffées</u> .....	52
2 - <u>Spores congelées</u> .....	52
3 - <u>Traitement pour la microscopie électronique</u> .....	52
B) <u>DOSAGE DE LA CYSTEINE</u> .....	53
C) <u>DOSAGE DE L'ACIDE DIPICOLINIQUE</u> .....	53

D) <u>DOSAGE DE L'EAU CELLULAIRE</u> .....	54
III RESULTATS ET DISCUSSION .....	55
=====	
IV CONCLUSION .....	64
=====	
DISCUSSION ET CONCLUSION GENERALES	66
BIBLIOGRAPHIE .....	70

## A V A N T   P R O P O S

En 1876, l'ingénieur français Charles TELLIER aménageait un navire : "LE FRIGORIFIQUE", pour transporter la viande sur la ligne maritime ROUEN-BUENOS AIRES. L'invention du "*père du froid*" allait donner un essor nouveau aux industries de conservation et de transport des denrées alimentaires.

Un siècle plus tard, les basses et très basses températures sont universellement employées dans de multiples domaines mais c'est certainement encore pour l'industrie alimentaire que l'élan donné par Charles TELLIER reste primordial. En effet, la stabilisation des aliments par les méthodes frigorifiques s'est vite révélée d'une importance économique considérable. Du transport de la viande des bovins d'Argentine par le navire de Charles TELLIER aux plats cuisinés présentés dans les vitrines réfrigérées des magasins modernes, de gros progrès ont certes été réalisés dans des domaines purement techniques. Mais si le froid est universellement utilisé, la stabilisation des aliments par cette méthode reste un procédé relativement empirique car on connaît mal l'effet des basses températures sur les microorganismes alors que c'est essentiellement en empêchant la pullulation des germes que le froid permet la conservation prolongée d'une denrée.

Or, si les basses températures détruisent ou inhibent effectivement les microorganismes, il ne faut pas oublier que la congélation est également un moyen efficace de conservation de souches bactériennes pour peu que celles-ci soient convenablement protégées. Cette contradiction reflète bien les difficultés rencontrées lorsque l'on veut expliquer l'action du froid sur les microorganismes. Nous tentons d'apporter notre contribution à la compréhension de ces phénomènes.

Une revue générale des connaissances acquises à la suite des travaux de nombreux auteurs nous a permis de faire le point sur ce problème et d'envisager une technique expérimentale originale.

Nous avons ensuite vérifié la crédibilité de notre méthode en l'appliquant à une série de microorganismes rencontrés plus ou moins fréquemment en bactériologie alimentaire et congelés selon des modalités proches des réalisations pratiques industrielles. Ceci afin de nous rapprocher le plus possible des conditions réelles d'action du froid sur la cellule procaryote tout en conservant une méthode de travail simple et applicable à une étude fondamentale.

Il nous était alors possible d'envisager un modèle expérimental. Nous avons choisi de comparer la cryorésistance des spores de Bacillaceae avec leur thermorésistance ; les spores présentent en effet une particularité intéressante : leur grande résistance à de nombreux agents antimicrobiens et notamment la chaleur. Même si les mécanismes de la thermorésistance des spores ne sont pas non plus totalement élucidés, les éléments connus nous procurent néanmoins un support de comparaison.

Une étude générale simultanée de la thermorésistance et de la cryorésistance des spores de différentes espèces de Bacillus nous a permis de vérifier la relation qui existe entre ces phénomènes.

Puis une expérimentation plus fine a précisé les étapes d'apparition de ces résistances lors du passage de l'état végétatif à l'état sporulé.

Enfin, l'examen de divers facteurs physico-chimiques réputés pour intervenir directement dans la thermorésistance des spores nous a amené à préciser un élément d'explication de la cryorésistance dont nous discutons la possibilité d'extrapolation aux cellules bactériennes en général.

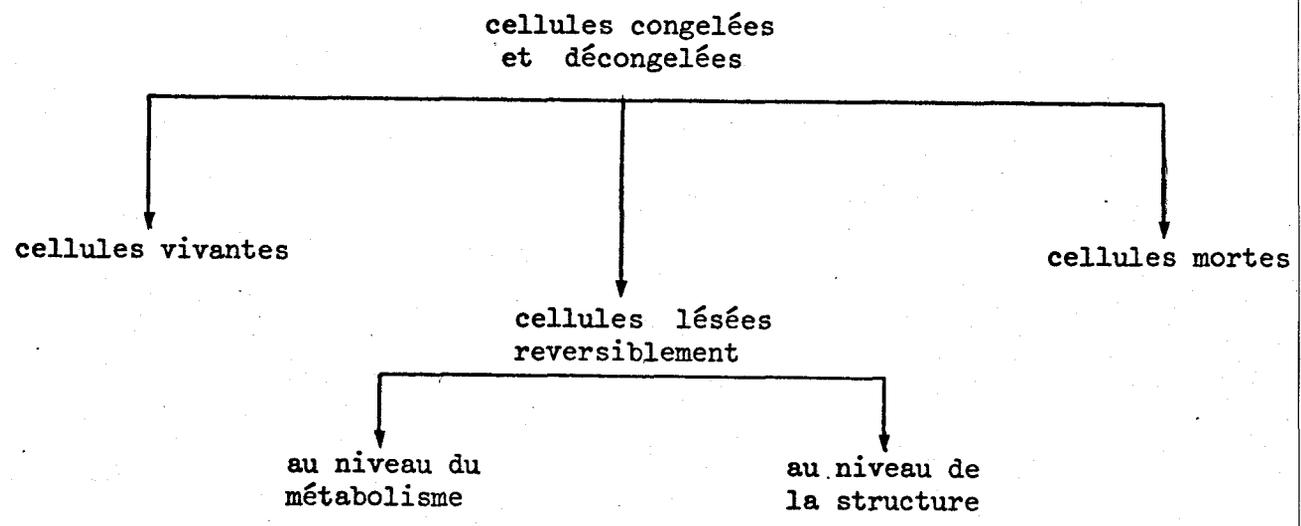
# I N T R O D U C T I O N

Depuis les premiers travaux de PICTET et YUNG (59) en 1884 puis de Mac FADYEN (40) en 1900, qui constataient que leurs cultures survivaient à la congélation, il est apparu que toutes les espèces bactériennes n'avaient pas la même résistance au froid. On sait maintenant que la sensibilité à la congélation et décongélation est sous la dépendance de nombreux facteurs.

En fait, on ne peut pas dire simplement que, après action du froid, la cellule est morte ou vivante. En 1959, STRAKA et STOKES (79) observent que leurs suspensions bactériennes congelées puis décongelées contiennent non seulement des bactéries mortes et des bactéries survivantes mais aussi des bactéries qui ont subi des altérations qui seront reversibles si le milieu de culture le permet. Ces cellules ont leur métabolisme endommagé.

Plus récemment, RAY et coll. (66,68) ont décrit des bactéries qui, après action du froid, sont beaucoup plus sensibles à des substances telles que les sels biliaires, le lysozyme ou les détergents. Ces cellules sont endommagées dans leur structure.

Des termes différents sont donc utilisés pour exprimer les degrés de lésions subies par les microorganismes au cours de la congélation. On peut les résumer dans le schéma suivant :



Les altérations éventuelles subies par la cellule vont dépendre de facteurs physico-chimiques, structuraux et physiologiques.

Il faut enfin préciser que toutes les connaissances acquises sur ce problème sont issues de travaux réalisés en milieu liquide.

## I. CONSIDERATIONS PHYSICO - CHIMIQUES

=====

Les aspects physico-biochimiques consécutifs à l'action du froid chez les microorganismes ont été discutés par MAZURI (43,44, 45) dans différentes revues. On peut en retenir essentiellement les faits suivants : la congélation d'une suspension bactérienne débute évidemment par un fort refroidissement du milieu avant la formation des premiers cristaux de glace. Celle-ci commence théoriquement, pour une solution simple à une température qui définit le point eutectique. Les microorganismes, quant à eux, seront considérés comme formés de nombreuses solutions de composés différents ayant des points de congélation divers. Leur congélation totale s'effectuera donc dans une zone de température qui définira une zone eutectique.

Au cours de cette période critique, le système milieu extérieur - cellules va devoir modifier son équilibre en eau. Le site de congélation de l'eau de ce système va dépendre surtout de la vitesse de congélation, en d'autres termes, de la durée du séjour des cellules dans la zone eutectique :

- si la vitesse de congélation est lente, l'eau intracellulaire va sortir de la cellule et se solidifier extérieurement jusqu'à rétablissement de l'équilibre. La cellule subira alors une déshydratation.

- si la vitesse de congélation est rapide, l'eau intracellulaire gèlera essentiellement in-situ. Mais dans ce cas, les cristaux de glace ont une structure instable. Leur taille et leur forme varient avec la vitesse de congélation (24) .

La recristallisation se produit très lentement en-dessous de  $-100^{\circ}\text{C}$  mais peut se faire très rapidement au-dessus de  $-50^{\circ}\text{C}$ . Ainsi, si la vitesse de congélation est rapide ou si le réchauffement est mené suffisamment doucement, les cristaux auront tendance à changer de taille et de forme.

Mais, dans les deux cas, le rétablissement de l'équilibre aqueux du système, détruit par la congélation, résulte en des déplacements d'eau qui provoquent la concentration des solutés à l'intérieur et à l'extérieur des cellules. Ainsi, le pH et la concentration ionique peuvent varier et avoir pour conséquences la perméabilisation de la membrane cellulaire, la précipitation de certaines molécules, la dénaturation de macromolécules (protéines, A.R.N., A.D.N.). Certaines de ces altérations sont irréversibles (44). Un microorganisme subissant une congélation va donc être affecté par l'abaissement de température (c'est le phénomène de "Cold-Shock"), la formation de glace et la concentration des solutés résultant de cette cristallisation.

L'un de ces phénomènes ou leur combinaison peut être létal.

## II ALTERATIONS SUBIES PAR LES MICROORGANISMES SOUMIS A LA CONGELATION

=====

### A) DOMMAGES MECANIQUES

La formation de cristaux de glace chez les microorganismes au cours de la congélation a été mise en évidence par la microscopie électronique notamment chez Escherichia coli (55,56,65). Les cellules refroidies lentement (vitesse de congélation :  $1^{\circ}\text{C}/\text{mn}$ ) sont contractées mais sans traces de cristaux de glace.

Les cellules congelées très rapidement (vitesse de congélation supérieure à 1000°C/mn) sont de taille normale mais montrent de nombreuses cavités intracellulaires. Ces mêmes cellules conservées trois jours à -25°C possèdent seulement quelques larges cavités intracellulaires.

Les importantes modifications morphologiques ne sont certainement pas sans effet sur la viabilité du microorganisme mais, si on a longtemps pensé que l'action mécanique exercée sur les cellules par la congélation était la cause de mortalité (28,34,92), HARRISON (25) en 1956 contredit cette théorie en signalant que les taux de survie de E. coli et Serratia marcescens étaient identiques dans un bouillon congelé à -22°C et dans un milieu refroidi mais non congelé à cette température. Il suggérait donc que la létalité bactérienne était en relation avec la concentration des solutés. En fait, il est vraisemblable que ces facteurs agissent de façon synergique même s'ils n'ont pas tous la même importance.

#### B) ALTERATIONS STRUCTURALES

Si l'observation directe n'a jamais été effectuée, de nombreux éléments permettent de penser que la membrane cellulaire est endommagée par la congélation. La formation de gros cristaux de glace intracellulaire, la concentration de solutés provoquant la dissociation de protéines (44) font, entre autres, que cette membrane devient perméable, notamment à d'éventuels éléments toxiques de son environnement (61,41).

La paroi bactérienne semble également altérée par la congélation. Chez les Enterobacteriaceae, il est vraisemblable que c'est la couche supérieure lipopolysaccharidique qui est affectée. En effet, après congélation et décongélation, E. coli devient sensible à l'actinomycine D (10) ;

E. coli, Shigella dysenteriae et Salmonella typhi sont sensibles à l'action du lysozyme et de la trypsine, tandis que l'adsorption des phages de la série T, dont le site est la couche lipopolysaccharidique, est réduite de façon significative chez E. coli congelé. (35,69)

Les protéines cellulaires, elles aussi, peuvent être affectées. MOSS et SPECK (52) ont montré que la congélation et décongélation d'E. coli provoquait la libération dans le milieu de suspension de petits peptides biologiquement actifs car ils ont un effet cryoprotecteur lorsqu'ils sont ajoutés au milieu de suspension. GABIS (21) a également observé une augmentation du taux d'acides aminés basiques libres dans le milieu de congélation d'E. coli, ce qui indiquerait une hydrolyse de protéines ribosomales.

Enfin, si l'a été mis en évidence une sortie d'A.R.N. chez des bactéries à Gram négatif congelées, il semble qu'il n'y ait pas de perte d'A.D.N. (49,21)

Toutefois, SWARTZ (81) et récemment ALUR et GRECZ (3) ont montré que la congélation provoquait des cassures monocaténaires sur l'A.D.N. d'E. coli.

### C) ALTERATIONS METABOLIQUES

L'effet du froid sur l'activité enzymatique de la cellule bactérienne est fonction de l'enzyme car la congélation suivie de décongélation active certaines enzymes, en inactive d'autres ou ne les affecte pas. Chez E. coli le processus de congélation-décongélation augmente l'activité respiratoire des cellules survivantes (57). Les phosphorylations sont généralement réduites par la congélation (1)

#### D) ALTERATIONS GENETIQUES

Il ne semble pas que les basses températures par elles-mêmes aient une action sur la stabilité génétique bactérienne, mais ce sujet a été jusqu'alors trop peu étudié (61, 6).

#### E) ALTERATIONS PHYSIOLOGIQUES

Il a été montré que les bactéries à Gram négatif ayant subi par congélation des altérations métaboliques réversibles avaient des besoins nutritifs accrus (79, 52, 49) pour cultiver après décongélation. Il semble que les cellules perdent temporairement certains pouvoirs de synthèse de métabolites.

De toutes façons, les bactéries qui ont survécu à la congélation, et encore capables de se multiplier dans un milieu approprié, montrent souvent une phase de latence prolongée (52, 51, 61)

### III FACTEURS INFLUENCANT LES MICROORGANISMES SOUMIS A LA CONGELATION

=====

MAZUR (44) a divisé les cellules bactériennes végétatives en deux catégories selon leur sensibilité à la congélation et décongélation :

- a) les cellules qui résistent bien aux conséquences immédiates de l'action du froid mais résistent moins bien à une congélation prolongée
- b) les cellules sensibles à la fois aux effets immédiats et prolongés du froid.

Ces deux catégories rassemblent la majeure partie des microorganismes mais il faut y ajouter les germes qui survivent à toutes les conditions de congélation et décongélation ainsi que les germes sensibles à toutes ces conditions.

La réponse des microorganismes aux effets du froid va dépendre de nombreux paramètres :

#### A) L'ESPECE BACTERIENNE

Il est généralement admis que les bactéries à Gram positif résistent mieux que les bactéries à Gram négatif (44,24,93). Si HOLLANDER et NELL (30) rapportent que les mêmes conditions de congélation sont plus létales pour le pneumocoque que pour les coliformes, MAJOR, MAC DOUGAL et HARRISON (42) observent que E. coli, Salmonella gallinarum, S. marcescens, Pseudomonas aeruginosa sont très sensibles à la congélation et décongélation tandis que Staphylococcus aureus, Lactobacillus fermenti et Micrococcus flavum sont moins sensibles.

Mais des variations de résistance chez des souches de même espèce ont été observées aussi bien chez les bactéries à Gram positif qu'à Gram négatif (14,38,77,81,51,89).

#### B) ETAT PHYSIOLOGIQUE DE LA CULTURE

Il a été noté chez E. coli (83) et Pseudomonas (17) que les cellules en phase exponentielle de croissance sont plus sensibles que les cellules en phase stationnaire.

#### C) CONDITIONS DE SUBCULTURE

DAVIS (17) a rapporté que certains sels minéraux tels que  $Mg SO_4$ ,  $NH_4 H_2 PO_4$  et  $K_2 H PO_4$ , permettaient une augmentation conséquente du taux de survie de la bactérie. E. coli cultivé sur un milieu riche a un taux de

survie, après congélation, plus élevé que lorsqu'il a été cultivé sur milieu minimum (70).

FARRELL et ROSE (19) montrent que des suspensions cellulaires placées à -2°C ont une mortalité plus faible chez les germes psychrophiles que chez les mésophiles. Ceci serait dû à une différence de composition lipidique au niveau de la membrane.

MAJOR, MacDOUGAL et HARRISON (42) rapportent que la survie après congélation chez E. coli et S. marcescens peut être fortement augmentée lorsque la subculture a été réalisée sous aération importante.

#### D) LE MILIEU DE CONGELATION

Les milieux de culture habituels contiennent souvent des substances cryoprotectrices telles que des peptones (17,4), des sucres (60,13,75,46) des amino-acides (48,77). Les bactéries sont donc suspendues, avant congélation, dans l'eau ou dans des solutions salines simples. Or, les sels minéraux ont aussi un rôle et notamment le chlorure de sodium qui s'avère renforcer l'action létale de la congélation chez E. coli (13) et Aerobacter aerogenes (60). En général, les sels favorisent la létalité, vraisemblablement en augmentant la concentration des solutés.

#### E) CONCENTRATION DE LA SUSPENSION CELLULAIRE

Souvent, les taux de survie les plus élevés se retrouvent dans les suspensions congelées les plus denses. Cet effet bénéfique est attribué à un rôle cryoprotecteur des métabolites libérés par les cellules altérées. (75,25,42)

#### F) METHODES DE CONGELATION ET DECONGELATION

Nous avons vu que la température et la vitesse de congélation

déterminaient le site de solidification de l'eau cellulaire.

Pour une espèce bactérienne donnée, une congélation lente ou rapide sera dommageable. Le plus grand nombre de survivants sera obtenu à une vitesse de congélation donnée, suffisamment lente pour empêcher une cristallisation intracellulaire de l'eau mais toutefois assez rapide pour réduire le temps d'exposition de la cellule à la concentration des solutés. Chez E. coli, cette vitesse de congélation serait comprise entre 1 et 500°C/mn. La vitesse de décongélation interviendrait aussi car un réchauffement rapide, qui ne permet pas la recristallisation de la glace, est moins préjudiciable qu'un réchauffement lent ; si la vitesse de congélation a été grande ( $> 500^{\circ}\text{C/mn}$ ) (44). NEI, ARAKI et MATSUSAKA (55, 56) trouvent que E. coli résiste bien à une vitesse de congélation comprise entre 0,1 et 10°C/mn.

Au-delà de cette limite, le taux de mortalité augmente avec la vitesse de congélation. Par contre, SWARTZ (80) indique que les meilleurs taux de survie d'E. coli existent quand la vitesse de congélation est de 300°C/mn.

La température de congélation jouerait aussi un rôle mais là encore les avis sont partagés. Car si SATO (75) trouve que la température n'influence pas la sensibilité d'E. coli, AKIMATO (2) indique que les taux de mortalité les plus élevés se trouvent à des températures très basses chez E. coli et S. aureus. En revanche, WEISER et OSTERUD (92) rapportent qu'E. coli congelé rapidement survit bien à la congélation à une température minimale de  $-30^{\circ}\text{C}$ . Au-dessus de ce point, l'effet est plus létal.

Streptococcus lactis montre aussi une survie plus importante lorsqu'il est congelé à  $-196^{\circ}\text{C}$  plutôt qu'à  $-20^{\circ}\text{C}$  (14, 15, 7) Ces quelques exemples plus ou moins contradictoires mettent l'accent sur la complexité de ce problème. Nous signalerons cependant les travaux

de CALCOTT, LEE et MacLEOD (11) qui, en 1976, ont étudié les effets des vitesses de congélation et de réchauffement sur cinq microorganismes : Salmonella typhimurium, Klebsiella aerogenes ; Azotobacter chroococcum, P. aeruginosa, Streptococcus faecalis. Ces bactéries ont un taux de survie minimum pour une vitesse de congélation de 100°C/mn. Au-dessus de cette vitesse, la survie augmente avec le taux de congélation mais la vitesse de décongélation intervient aussi. Les vitesses de congélation lentes qui donnent le maximum de survie sont variables (7 à 11°C/mn).

Enfin, il faut mentionner l'influence de la durée d'action du froid. Les cycles répétés de congélation-décongélation augmentent la létalité (54,30,25) ainsi que le maintien des cellules à basse température. (79,50,22,25)

#### G) INFLUENCE DU MILIEU DE NUMERATION

Le critère utilisé pour déterminer l'effet létal de la congélation étant l'inaptitude pour la bactérie de former une colonie sur un milieu gélosé, il devient évident que la composition de ce milieu est très importante.

Le nombre de bactéries survivantes à un processus de congélation-décongélation sera plus grand sur un milieu nutritif riche comparé à un milieu minimal ou un milieu sélectif. On dénombrera donc toutes les cellules survivantes sur une gélose nutritive non sélective. Les cellules ayant subi des altérations structurales seront capables de former des colonies sur un tel milieu mais non sur milieu sélectif tandis que les cellules ayant vu leur métabolisme altéré ne cultiveront pas sur un milieu minimal.

#### IV MECANISMES DE REPARATION DES ALTERATIONS NON LETALES

=====

Les cellules altérées de façon réversible retrouveront donc leur potentialités si le milieu le permet. Certains composés ont une action plus ou moins bénéfique à ce point de vue. Il s'agit surtout de l'extrait de levure ( 4, 5 ), de la cystéine ( 41 ) de l'acide aspartique ( 37 ). Ces peptides et acides aminés semblent augmenter les synthèses cellulaires ou réduire le déficit en métabolites essentiels des cellules altérées.

En présence de phosphate bipotassique, il semble que E. coli et Salmonella anatum réparent les altérations dues à la congélation par un processus métabolique ( 66, 67 ) qui ne serait pas une synthèse de protéines ou d'acides nucléiques ( 70 ). Par contre, les inhibiteurs de la phosphorylation oxydative empêchent les cellules de recouvrer leur vitalité. Ceci suggère que la synthèse d'A.T.P. est nécessaire à la réparation de ces altérations ( 70, 68, 26, 66 )

#### V CONCLUSION

=====

Cette étude des phénomènes concernés par l'action des basses et très basses températures sur les bactéries a donc mis en évidence la multiplicité et l'importance des facteurs qui régissent la résistance au froid des cellules procaryotes.

Mais il faut à nouveau signaler le fait que toutes ces théories dérivent d'expériences réalisées à l'aide de suspensions cellulaires en milieu aqueux.

Or, nous ne savons pas si les microorganismes se comportent de la même façon lorsqu'ils sont congelés à la surface d'un milieu solide, dans des conditions telles que n'interviennent plus deux des facteurs importants : le milieu de suspension et les interactions cellulaires.

MINO SOTELO (47), étudiant les effets des basses et très basses températures chez E. coli congelé à la surface d'une membrane filtrante, a vérifié que certains paramètres, tels que l'âge de la subculture et l'influence du milieu de dénombrement des germes survivants, agissaient de la façon décrite dans des travaux antérieurs.

L'utilisation d'un support solide de congélation, nous a semblé un procédé intéressant pour aborder un phénomène bactériologique particulier. On sait que les spores bactériennes sont très résistantes aux agents anti-bactériens. Le froid pouvant être considéré comme l'un de ces agents pour les cellules végétatives, en est-il de même pour les spores ?

Par le biais de l'étude de leur thermorésistance, est-il possible d'apporter une explication à la cryorésistance éventuelle de ces spores ? C'est ce que nous avons tenté de réaliser mais auparavant, il nous fallait éprouver la validité de notre méthode en étudiant la cryorésistance d'une série de microorganismes congelés selon notre conception.

CHAPITRE I

SURVIE DE MICROORGANISMES CONGELES SUR  
SUPPORT SOLIDE

I MATERIEL ET METHODES :

=====

A) MICROORGANISMES UTILISES ET SUBCULTURES

Douze microorganismes représentatifs de la microflore des produits alimentaires ont été choisis : il s'agit de :

1 - Bacilles à Gram négatif

Des Enterobacteriaceae pathogènes ou témoins de contamination fécale :

Escherichia coli

Citrobacter freundii

Salmonella pullorum-gallinarum

Un Pseudomonadaceae fréquent dans les eaux ou responsable d'altérations de produits alimentaires :

Pseudomonas fluorescens

2 - Coccis à Gram positif

Staphylococcus aureus

Streptococcus faecalis var. zymogenes

3 - Bacilles à Gram positif

Formes végétatives de Bacillus cereus

Formes végétatives de Bacillus pumilus

#### 4 - Spores de moisissures

Penicillium Sp.

Aspergillus Sp

#### 5 - Levures

Rhodotorula muscilaginosa

Candida albicans

#### 6 - subcultures

Les subcultures de ces microorganismes ont été réalisées sur des milieux, à des températures et des temps différents selon le germe considéré (Tableau I). Les spores de moisissures sont mises en suspension dans de l'eau physiologique additionnée de peptone tryptique de caséine (1 g/l) avant inoculation.

#### B) SUPPORT SOLIDE DE CONGELATION

Pour les bactéries il est constitué par un milieu gélosé à 50 g d'agar/litre d'eau distillée, coulé en boîtes de Petri. Cette concentration évite à la gélose de se rétracter et d'exsuder une quantité d'eau trop importante au cours des processus de congélation et de décongélation.

Il nous a paru intéressant de ne pas utiliser de milieux nutritifs car ils contiennent habituellement des substances comme les peptones pouvant protéger les cellules de l'action du froid (17, 4) .

Microorganismes	Milieux	Température d'incubation	Durée d'incubation
<u>Bacilles à Gram négatif</u> Enterobactéries <u>P. fluorescens</u>	Eau peptonée Eau peptonée	37°C 30°C	18 H 18 H
<u>Cocci à Gram positif</u>	Bouillon nutritif	37°C	18 H
<u>Formes végétatives de Bacillus</u>	Bouillon dextrose Tryptose additionné d'amidon soluble	30°C	18 H
<u>Spoires de moisissures</u>	gélose glucosée à l'oxytétracycline	20°C	8 jours
<u>Levures</u> R. <u>muscilaginosa</u> C. <u>albicans</u>	Bouillon glucosé à l'oxytétracycline	20°C 37°C	2 jours 18 H

TABLEAU I : Milieux et conditions de subcultures des microorganismes



Pour les spores de moisissures et les levures, le support de congélation est un milieu glucosé à l'oxytétracycline, gélosé à 50 g d'agar/l. Celui-ci est aussi le milieu de croissance car l'aérophilie de ces germes impose que leur culture s'effectue en surface.

### C) PREPARATION DES ECHANTILLONS ET TEMOINS

Les cultures en suspensions de microorganismes sont diluées dans l'eau physiologique additionnée de peptone tryptique de caséine (1 g/l). 0,1 ml des dilutions convenables sont étalés sur les supports gélosés.

Les témoins sont réalisés par des numérations avant congélation sur des milieux gélosés correspondant aux milieux de subculture.

### D) CONGELATIONS

Les congélations à  $-150^{\circ}\text{C}$  ont été réalisées dans un caisson CCF 40 de la Société "Air Liquide". Le schéma de cet appareil fait l'objet de la figure 1. La réfrigération est obtenue par vaporisation contrôlée d'azote liquide. La température est homogénéisée à l'intérieur du caisson, par circulation de l'azote gazeux, à l'aide d'un ventilateur. L'excédent d'azote étant évacué par une tuyauterie située en amont du ventilateur. L'alimentation de l'injecteur en azote liquide est contrôlée par une électro-vanne commandée par un coffret de régulation en fonction des indications fournies par une sonde de platine placée dans la veine gazeuse en amont des plateaux supportant la charge à congeler.

Une résistance électrique blindée permet le dégivrage rapide de l'appareil.

Un congélateur ménager a été utilisé pour les températures de  $-20^{\circ}\text{C}$ .

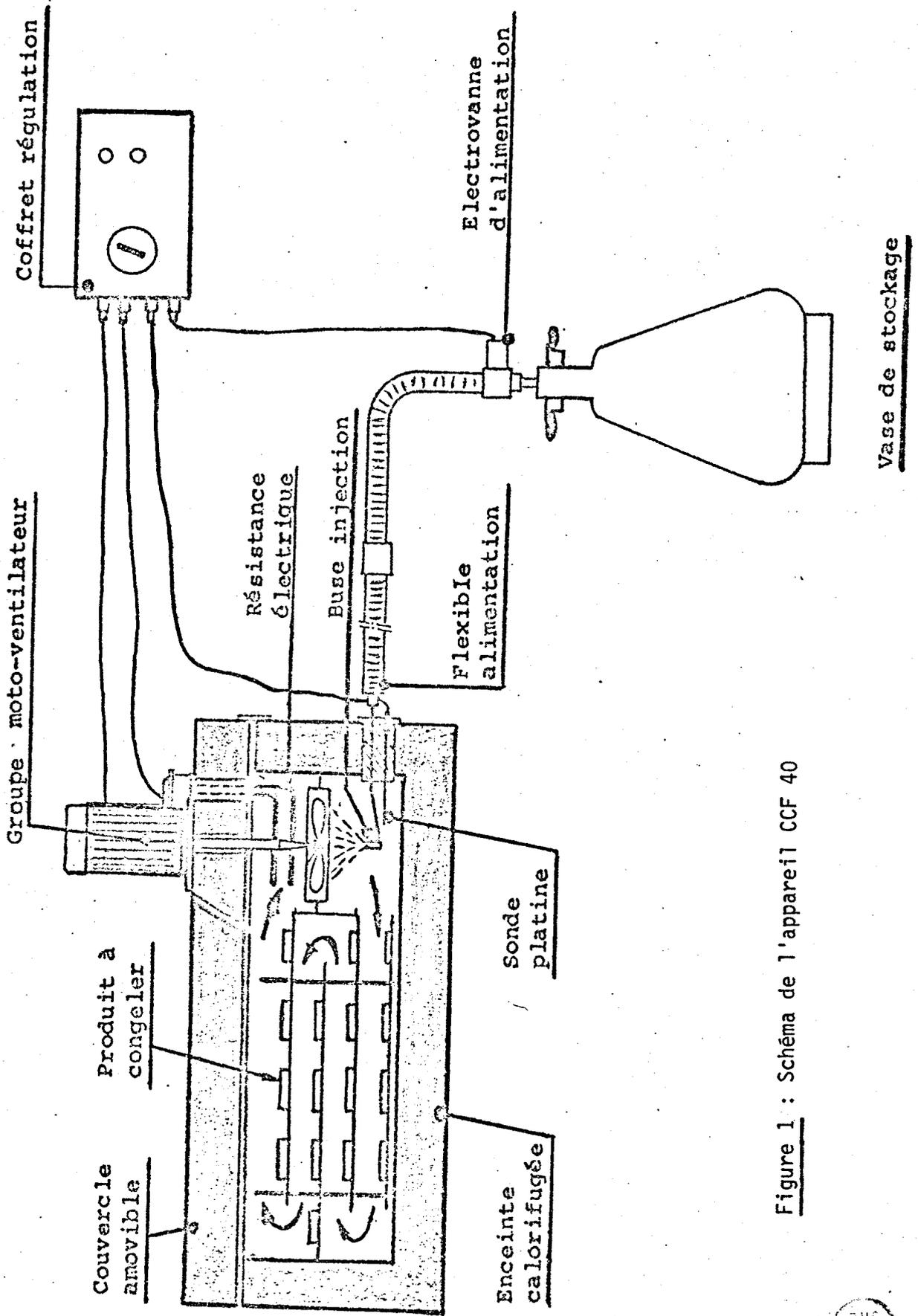


Figure 1 : Schéma de l'appareil CCF 40



Six modes de congélation, à des vitesses de refroidissement lentes ou très lentes, proches de certaines conditions utilisées pour la congélation de produits alimentaires, ont été choisis :

A : congélation à  $-150^{\circ}\text{C}$  en 10 mn (vitesse de congélation :  $15^{\circ}\text{C}/\text{mn}$ ), simulant l'utilisation de tunnel à azote liquide, puis maintien à  $-20^{\circ}\text{C}$  24 heures.

B : congélation à  $-150^{\circ}\text{C}$  en 40 mn (vitesse de congélation :  $4^{\circ}\text{C}/\text{mn}$ ) puis maintien à  $-20^{\circ}\text{C}$  24 heures.

C : maintien à  $-20^{\circ}\text{C}$  24 heures (vitesse de congélation ( $0,2^{\circ}\text{C}/\text{mn}$ ) simulant le stockage en chambre froide.

D : maintien à  $-20^{\circ}\text{C}$ , 24 heures puis descente à  $-150^{\circ}\text{C}$  en 10 mn simulant l'emploi combiné des méthodes C et A

E : congélation à  $-150^{\circ}\text{C}$  en 40 mn puis maintien à  $-20^{\circ}\text{C}$  - 8 jours.

F : maintien à  $-20^{\circ}\text{C}$  - 8 jours.

Des études de survie de microorganismes au cours d'un séjour prolongé à  $-20^{\circ}\text{C}$  ont également été réalisées en plaçant les supports solidesensemencés au congélateur.

Dans tous les cas, les boîtes de Petri restent fermées pour éviter les contaminations.

#### E) DECONGELATION

Elle s'effectue en plaçant les boîtes congelées dans une étuve à  $37^{\circ}\text{C}$  durant 2 heures pour permettre l'évaporation de l'eau provenant de la décongélation de la gélose, condition indispensable pour obtenir des colonies bien isolées.

## F) MISE EN EVIDENCE DES MICROORGANISMES SURVIVANTS

Les plaques de gélose sont recouvertes, après décongélation et séchage par 15 ml de milieu nutritif gélosé convenant au microorganisme considéré et incubées.

Dans le cas des spores de moisissures et des levures qui ont été congelées sur un milieu nutritif complet, les supports gélosés sont incubés immédiatement après décongélation et séchage.

Les colonies sont comptées et les taux de survie sont calculés par rapport aux numérations des subcultures.

Les expériences sont répétées au moins trois fois pour chaque espèce microbienne.

Dans le cas de l'étude de la survie des germes au cours d'un maintien prolongé à  $-20^{\circ}\text{C}$ , les conditions de congélation et décongélation sont celles précisées auparavant. Après incubation, les boîtes contenant un nombre de colonies comptable sont énumérées. Les résultats sont exprimés en nombre de cellules survivantes par ml de culture initiale.

## III RESULTATS ET DISCUSSION

=====

Les taux de survie des germes sont présentés dans le tableau II.

Les spores de moisissures et les levures étudiées s'avèrent très résistantes au froid.

Chez les bactéries on observe généralement que la sensibilité des germes à la congélation est fonction de l'espèce considérée. Les cocci à Gram positif résistent mieux que les bacilles à Gram négatif mais on peut

encore remarquer des différences au sein de ces deux groupes.

Par contre, les formes végétatives des bacilles à Gram positif présentent des taux de survie très bas. Etant donné les variations considérables de résistance selon les espèces bactériennes à Gram positif, il semble que la composition particulière de la paroi de ces bactéries ne peut pas expliquer à elle seule leur résistance au froid.

Le mode de congélation est également important. Pour les bactéries exposées au froid à la surface d'un support solide, le taux de survie augmente avec la vitesse de congélation.

Nos conditions A et B donnent des taux de survie très voisins tandis que C et D sont beaucoup plus létales. Il semble donc que, comme en milieu liquide, l'un des facteurs à envisager, lors de la congélation de microorganismes en surface d'un milieu solide, est la durée de passage de la cellule dans la zone eutectique ( $-2^{\circ}\text{C}$  à  $-20^{\circ}\text{C}$ ). La survie des microorganismes, dans nos conditions expérimentales, doit donc être en relation avec la vitesse de congélation. Il est intéressant de constater que nous pouvons rapprocher nos conclusions des hypothèses de MAZUR (43,44,45) issues de travaux réalisés en milieu liquide, alors que l'on aurait pu penser que les microorganismes placés à la surface d'un milieu solide, allaient passer brutalement de la température ambiante à la température de congélation tandis qu'en milieu liquide, ce passage pouvait être graduel.

L'action prolongée du froid influence également les taux de survie. D'une part, les modes de congélation E et F du Tableau II montrent, dans certains cas, des taux de mortalité très élevés par rapport aux autres modes. D'autre part, les courbes de la figure 2 montrent, pour les germes étudiés, qu'après une destruction plus ou moins importante selon l'espèce

Microorganismes	Mode de congélation					
	-150°C en 10 mn puis maintien à -20°C - 24 H (vitesse de congélation 15°C/mn)	-150°C en 40 mn puis maintien à -20°C - 24 H (vitesse de congélation 4°C/mn)	Maintien à -20°C - 24 H (vitesse de congélation 0,2°C/mn)	Maintien à -20°C - 24 H puis -150°C en 10 mn	-150°C en 40 mn puis maintien à -20°C - 8 j.	Maintien à -20°C - 8j.
<u>E. coli</u>	0,46	0,44	0,32	0,29	$2 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-3}$
<u>C. freundii</u>	0,15	0,13	0,13	0,12	0,04	$8 \cdot 10^{-3}$
<u>S. pullorum-gallinarum</u>	0,13	0,085	0,09	0,04	$8 \cdot 10^{-3}$	$10^{-3}$
<u>P. fluorescens</u>	0,13	0,035	0,016	$8 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-3}$
<u>S. aureus</u>	0,84	0,75	0,70	0,50	0,15	0,15
<u>S. faecalis</u>	0,72	0,59	0,52	0,40	0,25	0,25
<u>B. cereus</u>	$6 \cdot 10^{-5}$	$4 \cdot 10^{-5}$	$2,5 \cdot 10^{-6}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-5}$
<u>B. pumilus</u>	$10^{-5}$	$6 \cdot 10^{-5}$	$10^{-6}$	$2 \cdot 10^{-6}$	$10^{-5}$	$2 \cdot 10^{-6}$
<u>Spores de Penicillium sp.</u>	1	1	1	1	1	1
<u>Spores de Aspergillus sp.</u>	1	1	1	1	1	1
<u>C. albicans</u>	0,95	0,75	0,86	0,82	0,60	0,75
<u>R. muscilaginosa</u>	0,80	0,85	0,80	0,85	0,70	0,57
Base : 1 = Numérations avant congélation des subcultures						



TABLEAU II : Taux de survie des microorganismes en fonction du mode de congélation.

considérée, due à la congélation initiale, il y a prolongation de l'effet létal au cours du maintien à basse température. Si cet effet est faible pour un germe résistant au froid tel que R. muscilaginosa, il est nettement plus important pour des germes plus sensibles comme E. coli ou S. aureus.

L'extension de la létalité au cours du maintien à basse température pourrait être due à l'exposition prolongée des cellules à la concentration des solutés.

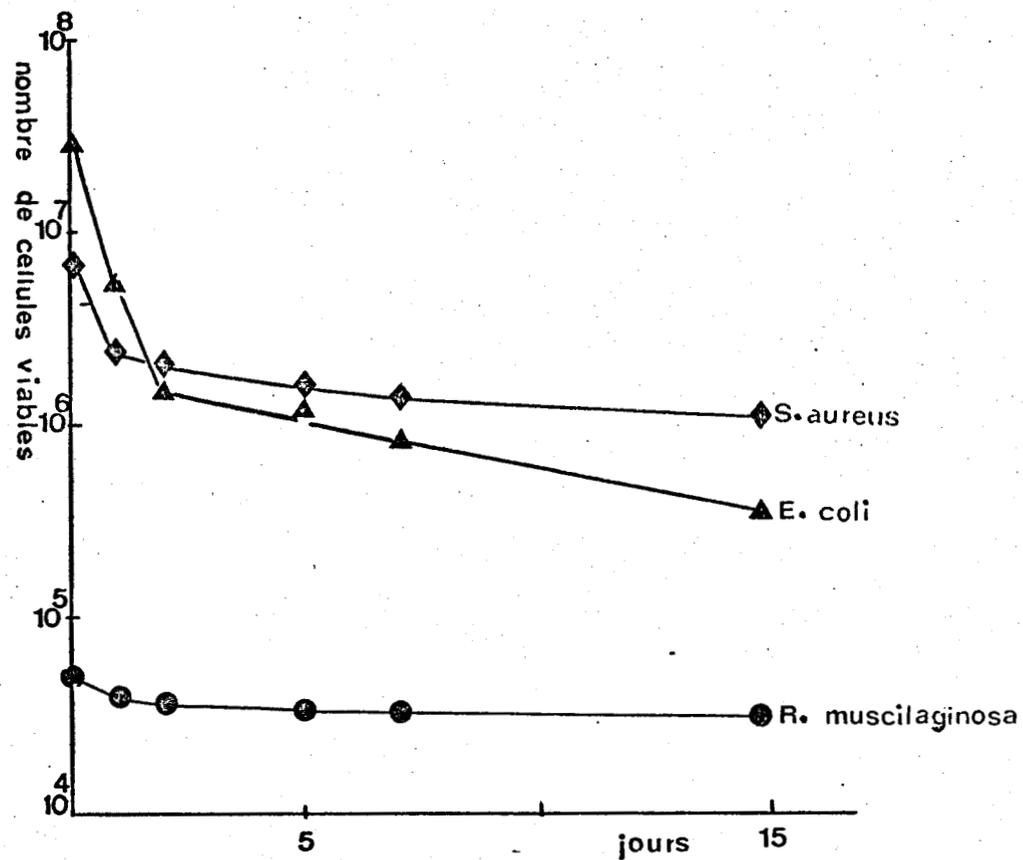


Fig. 2 : Survie de microorganismes au cours du maintien prolongé à -20°C.

La recristallisation de la glace au cours de ce maintien à  $-20^{\circ}\text{C}$  interviendrait également avec son action dommageable sur la membrane bactérienne, mais elle est certainement plus importante pour la méthode E où la première congélation à  $-150^{\circ}\text{C}$  a sans doute formé des petits cristaux de glace instables qui vont changer de taille et de forme au cours de ce maintien à une température supérieure à  $-50^{\circ}\text{C}$ .

Toutefois, l'un des faits saillants de cette expérimentation demeure l'extrême sensibilité des formes végétatives de Bacillus à la congélation. Certes, on connaît la relative fragilité physiologique de ces bactéries mais on ne s'attendait pas à observer une létalité aussi considérable lors de l'exposition aux basses températures. On peut à nouveau se demander si le phénomène de sporulation n'est pas une défense contre la destruction des formes végétatives placées dans des conditions défavorables, permettant ainsi la continuité de l'espèce.

Dans ce cas, la cryorésistance des spores devrait être plus grande que celle des formes végétatives, comme cela se produit pour la thermorésistance. Or, c'est effectivement ce qui se réalise, comme l'indique le Tableau III comparant la résistance des cellules végétatives de B. cereus et B. pumilus à trois modes de congélation, avec la résistance de leurs spores congelées selon les mêmes techniques

S o u c h e s	Modes de congélation		
	A	C	E
<u>B. cereus</u>			
- Formes végétatives	$6.10^{-5}$	$2,5.10^{-6}$	$10^{-5}$
- Spores	$10^{-2}$	$10^{-2}$	$7,5.10^{-4}$
<u>B. pumilus</u>			
- Formes végétatives	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-5}$
- Spores	0,7	0,5	0,65

TABLEAU III : Taux de survie des formes végétatives et spores de B. cereus et B. pumilus congelés selon A, C et E.

Les taux de survie sont très considérablement augmentés lorsque l'on passe de l'état végétatif à l'état sporulé. Il s'agit donc de l'apparition de phénomènes nouveaux qui renforcent notre idée de choisir l'étude des résistances de ces spores comme modèle expérimental.

#### IV CONCLUSION

=====

Il apparaît donc à la suite de cette expérimentation, que la survie des microorganismes congelés à la surface d'un milieu solide dépend, entre autres facteurs, de l'espèce bactérienne, de la vitesse de congélation, de la durée d'exposition au froid. Ces résultats concordent avec les théories émises à la suite de travaux réalisés en milieu liquide car nous concluons également que les bactéries à Gram positif sont plus résistantes que les bactéries à Gram négatif, hormis le cas particulier des Bacillus. De plus, l'importance de la durée de passage de la cellule dans sa zone eutectique est également confirmée par le fait qu'une congélation lente est plus dommageable qu'une congélation plus rapide.

Enfin, nous pouvons aussi supposer que la mort des cellules bactériennes au cours d'un maintien en congélation est due à la recristallisation de la glace et à l'exposition prolongée aux solutés concentrés à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule. De toutes façons, comme en milieu liquide (79, 93, 22, 33) nous constatons qu'au cours d'un maintien à basse température le taux de mortalité est initialement élevé puis s'atténue.

Etant donc en accord avec les hypothèses concernant l'action du froid sur les bactéries, nous avons adopté les techniques décrites pour

aborder l'étude de la cryorésistance des spores de Bacillus et, parallèlement, voir si l'on pouvait envisager une relation avec la thermorésistance. Ce modèle expérimental initialement envisagé trouve encore sa justification dans le fait que les spores de B. cereus et B. pumilus sont beaucoup plus cryorésistantes que les formes végétatives. Or, on constate le même phénomène en ce qui concerne la thermorésistance.

Signalons enfin que notre technique pourrait être utilisée dans un autre but. En effet, nos résultats montrent qu'une congélation lente suivie d'une conservation prolongée à basse température provoque la plus grande diminution du nombre de microorganismes sur la surface d'un milieu solide qui serait celle d'un produit alimentaire, si l'on fait abstraction de l'altération éventuelle des caractères physico-chimiques du produit au cours d'une telle congélation et si l'on ne tient pas compte de l'état de surface réel de la denrée. Toutefois, notre technique se rapprochant des conditions habituelles de congélation des aliments, elle permet une approche convenable de la survie des microorganismes contaminant la surface des aliments destinés à être congelés.

CHAPITRE I I

CRYORESISTANCE DES SPORES DE BACILLUS  
RELATION AVEC LA THERMORESISTANCE

I MATERIEL ET METHODES

=====

A) SOUCHES UTILISEES

Nous avons étudié les souches de Bacillus suivantes :

- Bacillus cereus souche B C 1
- Bacillus cereus souche B C 2
- Bacillus coagulans souche B C 0 1
- Bacillus coagulans souche B C 0 2
- Bacillus licheniformis souche B L 1
- Bacillus pumilus souche B P 1
- Bacillus subtilis souche B S 1

Les abréviations (BC 1, B C 0 1 etc...) sont les noms de code que nous avons donné à nos souches pour la commodité des manipulations.

B) OBTENTION DES SPORES

Les spores ont été obtenues en laissant vieillir des cultures sur gélose nutritive durant deux mois, à la température ambiante.

C) CULTURE DES FORMES VEGETATIVES

Elles sont réalisées sur un bouillon dextrosé et tryptosé additionné d'amidon soluble (D.T.B. amidon). Les cultures se font à 30°C durant 18 heures.

#### D) PREPARATION DES ECHANTILLONS

Les spores sont recueillies sur les géloses nutritives par remise en suspension dans un tampon phosphate 0,2 M à pH 7.

Les suspensions sont ensuite chauffées 10 mn à 80°C pour éliminer les cellules végétatives résiduelles.

La préparation des échantillons à congeler et des témoins est réalisée de la façon décrite précédemment.

#### E) CONGELATIONS- DECONGELATION - MISE EN EVIDENCE DES GERMES SURVIVANTS

Toutes ces techniques ont été précisées au chapitre I. Le milieu de mise en évidence des germes survivants est le D.T.B. amidon gélosé à 15 g d'agar/litre. Les températures d'incubation sont de 30°C.

#### F) THERMORÉSISTANCE DES SPORES

Des parties aliquotes des suspensions de spores en tampon phosphate à pH 7 sont réparties, à raison de 0,5 ml, dans des tubes de 18 x 0,9 placés au bain-marie bouillant. Des tubes sont retirés à des temps différents croissants et leur contenu versé dans 15 ml de D.T.B. amidon.

La durée de résistance à 100°C est déterminée par le dernier flacon de D.T.B. amidon présentant une culture après incubation à 30°C.

Les spores des différentes espèces de Bacillus ont été classées de la façon suivante :

- . Thermorésistance à 100°C : moins de 10 mn
- . " " " : 10 à 20 mn
- . " " " : supérieure à 20 mn.

## II RESULTATS ET DISCUSSION

Le Tableau IV montre que pour une espèce de Bacillus donnée, les spores ont un taux de survie pratiquement identique quelle que soit la technique de congélation utilisée. Ceci est un point surprenant car ce résultat diverge de ceux obtenus précédemment, où le taux de survie des bactéries végétatives augmentait avec la vitesse de congélation. Nous ne pouvons fournir d'explications à ce phénomène. On peut tout au plus supposer que les vitesses de congélation ne présentent pas d'écart suffisants pour affecter différemment les spores d'une même espèce.

En revanche, on note des variations importantes de sensibilité en fonction de l'espèce. Ceci pouvant aller de la résistance importante (B S1) à une très grande destruction (B C1).

S P O R E S		M o d e s   d e   c o n g é l a t i o n						
		A	B	C	D	E	F	
THERMORESISTANCES	à 100°C inf. à 10 mm	<u>B. cereus</u> B C 1	$10^{-2}$	$7,5 \cdot 10^{-4}$	$10^{-2}$	$5 \cdot 10^{-3}$	$7,5 \cdot 10^{-4}$	$5 \cdot 10^{-3}$
		<u>B. cereus</u> B C 2	$5 \cdot 10^{-5}$	$10^{-5}$	$5 \cdot 10^{-5}$	$2 \cdot 10^{-5}$	$3 \cdot 10^{-5}$	$10^{-5}$
	à 100°C de 10 à 20 mm	<u>B. coagulans</u> B C O 1	0,10	0,20	0,20	0,21	0,19	0,26
		<u>B. coagulans</u> B C O 2	0,14	0,12	0,11	0,09	0,10	0,10
		<u>B. licheniformis</u> B L 1	0,30	0,25	0,25	0,30	0,30	0,36
	à 100°C sup. à 20 mm	<u>B. pumilus</u> B P 1	0,70	0,65	0,50	0,60	0,65	0,65
		<u>B. subtilus</u> B S 1	0,58	0,70	0,58	0,58	0,64	0,70

Base 1 : Numération des subcultures avant congélation

TABLEAU IV : Taux de survie des spores de Bacillus congelées.

Mais il est intéressant de constater que la cryorésistance de ces spores semble parallèle à leur thermorésistance, en ce sens que les spores capables de résister le plus longtemps à 100°C sont également celles qui présentent les taux de survie les plus élevés après congélation et il existe de grandes différences de sensibilité au froid entre les trois catégories de spores classées selon leur thermorésistance.

On pouvait penser que le chauffage de la suspension de spores avant congélation sélectionnait les formes résistantes et était ainsi responsable de l'uniformité des taux de survie en dépit de techniques de congélation diverses. Nous avons fait subir trois modes de congélation différents : A, C et F à des spores chauffées et non chauffées d'une espèce ayant une thermorésistance et une cryorésistance intermédiaires : B. coagulans (souche B C O 1)

MODES DE CONGELATION	s u r v i e   a p r è s   c o n g é l a t i o n	
	suspension de spores chauffée (80° - 10 mn) avant congélation	suspension de spores non chauffée avant congélation
A	0,33	0,30
C	0,25	0,30
F	0,31	0,40

*Base 1 : Numération des subcultures avant congélation.*

**TABLEAU V** : Taux de survie après congélation de spores chauffées et non chauffées de B. coagulans (B C O 1)

Le Tableau V montre que les taux de survie ne présentent pas de variations significatives. Il ne semble donc pas que nous ayons opéré une

sélection de spores au stade de la préparation de l'inoculum.

Nous avons également vérifié que les formes végétatives des Bacillus utilisés ne présentaient pas de résistance particulière aux basses températures, en contradiction avec la grande sensibilité mise en évidence au chapitre précédent. Nous avons donc congelé selon le mode C des cultures non sporulées de ces germes. Les résultats du Tableau VI confirment que la très grande létalité, due au froid, chez les formes végétatives de Bacillus est une règle applicable au moins aux espèces que nous avons étudiées.

SOUCHES	TAUX DE SURVIE
B C 1	$2,5 \cdot 10^{-4}$
B C 2	$2,3 \cdot 10^{-5}$
B C 0 1	$2 \cdot 10^{-7}$
B C 0 2	$1,2 \cdot 10^{-5}$
B L 1	$5 \cdot 10^{-7}$
B P 1	$2 \cdot 10^{-4}$
B S 1	$1,5 \cdot 10^{-5}$

*Base 1 : Numération des subcultures avant congélation*

**TABLEAU VI** : Taux de survie des formes végétatives de Bacillus congelées à  $-20^{\circ}\text{C}$  24 H.

### III CONCLUSION

=====

Le fait qu'il y ait une très grande différence entre les sensibilités au froid des cellules végétatives et des spores de Bacillus, amène à penser que l'acquisition de cette résistance est liée au processus de sporulation. La relation qui semble exister entre la cryorésistance et la thermorésistance renforce cette hypothèse car l'on sait que ce dernier phénomène apparaît effectivement dans les dernières étapes de formation de la spore.

Il nous a donc paru intéressant d'approfondir le problème en tentant de comparer les moments d'apparition des résistances aux deux agressions physiques durant la sporulation.

CHAPITRE III

APPARITION DE LA CRYORESISTANCE ET DE  
LA THERMORESISTANCE AU COURS DE LA  
SPORULATION

I MATERIEL ET METHODES :

=====

A) ETABLISSEMENT DES RESISTANCES AU COURS DE LA SPORULATION

Pour cette étude, nous avons choisi la souche B C 1 de B. cereus qui nous semble suffisamment sensible aux agents thermiques pour présenter des variations significatives des taux de survie au cours de la sporogénèse. Celle-ci a été conduite selon une technique de sporulation en masse qui est presque totale en 8 heures et a une synchronisation acceptable. Les bactéries sont cultivées, dans un premier temps, sur bouillon nutritif durant 16 heures, à 30°C avec agitation. Cette préculture est centrifugée, lavée par du tampon phosphate 0,2 M à pH 7. Le culot est repris dans un volume du milieu minéral de SCHAEFFER et coll. (76) identique au volume de préculture. Toutefois, pour permettre un épuisement rapide du milieu sans empêcher l'initiation de la sporulation, la concentration en glucose a été abaissée à 0,1 g/l. La suspension cellulaire est mise en agitation, à 30°C et cet instant est pris comme temps zéro ( $t_0$ ).

Des prélèvements sont effectués toutes les 90 minutes et le déroulement correct de la sporulation est contrôlé à l'aide d'un microscope optique à contraste de phase LEITZ Ortholux.

Les prélèvements sont dilués dans le tampon phosphate 0,2 M à pH 7 pour être soumis à la chaleur et au froid selon les modalités suivantes :

D'une part : 0,1 ml des dilutions convenables sont étalés sur nos supports gélosés maintenus à + 4°C pour permettre un refroidissement rapide de l'échantillon. Les plaques de gélose ensemencées sont placées au congélateur à -20°C durant 24 heures (la modalité de congélation C a été retenue pour sa simplicité d'utilisation).

La décongélation et la mise en évidence des germes survivants ont été décrites au chapitre I. Le milieu utilisé est le D.T.B. amidon gélosé.

D'autre part, des parties aliquotes de 0,5 ml des dilutions  $10^{-3}$  ont été placées dans des tubes de 18 x 0,9 et chauffées au bain-marie à 100°C durant 1 minute ou à 80°C durant 10 minutes. Après refroidissement, 0,1 ml de chacune des fractions sont aussitôt déposés dans une boîte de Pétri et numérés selon la technique de double couche sur D.T.B. amidon gélosé.

Des témoins sont également réalisés par la méthode de double couche.

Après incubation à 30°C des différentes séries, les colonies sont comptées et les résultats exprimés en nombre de cellules revivifiables par ml de culture initiale.

Enfin, certains échantillons ont été soumis successivement à l'action du froid puis de la chaleur. Pour cela, des volumes de 5 ml de culture sont filtrés sur membrane Millipore (porosité 0,45  $\mu$ ). Les filtres sont placés au congélateur à -20°C durant 24 heures puis, après congélation, lavés dans 10 ml de tampon phosphate 0,2 M pH 7. Les suspensions de spores ainsi obtenues sont diluées dans le tampon et numérées avant et après chauffage à 100°C pendant 1 mn, selon le protocole décrit précédemment.

Le premier dénombrement donne un nombre de spores ayant survécu à la congélation.

Le second dénombrement donne le nombre de spores ayant survécu à la congélation suivie de chauffage.

### B) UTILISATION DE MUTANTS ASPOROGENES

La seconde partie de cette étude a été réalisée à l'aide de mutants asporogènes et de la souche sauvage de B. subtilis Marburg (CIP 5265). Les souches nous ont été fournies par le Professeur P. SCHAEFFER. Il s'agit des mutants :

OA <sub>3</sub> NA	bloqué au stade	0	de la sporulation			
II <sub>A</sub> 20 T	"	"	"	II	"	"
III <sub>834</sub>	"	"	"	III	"	"
IV 11 T	"	"	"	IV	"	"
V <sub>914</sub> Try <sup>-</sup>	"	"	"	V	"	"

La plupart de ces mutants ont été caractérisés cytologiquement par RYTER, SCHAEFFER et IONESCO (74) et génétiquement par IONESCO, MICHEL, CAMI et SCHAEFFER (31)

B. subtilis Marburg et ses mutants ont été cultivés sur le milieu de SCHAEFFER et coll. (76) durant trois jours, avec agitation à 30°C. Pour le mutant V<sub>914</sub> Try<sup>-</sup> exigeant en tryptophane, le milieu est complété en cet acide aminé à raison de 40 µg/ml.

La réalisation des essais de thermorésistance, cryorésistance et les témoins ont été effectuées comme pour B. cereus. Les résultats sont donnés

en taux de survie des spores.

Enfin, la cryorésistance à  $-20^{\circ}\text{C}$  durant 24 h des formes végétatives de ces souches, obtenues par culture à  $30^{\circ}\text{C}$  en D.T.B. amidon, a également été contrôlée par les techniques précédentes.

### C) MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

Les dernières étapes de la sporulation ont également été contrôlées en microscopie électronique. 10 ml de culture sont préfixés par 1 ml d'acide osmique à 2 p. 100 en tampon Veronal/Acétate à pH 6 et centrifugés. Le culot est repris par 1 ml d'une gélose à 15 g d'agar par litre d'eau distillée, maintenue à  $45^{\circ}\text{C}$ . Cette gélose est solidifiée sur une lame de verre et découpée en petits blocs de 1 mm<sup>3</sup>. Ce matériel est traité selon RYTER et KELLENBERGER (73). La deshydratation se fait à l'acétone et l'inclusion dans l'araldite selon GLAUERT et GLAUERT (23). Toutefois, les temps d'imprégnation par la résine sont considérablement augmentés (5 à 7 jours) car les spores laissent difficilement pénétrer l'araldite.

Les coupes sont réalisées sur "PORTER-BLUM SORVALL", recueillies sur grilles nues et contrastées par le citrate de plomb selon REYNOLDS (71). L'observation est faite au microscope électronique HITACHI HU 11 E sous une tension de 50 KV.

## II RESULTATS ET DISCUSSION

=====

Pour établir les courbes de la figure 3, nous avons effectué une série de manipulations préliminaires dont les résultats concordants ont permis de choisir une zone de travail qui a été utilisée pour les expériences relatives à cette figure. Ces courbes, réalisées en fonction du temps de sporulation, montrent l'augmentation du nombre de cellules sporangiales de B. cereus résistantes à nos traitements thermiques. Nous n'avons considéré que les événements intervenant en fin du processus car, aux stades antérieurs, les préspores sont encore trop proches des formes végétatives, sinon dans leur structure, tout au moins en ce qui concerne leurs résistances.

Le fait remarquable est le décalage d'une heure existant entre l'acquisition d'une cryorésistance pratiquement maximale et une thermorésistance également proche de son optimum. La sensibilité au froid régresse très fortement vers la fin du stade V de sporulation tandis que l'on sait, et nos courbes le confirment, que la thermorésistance s'établit au stade VI, avec la maturation de la spore. Ces résistances ne sont toutefois pas complètes à ces stades puisque les taux de survie croissent jusqu'à  $t_{24}$  pour atteindre une valeur commune de 0,6. Ces résultats appellent quelques commentaires :

1°) Le taux de survie au froid est de 0,6 alors que dans une expérimentation précédente, les spores de ce même microorganisme, congelées de la même façon à  $-20^{\circ}\text{C}$  durant 24 h n'avaient un taux de résistance que de 0,01 (voir Tableau IV).

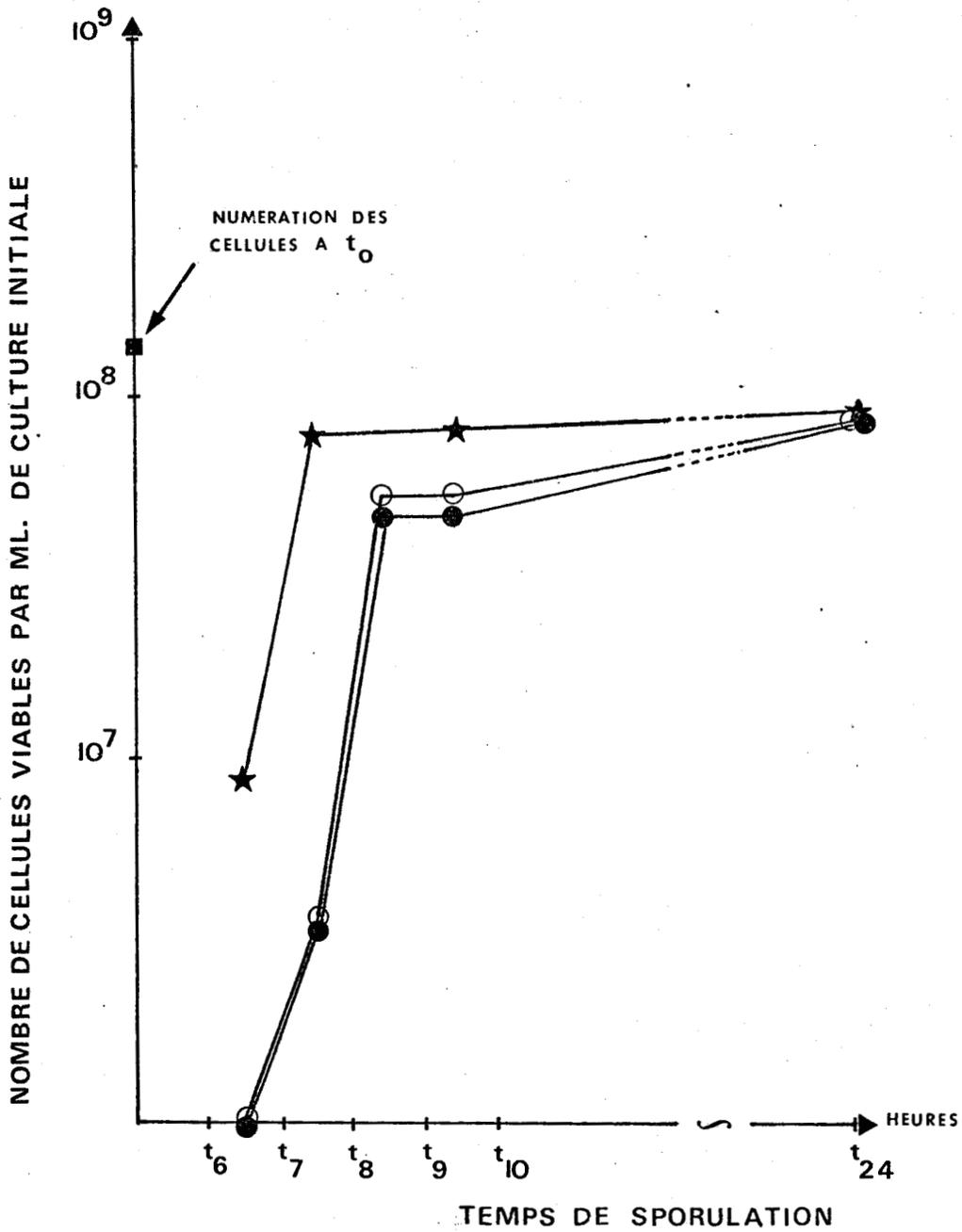


Figure 3 : Apparition des résistances au cours de la sporulation de B. cereus B C 1



- ★ Cryorésistance à  $-20^{\circ}\text{C}$  24 H
- Thermorésistance à  $80^{\circ}\text{C}$  10 mn
- " " à  $100^{\circ}\text{C}$  1 mn

C'est la conséquence d'une sporulation réalisée dans des conditions différentes.

En effet, le milieu de SCHAEFFER, contrairement à la gélose nutritive, contient des ions minéraux, notamment le calcium dont la présence dans le milieu de sporulation conditionne la résistance des spores à divers agents par l'intermédiaire du contrôle de la quantité d'acide dipicolinique synthétisée par la spore (88)

2°) Nous avons essayé de rendre les épreuves de résistance comparables, c'est-à-dire donnant des taux de survie très voisins. Ces taux sont proches de 0,6 pour des spores complètement formées à  $t_{24}$ , ce qui tend à montrer l'équivalence, sur le plan de la destruction cellulaire, des modes de congélation et de chauffage utilisés.

Or, les nombres de cellules révivifiables sont différents, selon les techniques de destruction, pour un temps de sporulation identique. Ceci pourrait être imputable au fait que l'équivalence des essais de résistance ne soit pas constante au cours du processus biologique complexe qu'est la sporulation. Il faut aussi rappeler que le synchronisme de la culture n'est pas parfait dans notre système et que ce facteur influence également les taux de survie. En effet, les tracés encore ascendants des diagrammes de cryorésistance à partir de  $t_{7,5}$  et surtout de thermorésistance à partir de  $t_{8,5}$  indiquent que la maturation des spores déjà formées et la sporulation de la culture ne sont pas complètes.

3°) Toutefois, le rapport du nombre de spores résistantes à la congélation sur le nombre de spores ayant survécu à un chauffage à  $100^{\circ}\text{C}$  durant une minute, nous permet par un artifice de calcul d'aborder le phénomène de l'établissement des résistances sous un autre angle. La courbe de la figure 4 exprime la valeur de ce rapport en fonction du temps de sporulation. De  $t_{6,5}$  à  $t_{7,5}$ , la valeur du quotient augmente fortement, ce qui

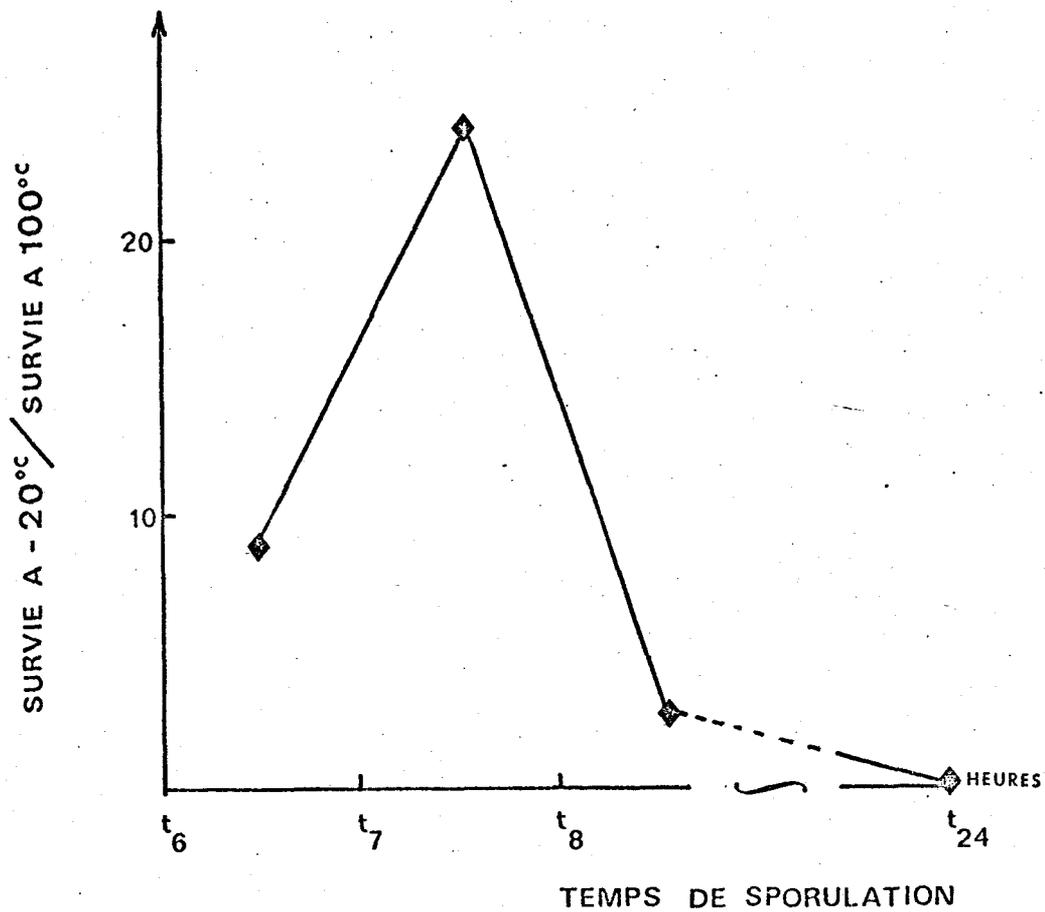


Figure 4

semble signifier qu'il est apparu beaucoup plus de cellules résistantes au froid que de cellules résistantes à la chaleur car il n'est pas concevable que le nombre de ces dernières ait diminué. Puis ce rapport baisse pour devenir voisin de 1 à  $t_{24}$ , c'est donc que la valeur de la thermorésistance s'égalise avec celle de la cryorésistance par apparition de cellules insensibles aux fortes températures puisque, là non plus, le nombre de cellules cryorésistantes ne peut pas avoir regressé.

Ces résultats et ces arguments sont donc en faveur d'un décalage du moment où apparaît la cryorésistance maximum par rapport au moment où s'installe la thermorésistance.

Nous avons pensé vérifier cette hypothèse en congelant des spores, prélevées à différents stades de leur formation, puis en évaluant leur thermorésistance. Nous devrions obtenir à  $t_{7,5}$  des spores cryorésistantes mais sensibles à la chaleur tandis qu'à  $t_{8,5}$  viendrait la thermorésistance.

Le Tableau VII montre que, effectivement, à  $t_{7,5}$  les spores résistent à la congélation mais non à la chaleur et que le nombre de cellules survivantes au chauffage augmente de  $t_{7,5}$  à  $t_{9,5}$  mais reste cependant très inférieur au nombre de spores cryorésistantes. Or, dans l'expérimentation précédente, ces taux de survie sont très voisins à partir de  $t_{8,5}$ .

Nombre de spores survivantes/ml de suspension de spores congelées à -20°C 24 Heures -		
	Avant chauffage à 100°C 1 mn	Après chauffage à 100°C 1 mn
$t_{6,5}$	$2,4 \cdot 10^5$	-
$t_{7,5}$	$1,9 \cdot 10^6$	$1,3 \cdot 10^5$
$t_{8,5}$	$1,8 \cdot 10^6$	$1,7 \cdot 10^5$
$t_{9,5}$	$1,8 \cdot 10^6$	$2,1 \cdot 10^5$

TABLEAU VII : Dénombrements de spores, prélevées à différents temps de sporogénèse, après traitements thermiques.

Il ne s'agit pourtant pas d'une sélection de spores résistantes aux différents agents thermiques car les dénombrements avant et après chauffage donneraient alors des résultats identiques.

Le froid n'a pas non plus sélectionné les formes résistantes à la chaleur puisque les taux de survie après chauffage croissent avec le temps de sporogénèse. Il semble donc que la congélation provoque des lésions cellulaires augmentant la sensibilité à la chaleur. Nous avons essayé de le confirmer en utilisant des spores matures, prélevées à  $t_{24}$ , et dont on évalue la thermorésistance après congélation. Le Tableau VIII montre effectivement une nette diminution du nombre de spores viables à la suite d'un chauffage. Ce phénomène sera discuté ultérieurement.

Nombre de spores survivantes/ml de suspension de spores congelées à -20°C 24 Heures	
Avant chauffage à 100°C 1 mn	Après chauffage à 100°C 1 mn
4. 10 <sup>7</sup>	4. 10 <sup>6</sup>

TABEAU VIII : Dénombrements de spores prélevées à  $t_{24}$ , après traitements thermiques.

Une autre preuve est fournie par l'utilisation des spores de B. subtilis Marburg et de ses mutants soumises aux mêmes facteurs thermiques que précédemment, après vérification que les formes végétatives de ces souches présentent une grande létalité à la congélation, comme toutes les cellules végétatives des Bacillus étudiés (Tableau IX).

SOUCHES	TAUX DE SURVIE
Sauvage	$2,5 \cdot 10^{-5}$
OA <sub>3</sub> NA	$5 \cdot 10^{-6}$
II <sub>A</sub> 20 T	$10^{-5}$
III <sub>834</sub>	$2 \cdot 10^{-7}$
IV <sub>11</sub> T	$5 \cdot 10^{-7}$
V 914 Try <sup>-</sup>	$5 \cdot 10^{-7}$

*Base 1 : Numération des subcultures avant congélation*

**TABLEAU IX** : Taux de survie des formes végétatives de B. subtilis Marburg et des mutants congelées à -20°C 24 heures.



Spores de <u>B. subtilis Marburg</u>	Cryorésistance à -20°C 24 H	Thermorésistance à 100°C 1 mn ou 80°C 10 mn
Souche 0A <sub>3</sub> NA	-	-
" II <sub>A</sub> 20T	-	-
" III <sub>834</sub>	0,018	-
" IV 11 T	0,13	-
" V 914 Try <sup>-</sup>	1	0,75
" Sauvage	1	1

Base 1 : Numération des subcultures avant congélation

TABLEAU X : Taux de survie des souches de B. subtilis Marburg après traitements thermiques.

Le Tableau X rapporte les taux de survie des spores de ces clones. On constate une destruction quasi totale des microorganismes pour les premiers stades de sporulation. Mais, comme auparavant, cette expérience met en évidence l'apparition d'une cryorésistance complète, identique à celle des spores de la souche sauvage ; pour le mutant bloqué au stade V de la sporulation alors que la thermorésistance exige une maturité presque complète de la spore qui ne

peut être acquise qu'au cours du stade VI.

Enfin, les photos de la planche I montrent que la sporogénèse s'est effectuée correctement, le stade V étant atteint à  $t_{7,5}$  et le stade VI à  $t_{8,5}$ .

### III CONCLUSION

=====

Les expériences réalisées avec des souches et des principes différents nous amènent cependant aux mêmes constatations :

1°) Au cours de la sporulation, la cryorésistance s'établit avant la thermorésistance ; la durée du décalage est de une heure

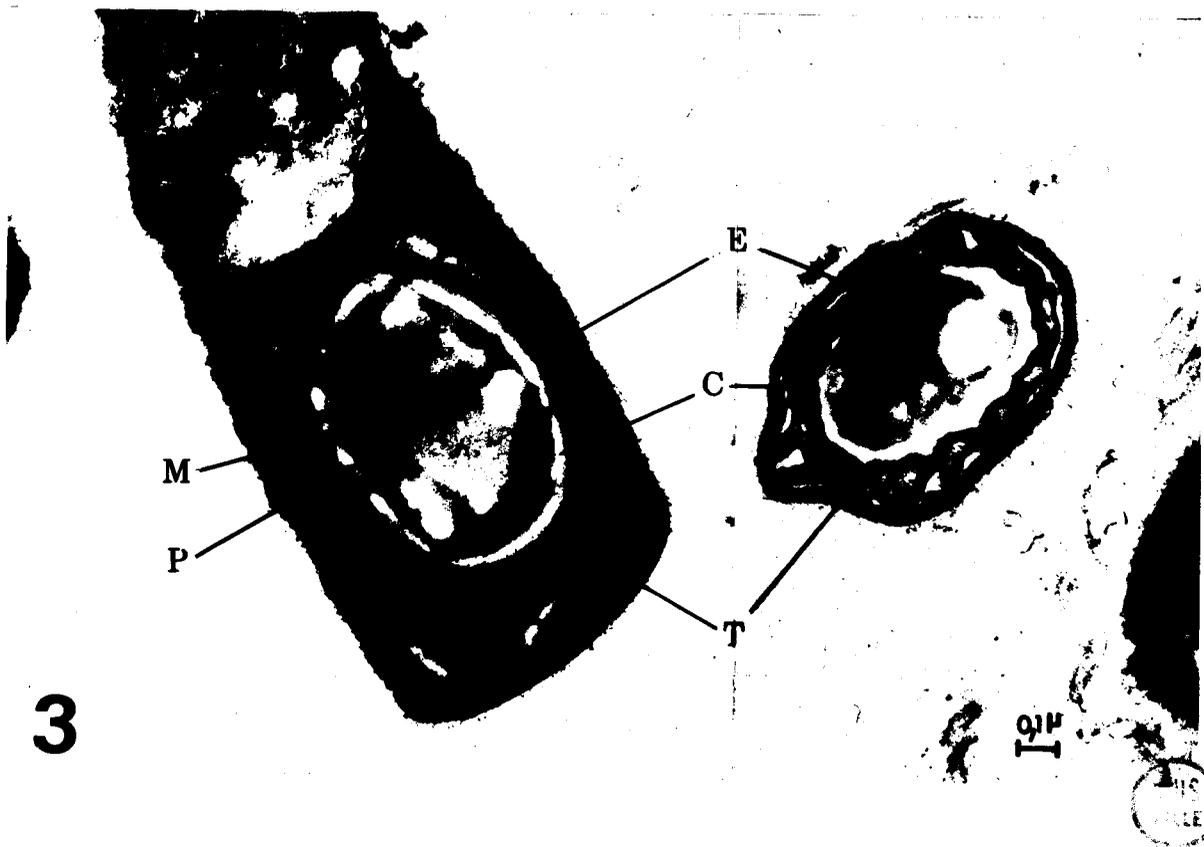
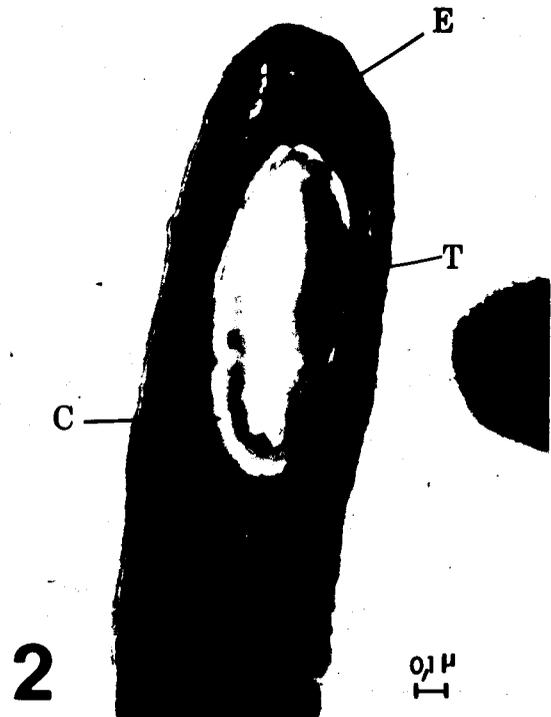
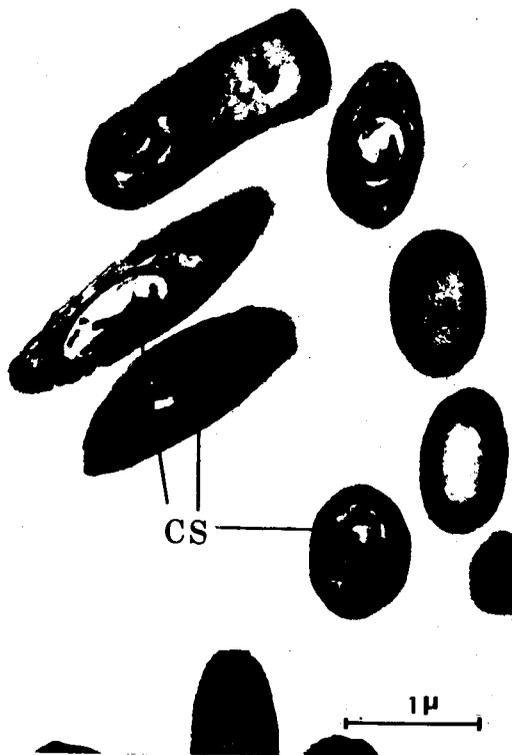
2°) S'il est confirmé que la thermorésistance n'apparaît qu'avec la maturation de la spore (stade VI), on découvre que la cryorésistance devient effective à la fin du stade V.

Ces deux faits suggèrent que ou bien les mécanismes mis en jeu au cours de ces résistances ne sont pas les mêmes ou bien les causes, ou certaines d'entre elles, de résistance des spores aux agents de dégradation sont communes, la différence résidant peut-être en leur importance relative.

Nous envisagerons dans l'étape suivante d'étudier les facteurs physicochimiques propres à la sporogénèse et de relier ces éléments avec l'installation de la thermorésistance et surtout de la cryorésistance au cours de la sporulation de B. cereus.

PLANCHE I

Etude ultrastructurale de la sporulation de B. cereus B C 1



CHAPITRE IV

## ETUDE DE DIFFERENTS FACTEURS EN RELATION AVEC LA CRYORESISTANCE DES SPORES

Nous nous proposons de comparer les causes de la thermorésistance et de la cryorésistance des spores de Bacillus.

Mais auparavant, il est nécessaire d'examiner d'un point de vue bibliographique le déterminisme de la résistance à la chaleur, de façon à dégager les composantes qui établissent la thermorésistance et ensuite de les étudier systématiquement par rapport à la cryorésistance.

### I LA THEORIE DU CORTEX CONTRACTILE

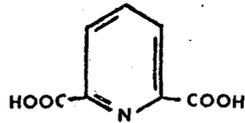
=====

Quelques études en microscopie électronique ont été réalisées sur des spores chauffées. Ainsi, PROKOP et HUMPHREY (64) ont constaté que les fibrilles kératiniques de la spore de B. stearothermophilus se contractaient au cours du chauffage et ce serait une cause de la thermorésistance.

Mais ce sont surtout les transformations physicochimiques accompagnant la sporogénèse qui ont permis de proposer une théorie capable d'expliquer la thermorésistance.

La grande teneur en protéines riches en cystine est une différence notable entre les spores et les cellules végétatives de Bacillus. PFENNIG (58) a montré que des hydrolysats cellulaires ont un taux plus élevé de cystéine chez les spores de B. subtilis et B. mycoïdes que dans les formes végétatives. Le même résultat a été observé chez Clostridium botulinum (84). Les protéines riches en cystine sont synthétisées relativement précocement durant la sporulation. Elles sont localisées dans les tuniques sporales (85, 86) mais on ne connaît pas le site de leur biosynthèse.

Découvert en 1953 (63), l'acide dipicolinique sous forme de complexe avec le calcium a été immédiatement associé à l'acquisition de la thermorésistance (16,63,62)



Ac. dipicolinique

Le dipicolinate de calcium apparaît durant la formation du cortex et la maturation de la spore, c'est-à-dire au cours des stades IV - VI. Le site de biosynthèse n'est pas connu mais selon KONDO et coll. (36) chez B. subtilis, le premier lieu de synthèse pourrait être le cytoplasme du sporange. La localisation de l'acide dipicolinique dans la spore n'est pas bien définie. On le trouve dans le protoplasme (90) et surtout dans le cortex.

En raison de la haute résistance des spores aux agents letaux, on a pensé que la spore bactérienne contenait beaucoup moins d'eau que les formes végétatives. Pourtant, peu de travaux ont été réalisés sur le sujet. HENRY et FRIEDMAN en 1937 (27) utilisent des méthodes de pesée à différents degrés de dessiccation pour déterminer la teneur en eau des spores et cellules végétatives de B. megatherium et B. cereus var. mycoïdes. Ils trouvent que ces souches perdent respectivement 58 % et 71 % de leur poids en eau pour les spores et 80 % et 88 % pour les cellules végétatives. Mais par mesure d'indices de réfraction, ROSS et BILLING (72) trouvent, pour les spores des mêmes souches que HENRY et FRIEDMAN, des quantités d'eau plus faibles, proches de la teneur en eau des protéines telles que la laine ou le cuir. Toutefois, ces auteurs pensent que si les valeurs absolues ne sont pas comparables, il y a accord pour estimer que les spores contiennent moins d'eau que les cellules végétatives. L'hypothèse selon laquelle la

thermorésistance des endospores bactériennes dépend de la déshydratation du protoplasme central a été étayée en 1975 par DRING et GOULD (18) . On sait que la rehydratation qui se produit au cours de la germination des spores s'accompagne d'une importante diminution de leur thermorésistance. Ces auteurs ont montré qu'elle pouvait être complètement restaurée par une nouvelle deshydratation osmotique du protoplasme en plaçant les spores en germination dans une solution de saccharose, recréant ainsi approximativement les conditions de la spore dormante.

La deshydratation de la spore se réaliserait au cours de la sporogénèse. Elle s'expliquerait par la théorie du cortex contractile de LEWIS, SNELL et BURR (39) soutenue par les travaux d'autres auteurs (29, 53, 87, 90, 91) .

La contraction des couches de mureïne du cortex serait due à une stabilisation de forces électrostatiques par le calcium et le dipicolinate de calcium en particulier. Ce phénomène, ainsi que la formation d'une couche kératinique compacte par création de ponts disulfures dans les tuniques sporales, agiraient en synergie pour opérer durant la sporogénèse une contraction mécanique du protoplasme sporal, provoquant sa deshydratation qui expliquerait la stabilité des spores vis à vis de la chaleur et autres agents létaux.

Après une étude ultrastructurale comparative entre des spores chauffées et des spores congelées, nous nous sommes intéressés aux trois composantes physicochimiques reliées aux phénomènes de résistance des spores : les protéines sporales riches en cystéine, l'acide dipicolinique, la concentration en eau.

## II MATERIEL ET METHODES

=====

### A) MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

L'étude ultrastructurale des spores de B. cereus BC 1 congelées et chauffées a été réalisée à partir de suspensions de spores obtenues sur gélose nutritive.

#### 1 - Spores chauffées

Un aliquot de l'échantillon est porté au bain-marie bouillant durant dix minutes. Après refroidissement il est versé dans l'acide osmique à 2 p. 100 en tampon Veronal/Acétate pH 6. Le culot de centrifugation est repris par 1 ml d'une gélose à 15 g d'agar par litre d'eau distillée, maintenue à 45°C. Cette gélose contenant les spores est solidifiée sur une lame de verre et découpée en petits blocs de 1 mm<sup>3</sup>.

#### 2 - Spores congelées

Le culot de centrifugation d'une autre partie du prélèvement est repris dans la gélose et découpé comme précédemment puis congelé sur une lame de verre à -150°C en 10 minutes dans le caisson CCF 40. Les petits blocs congelés sont immédiatement décongelés dans l'acide osmique à 2 p.100 en tampon Veronal/Acétate pH 6.

#### 3 - Traitement pour la microscopie électronique

Les différents échantillons ainsi qu'un témoin non congelé ni chauffé sont traités comme il a été décrit précédemment. L'observation est faite au microscope électronique HITACHI HU 12 sous une tension de 75 KV.

## B) DOSAGE DE LA CYSTEINE

Cette manipulation n'ayant pour but que de mettre en évidence une variation de la teneur en cystéine des cellules en sporulation, il n'est pas nécessaire de faire un dosage quantitatif précis pour lequel une oxydation préalable des échantillons, par exemple par l'acide performique, s'avère indispensable. Nous avons donc conduit cette étude de la façon suivante :

Au cours de la sporulation de B. cereus BC 1, en milieu de SCHAEFFER, des fractions de culture ont été prélevées, centrifugées, lavées puis lyophilisées. Des quantités connues des lyophilisats ont été hydrolysées par l'acide chlorhydrique 5,6 N à 105°C durant 24 heures et le diagramme des acides aminés est obtenu à l'aide d'un autoanalyseur BECKMAN Multichrom suivant le principe général de SPACKMAN et coll. (78) adapté par CHARET et coll. (12)

Ce dosage a été réalisé dans le laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et Techniques de Lille (Professeur MONTREUIL).

La surface de chacun des pics d'acides aminés est calculée sur chaque diagramme. Les quantités relatives d'acides aminés contenues dans les échantillons de spores sont calculées en donnant la valeur 1 à l'alanine sur tous les diagrammes. Cet amino acide a été choisi car sa concentration est identique dans les formes végétatives et dans les spores (58)

## C) DOSAGE DE L'ACIDE DIPICOLINIQUE

Nous avons recherché l'acide dipicolinique dans des échantillons de spores prélevés aux différents stades d'une expérience de sporulation de B. cereus BC 1 en milieu de SCHAEFFER. Des aliquots de 20 ml sont centrifugés, lavés et repris dans 8 ml d'eau distillée puis autoclavés à 120°C durant 15 minutes. L'acide dipicolinique est dosé par la méthode de JANSSEN et coll. (32). Les résultats sont donnés en µg d'acide dipicolinique par mg de poids sec de spores.

#### D) DOSAGE DE L'EAU CELLULAIRE

Nous avons extrait l'eau dans les spores par trois méthodes : deux sont des techniques de pesée dérivées des travaux de HENRY et FRIEDMAN (27) ou BLACK et GERHARDT (9). La troisième consiste à extraire l'eau des spores par un solvant organique et à la doser dans ce solvant.

Les échantillons sont prélevés dans une culture de B. cereus BC 1 aux temps  $t_{6,5}$ ,  $t_{7,5}$  et  $t_{8,5}$  de la sporulation.

Des aliquots de 3 ml sont filtrés sur membrane Millipore (porosité  $0,45 \mu$ ) et séchés à l'air à  $30^{\circ}\text{C}$  pour ôter l'humidité externe. Nous avons vérifié que les spores étaient encore vivantes à la suite de ce traitement. Après séchage, les filtres sont pesés et divisés en 3 séries :

- les filtres de la série "a" sont placés dans des piluliers hermétiquement bouchés, contenant 5 ml d'éther éthylique deshydraté sur chlorure de calcium et gardé anhydre sur sodium. Après 24 heures d'extraction, l'eau est dosée dans l'éther selon le principe de Karl FISCHER (20) adapté par BIZOT (8). Toute la verrerie utilisée a été séchée à l'étuve à  $100^{\circ}\text{C}$ . Ce dosage a été réalisé au Laboratoire de Chimie minérale de l'Université des Sciences et Techniques de LILLE (Professeur HEUBEL).

- les filtres de la série "b" sont desséchés sous vide en présence d'anhydride phosphorique jusqu'à obtention d'un poids constant.

- les filtres de la série "c" sont desséchés au four à  $105^{\circ}\text{C}$  également jusqu'à obtention d'un poids constant.

- les témoins dans toutes les séries sont des membranes Millipore sur lesquelles nous avons filtré 3 ml d'eau distillée stérile.

- les résultats sont donnés en concentration en eau dans les spores

### III RESULTATS ET DISCUSSION

=====

L'étude en microscopie électronique des spores chauffées et congelées ne nous permet pas de noter de modifications structurales visibles par comparaison avec un échantillon témoin. Les photographies de la planche II montrent que l'intégrité morphologique de la spore est conservée. Dans tous les cas, on retrouve les différentes enveloppes sporales et il n'y a pas de dégradations apparentes au sein du cytoplasme. Il semble donc que l'on puisse éliminer d'emblée les lésions mécaniques importantes comme seules causes de mortalité des spores mûres de B. cereus chauffées ou congelées selon nos conditions.

Ceci ayant été vérifié, l'analyse des facteurs physico-chimiques rencontrés au cours de la sporogénèse bactérienne reste à envisager.

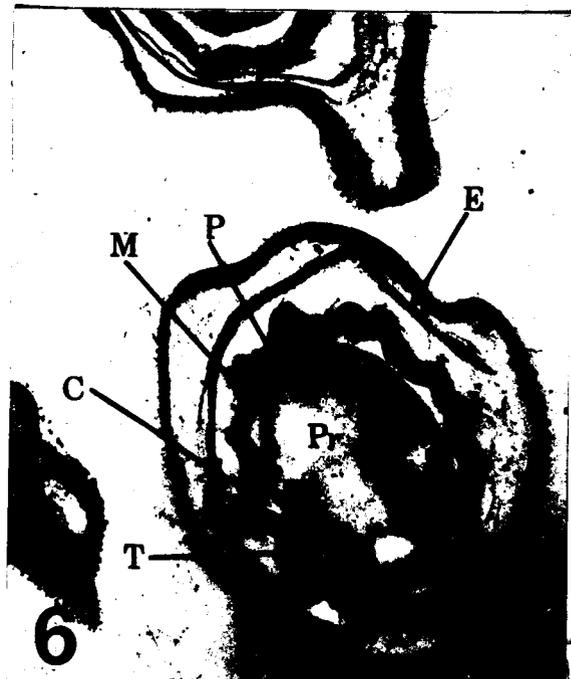
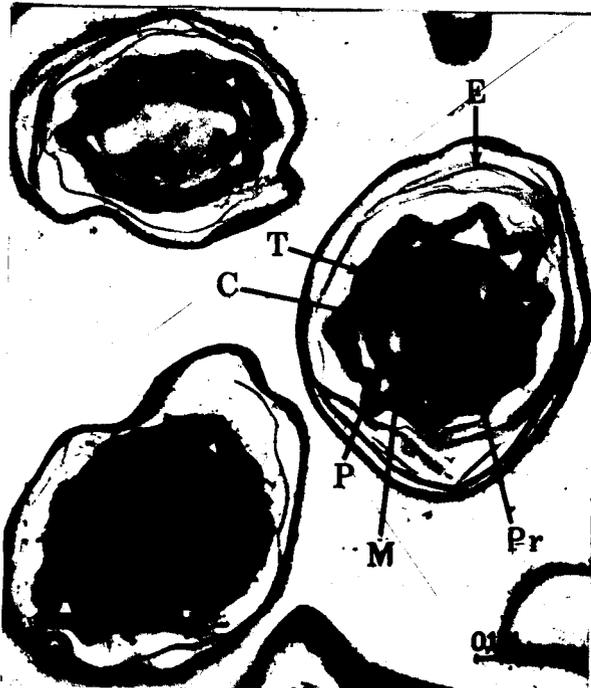
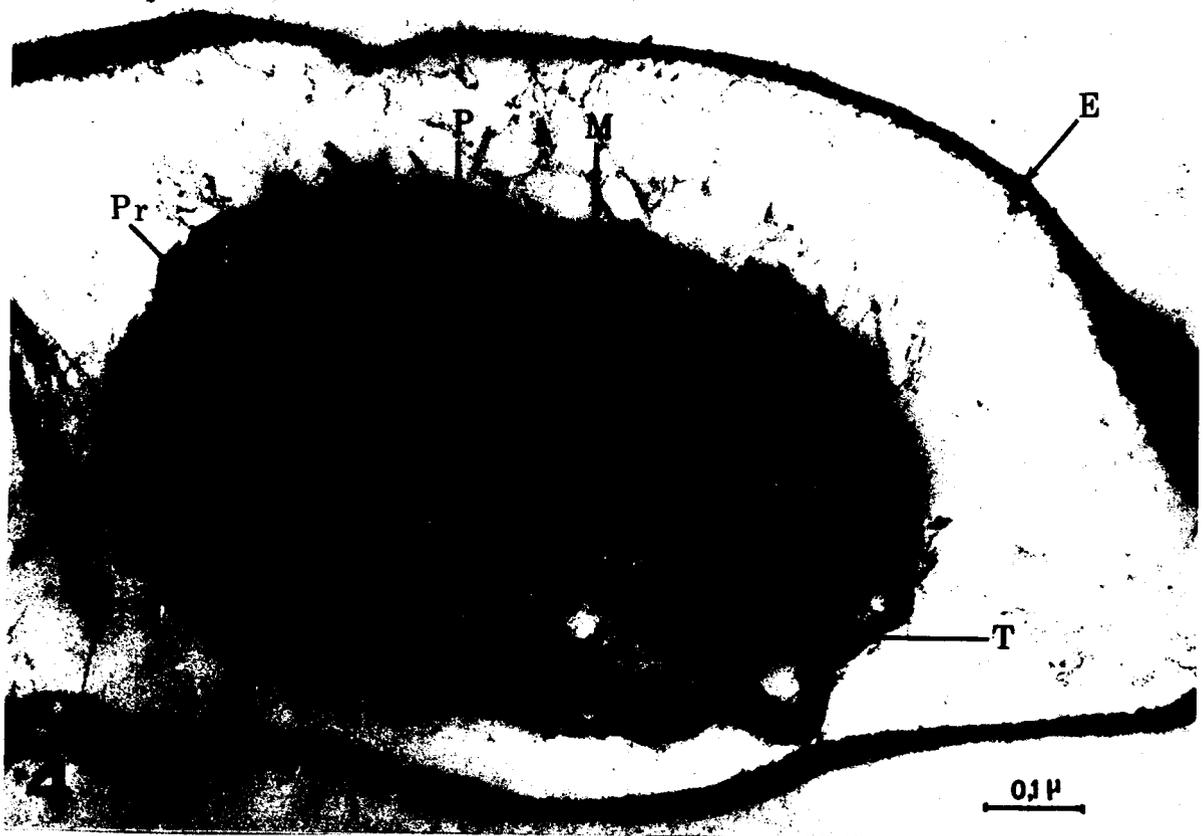
La Figure 5 présente le diagramme de l'évolution de la teneur en quelques acides aminés des spores en cours de formation. Nous n'avons présenté que neuf amino acides particulièrement représentatifs. Comme nous l'avons dit, nous avons attribué la valeur 1 à la quantité d'alanine présente dans tous les dosages en raison de la constance de sa teneur entre les formes végétatives et les formes sporulées de Bacillus (58).

Hormis la cystéine, les acides aminés ne présentent pas de variations importantes au cours de la sporulation. Celles-ci peuvent aussi bien provenir des méthodes de préparation des échantillons et de dosage que d'un processus biologique réel. Le cas est tout autre avec la cystéine. En effet, la teneur en cet acide aminé augmente considérablement durant la sporogénèse.

De  $t_{6,5}$  à  $t_{7,5}$  l'incorporation de cystéine dans les spores n'est pas grande. Par contre, elle s'accélère entre  $t_{7,5}$  et  $t_{8,5}$ , ce qui confirme

PLANCHE I I

Ultrastructure de spores congelées et chauffées



IS  
LIFE

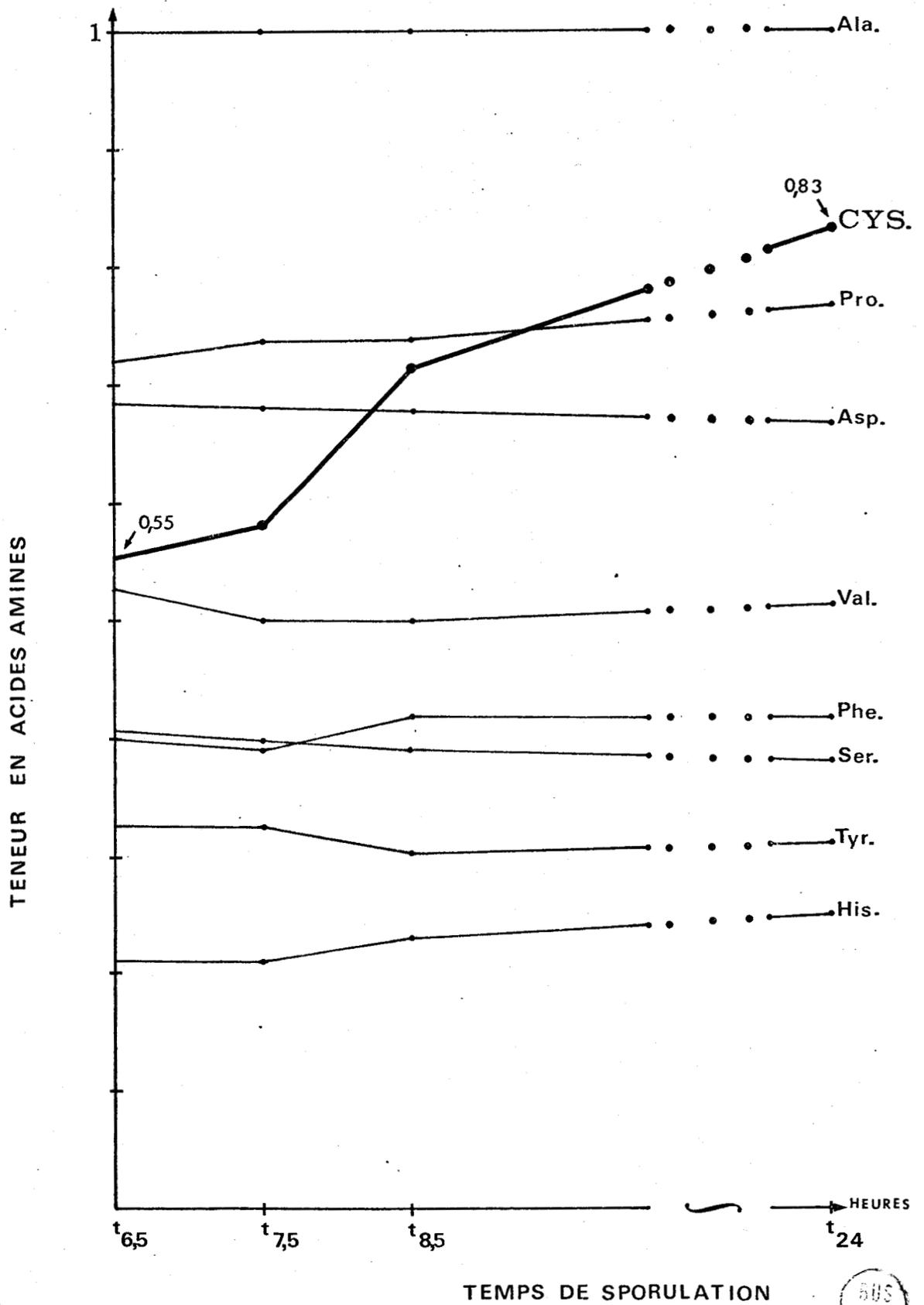


Figure 5 : Diagramme de la teneur des cellules en acides aminés au cours de la sporulation de *B. cereus* B C 1.



que entre ces périodes, nous sommes aux stades V-VI de la sporulation. A partir de  $t_{8,5}$ , la pente de la courbe s'atténue, ce qui signifie que la sporulation est pratiquement terminée pour un grand nombre de cellules mais que le synchronisme de la culture n'est pas parfait. Cette cinétique d'incorporation de la cystéine dans les spores de B. cereus nous permet donc de vérifier que la sporulation s'effectue correctement mais, surtout, elle montre que la synthèse de protéines riches en cystine dans les tuniques sporales est un phénomène vraisemblablement non lié à l'installation de la cryorésistance puisque celle-ci atteint son maximum à  $t_{7,5}$  tandis que les dernières enveloppes de la spore ne sont pratiquement complètes qu'à  $t_{8,5}$ , moment où apparaît logiquement la thermorésistance. Toutefois, il se peut aussi que la cryorésistance soit quand même liée à cette synthèse mais alors il n'est pas nécessaire que le processus soit complet.

La Figure 6 présente la cinétique de formation d'acide dipicolinique au cours de la sporogénèse de B. cereus souche BC 1. Comme précédemment, elle permet de vérifier une nouvelle fois le bon déroulement du processus de sporulation. Les quantités d'acide dipicolonique extraites des spores augmentent considérablement de  $t_{6,5}$  à  $t_{8,5}$ , ce qui correspond bien à l'accumulation de ce composé au cours des stades IV-VI. L'apparition du plateau de la courbe à  $t_{8,5}$  confirme encore la fin de la sporulation et l'imperfection du synchronisme cultural. Mais aussi ce maximum de synthèse d'acide dipicolonique à  $t_{8,5}$  ne permet de relier ce fait qu'à la thermorésistance et non à la cryorésistance qui est apparue à  $t_{7,5}$ , sous réserve que si ces phénomènes sont liés, il n'est pas non plus nécessaire que le processus soit complet.

Enfin, le Tableau XI donne les concentrations en eau obtenues par nos différents procédés aux derniers stades de la sporulation de notre souche de B. cereus.

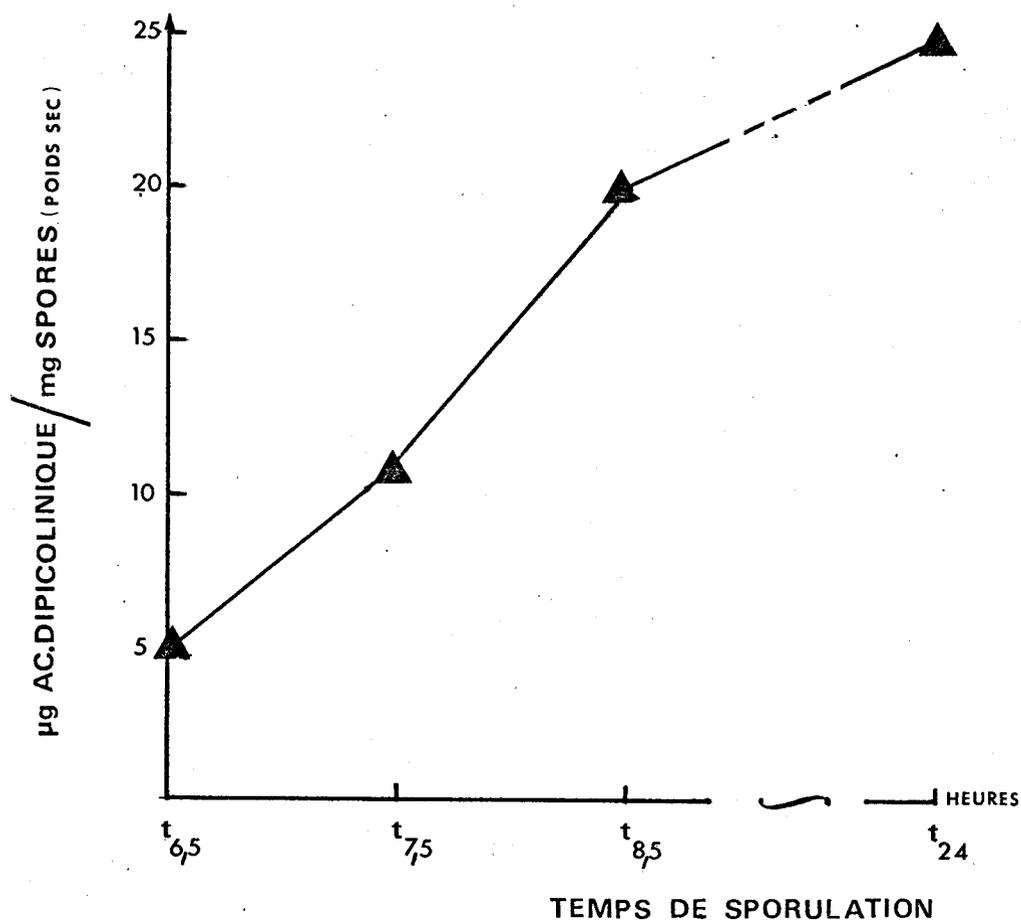


Figure 6 : Accumulation de l'acide dipicolinique dans les cellules de B. cereus BC 1 au cours de la sporulation.

CONCENTRATIONS EN EAU DANS LES SPORES			
Temps de sporulation Procédé utilisé	$t_{6,5}$	$t_{7,5}$	$t_{8,5}$
Extraction par A l'éther	0,8	0,1	0,08
Dessication par B $P_2O_5$ sous vide	0,75	0,21	0,18
Four à 105°C C	0,8	0,66	0,53

TABLEAU XI : Concentrations en eau dans les spores.

Ces mêmes résultats sont représentés différemment dans la figure 7: La courbe "a" donne les quantités d'eau extraites des spores par l'éther anhydre.

La courbe "b" représente une dessication sous vide en présence d'anhydride phosphorique.

La courbe "c" est le résultat d'une dessication des échantillons au four à 105°C

On remarque immédiatement la diminution importante de la concentration en eau entre  $t_{6,5}$  et  $t_{7,5}$  par les procédés "a" et "b" par rapport au procédé "c". Entre  $t_{7,5}$  et  $t_{8,5}$ , les quantités d'eau ne varient guère

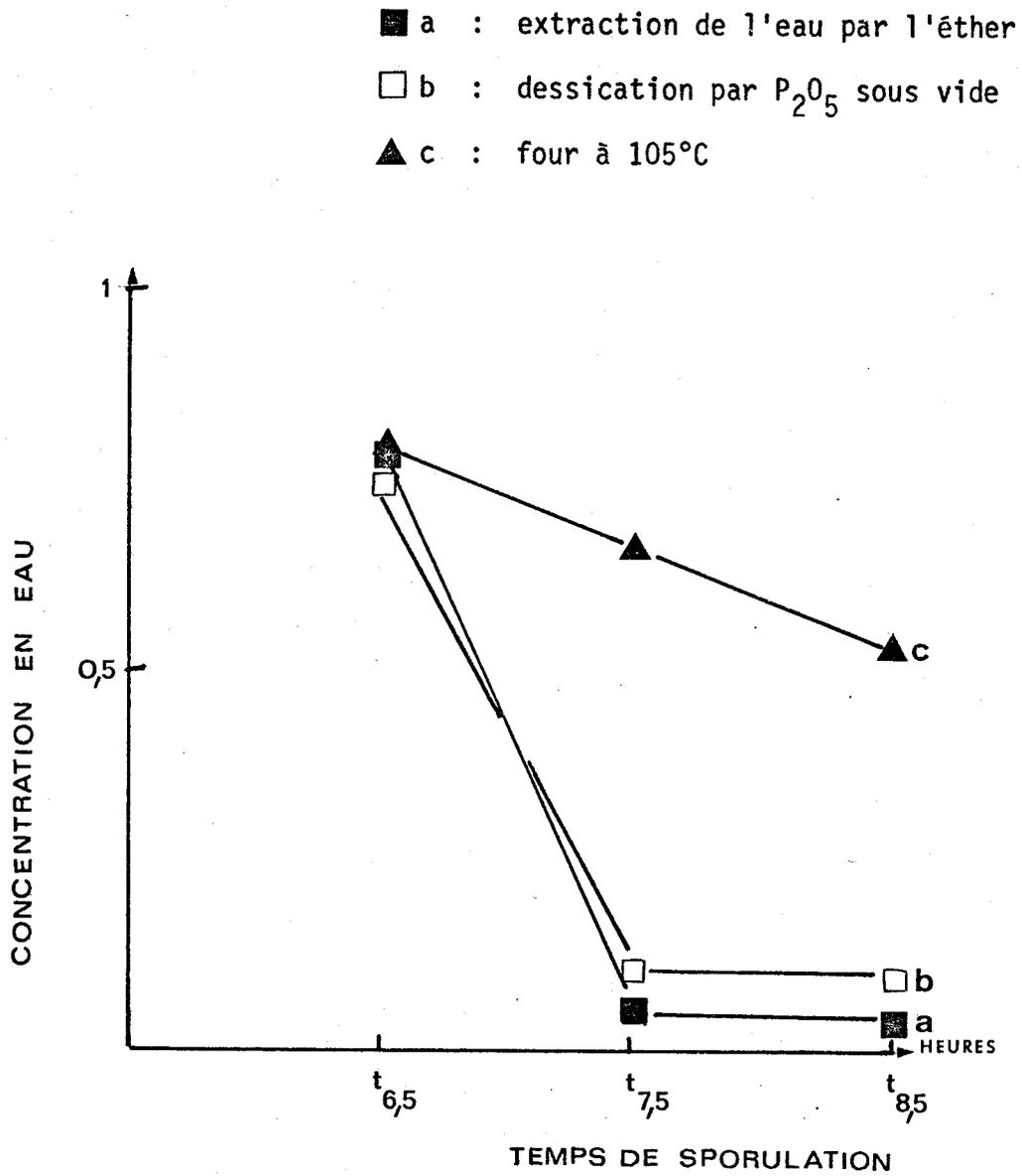


Figure 7 : Concentrations en eau des cellules de B. cereus B C 1 au cours de la sporulation.

pour "a" et "b" tandis qu'il y a encore une différence pour "c".

Une concentration approximative de 0,8 dans les spores à  $t_{6,5}$  semble valable car, d'une part, à ce stade, la spore a une composition encore proche de la cellule végétative et, d'autre part, nous devons également extraire l'eau du sporange qui n'est pas encore lysé à ce stade.

Mais à  $t_{8,5}$ , la valeur de la teneur en eau obtenue par le procédé "c" est proche des résultats de HENRY et FRIEDMAN (27) ou BLACK et GERHARDT (9) chez différents Bacillus alors que les méthodes "a" et "b" donnent des valeurs plus conformes aux résultats de ROSS et BILLING (72)

Or, on peut penser qu'une dessiccation à 105°C est plus brutale et complète que par les deux autres techniques utilisées.

Nous ne discuterons pas plus avant les valeurs absolues des concentrations en eau des spores, nos résultats ne nous permettant pas de conclure.

Mais on peut dire que les valeurs obtenues représentent les quantités d'eau que nous avons effectivement extrait des échantillons de spores. Dans ce cas, on peut envisager que la courbe "c" correspond à l'extraction de la plus grande partie de l'eau sporale, les courbes "a" et "b" donnant les quantités d'eau pouvant être extraites par des moyens moins drastiques : il s'agirait de l'eau libre cellulaire.

On observerait donc entre  $t_{6,5}$  et  $t_{7,5}$  un abaissement considérable de la teneur en eau libre qui se prolongerait à  $t_{8,5}$ . Ceci pourrait correspondre à la deshydratation subie par le protoplasme sporal au cours de la sporogénèse.

Mais ici le fait important est que la chute brutale de la teneur en eau libre se produit à  $t_{7,5}$ , moment où est apparue la cryorésistance maximale. Il semble donc que l'on pourrait relier la résistance des spores à la congélation à leur concentration en eau.

Cette hypothèse est renforcée par différents arguments :

1°) L'étude ultrastructurale des spores congelées n'ayant pas montré d'altérations morphologiques, il faut se tourner vers un ou plusieurs processus physicochimiques pour expliquer la mortalité de certaines spores. Or, il est connu que les macromolécules biologiques sont plus sensibles aux agents de dégradations lorsqu'elles sont à l'état hydraté plutôt qu'à l'état sec.

Qu'il s'agisse de macromolécules de structure, enzymatiques ou nucléiques, il est concevable que leur deshydratation relative les protège de la congélation comme d'autres causes de dénaturation.

2°) L'un des événements majeurs à considérer lors de la congélation de microorganismes est la circulation de l'eau entre le système cellulaire et le milieu extérieur ( 43,44, 45 ) . Il est plausible que si ce transfert est réduit par la deshydratation partielle de la cellule, l'effet létal est lui aussi réduit.

De toutes façons, il semble évident que l'eau libre sera celle qui donnera le plus facilement des cristaux de glace dans une cellule sporale exposée aux basses températures. Il n'est donc pas surprenant de constater que la diminution de la concentration en eau libre coïncide avec l'apparition de la cryorésistance.

#### IV CONCLUSION

=====

Cette étude morphologique et physicochimique réalisée au cours de la sporogénèse de B. cereus amène les faits suivants :

- la morphologie de la spore ne semble affectée ni par la congélation ni par la chaleur, dans nos conditions expérimentales.

- les cinétiques d'accumulation de cystéine et d'acide dipicolinique dans la spore au cours de sa formation permettent de constater que la sporulation s'effectue dans des conditions expérimentales satisfaisantes puisque les maxima sont atteints au moment où apparaît la thermorésistance à  $t_{8,5}$ . Mais la cryorésistance s'était installée à  $t_{7,5}$ .

- la deshydratation de la spore, vraisemblablement due à la contraction du cortex débute assez précocement au cours de la sporogénèse.

A  $t_{7,5}$ , l'état de dessiccation du matériel cellulaire est avancé et coïncide avec l'apparition de la cryorésistance.

Il semble donc que l'on puisse établir une relation entre ces deux phénomènes et l'hypothèse trouve sa justification dans le fait que les macromolécules biologiques sont stabilisées lorsqu'elles ont subi une deshydratation et que les échanges aqueux entre le système cellulaire et le milieu extérieur sont primordiaux dans le comportement d'un microorganisme au cours de la congélation.

Il est, de plus, intéressant de remarquer que le taux d'hydratation relativement bas des spores bactériennes est aussi donné comme l'une des causes essentielles de résistance à d'autres agents létaux. Nous savons que c'était le cas pour la chaleur, il semble que ce soit vrai également pour la résistance aux rayons X ( 82 )

Il apparaît donc que ce phénomène est général et qu'il est à évoquer en premier lieu lorsque l'on considère l'exceptionnelle capacité de survie de la spore placée dans des conditions très défavorables.

Il est alors logique de retrouver cet état de dessiccation relatif des constituants de la spore comme l'une des causes de la cryorésistance.

## DISCUSSION ET CONCLUSION GÉNÉRALES

Ce travail avait pour but l'étude de la cryorésistance des spores bactériennes.

Mais nous avons voulu aborder le problème sous un angle différent de celui des expérimentations habituellement réalisées. En effet, ces dernières sont généralement conduites en milieu liquide et nous avons au contraire choisi un support solide pour la congélation de nos microorganismes. Cette méthode nous semble posséder l'avantage de supprimer deux facteurs importants : l'influence du milieu de suspension et les interactions cellulaires.

Dans un premier temps, et à titre de témoins, nous avons exposé des microorganismes différents à plusieurs modes de congélation sur milieu gélosé et nous avons constaté que leurs survies sont fonction des critères généralement admis, notamment l'espèce bactérienne et la vitesse de congélation. A cet égard, il est confirmé que la durée de passage de la cellule dans sa zone eutectique est un facteur primordial.

Ayant vérifié la validité de notre technique expérimentale, nous avons prouvé que les spores de Bacillus présentaient une grande cryorésistance par comparaison avec leurs formes végétatives. Il était alors possible d'aborder le sujet en prenant comme modèle d'expérimentation, la relation éventuelle entre la cryorésistance et la thermorésistance des spores.

Soumises à la chaleur et aux basses températures, les cellules sporulées montrent effectivement un parallèle entre les deux phénomènes, en ce sens que les spores les plus thermorésistantes sont également celles qui présentent la meilleure survie à la congélation. Il semble donc que les résistances à ces agents physiques sont dues aux mêmes causes, avec toutefois, la possibilité de variations plus ou moins importantes dans les mécanismes concernés.

L'approche du problème nous semblait devoir être réalisée en cherchant à quels moments s'installent ces résistances au cours de la sporulation. Nous savons que la thermorésistance est liée à la formation des spores et nous mettons en évidence le fait que les formes végétatives de Bacillus sont beaucoup plus sensibles aux basses températures que les formes sporulées. Ceci nous permet de penser que cryorésistance et sporogenèse sont également dépendants.

Il a été mis en évidence que la survie à la congélation de B. cereus atteint son maximum au temps  $t_{7,5}$  de la sporogenèse, c'est-à-dire vers le stade V, alors que pour la thermorésistance, il faut attendre le temps  $t_{8,5}$  (stade VI). Il y a donc une apparition plus précoce de la cryorésistance et ceci a été vérifié en utilisant des mutants de B. subtilis Marburg bloqués aux différents stades de sporulation, car seules les spores matures sont thermorésistantes tandis que les cellules au stade V sont déjà cryorésistantes.

Une autre preuve aurait pu être fournie en étudiant la thermorésistance de cellules en sporulation, préalablement congelées. Nous pensions obtenir de cette façon des spores cryorésistantes cependant encore sensibles à la chaleur à  $t_{7,5}$  alors qu'à  $t_{8,5}$  viendrait la thermorésistance. La manipulation n'a pas été réellement positive car il s'est avéré que la congélation diminuait la thermorésistance alors que l'inverse n'est pas vrai. En fait, ceci concerne plutôt le mécanisme d'action létale de la chaleur et du froid.

Il est possible que, dans nos conditions, la chaleur ne dénature pas les macromolécules de la spore, alors que la congélation, du fait de la formation des cristaux de glace, les laisse dans un certain délabrement. Les basses températures n'altèrent pas les cellules selon une loi de "tout ourrien" car il est possible d'obtenir un nombre de survivants plus

grand sur un milieu riche que sur un milieu minimal ou sélectif, ce qui montre bien une dégradation partielle de la bactérie.

Toutefois, ces expériences permettent d'envisager une hypothèse tendant à expliquer ces résistances. Si l'on sait que la thermorésistance est due à l'action vraisemblablement concomittante de trois facteurs : l'accumulation de dipicolinate de calcium, la formation de ponts disulfures au sein de protéines riches en cystéine et la diminution de la concentration en eau de la cellule ; on peut penser que l'un de ces éléments est primordial pour la cryorésistance et qu'il apparaît plus précocement que les autres au cours de la sporogénèse.

Si l'étude ultrastructurale des spores matures, congelées ou chauffées, ne nous apporte pas d'argument, il n'en est pas de même avec l'examen de l'évolution des trois composantes physicochimiques spécifiques de la sporulation.

Les différents dosages montrent que les teneurs en acide dipicolinique et en cystéine continuent à croître alors que la cryorésistance est déjà installée, cette augmentation se poursuivant jusqu'à l'établissement d'une thermorésistance maximale.

Par contre, des déterminations des concentrations en eau des cellules en cours de sporulation de B. cereus mettent en évidence une diminution importante du taux d'hydratation de ces microorganismes et notamment, semble-t'il, une perte sensible en eau libre. Or, cette deshydratation est pratiquement terminée au moment où apparaît la cryorésistance, c'est-à-dire à  $t_{7,5}$ .

Ainsi, les mécanismes de thermorésistance et de cryorésistance auraient en commun l'exigence d'un abaissement de la concentration en eau cellulaire.

Les deux autres facteurs, acide dipicolinique et ponts disulfures ont un rôle mineur dans la cryorésistance mais une importance dominante dans la

thermorésistance puisque celle-ci ne peut atteindre son maximum que lorsque la totalité de la biosynthèse de ces éléments est réalisée.

Cependant, tout est lié car il faut rappeler que l'élimination d'eau au cours de la sporogénèse est le fruit d'un processus particulier de contraction mécanique de la spore rendue possible par l'action synergique de la synthèse d'une couche kératinique compacte par pontages disulfures dans une protéine riche en cystéine et de l'accumulation de dipicolinate de calcium.

Le phénomène essentiel de la résistance des spores à la congélation reside en une perte d'eau cellulaire.

Peut-on extrapoler cette conclusion aux formes végétatives bactériennes en général ? On sait que la congélation provoque des échanges d'eau entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule. On pouvait donc penser à la lumière de nos résultats que les différences de sensibilité aux basses températures résultaient de la possibilité pour les cellules végétatives de se deshydrater au cours du passage dans la zone eutectique. En effet, si les cellules végétatives de Bacillus sont très sensibles, leurs spores ont acquis une grande résistance grâce à une deshydratation intense. Il ne semble pas que ce soit vrai pour les autres formes végétatives bactériennes car leur état d'hydratation est très proche de celui du Bacillus alors que leur cryorésistance est voisine de celle des spores.

Il faudrait envisager que la perte d'eau des bactéries au cours de la congélation soit considérable, pour permettre une protection de la cellule. C'est peu vraisemblable.

La cryorésistance due à la deshydratation partielle, mais importante, du matériel cellulaire reste donc la propriété des spores de Bacillus.

## B I B L I O G R A P H I E

- 1\_AITHAL, H.N., KALRA, V.K. & BRODIE, A.F., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1971, 43, 550.
- 2\_AKIMATO, M., Low Temp. Sci. Ser. B, Biol. Sci., 1954, 11, 45.
- 3\_ALUR, M.D. & GRECZ, N., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1975, 62, 308.
- 4\_ARPAI, J., Appl. Microbiol., 1962, 10, 297.
- 5\_ARPAI, J., Z. Allg. Mikrobiol., 1964, 4, 105.
- 6\_ASHWOOD-SMITH, M.J., BRIDGES, B.A. & MUNSON, R.J., Science, 1965, 49, 1103.
- 7\_BAUMAN, D.P. & REINBOLD, G.W., J. Dairy Sci., 1966, 49, 259.
- 8\_BIZOT, J., Bull. Soc. chim., 1967, 1, 151.
- 9\_BLACK, S.H. & GERHARDT, P., J. Bacteriol., 1962, 83, 301.
- 10\_BRETZ, H.W. & KOCKA, F.E., Can. J. Microbiol., 1967, 13, 914.
- 11\_CALCOTT, P.H., LEE, S.K. & MacLEOD, R.A., Can. J. Microbiol., 1976, 22, 106.

- 12\_CHARET, P., TETAERT, D., HAN, K.K., MONTREUIL, J., C. R. Acad. Sci. (Paris) (Ser. D), 1973, 276, 1629.
- 13\_CLEMENT, M.T., Can. J. Microbiol., 1961, 7, 99.
- 14\_COWMAN, R.A. & SPECK, M.L., J. Dairy Sci., 1965, 48, 1531.
- 15\_COWMAN, R.A. & SPECK, M.L., Cryobiology, 1969, 5, 291.
- 16\_CURRAN, H.R., BRUNSTETTER, B.C. & MYERS, A.T., J. Bacteriol., 1943, 45, 485.
- 17\_DAVIS, J.D., in "The frozen Cell. A ciba foundation symposium" (p.213) (G.E.W. Wolstenhome & M.O'Connor), Churchill, London, 1970.
- 18\_DRING, G.J. & GOULD, G.W., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1975, 66, 202.
- 19\_FARRELL, J. & ROSE, A.H., in "Thermobiology" (p. 147) (A.M. Rose), Academic Press, New York, 1967.
- 20\_FISCHER, K., Angew. chem., 1935, 48, 394.
- 21\_GABIS, D.A., Doctoral Thesis, North Carolina State University, 1970.
- 22\_GIBSON, C.A., LANDERKIN, G.B. & MORSE, P.M., J. Dairy Res., 1965 32, 151.

- 23\_GLAUERT, A.M. & GLAUERT, R.H., J. Biophys. Biochem. Cytol., 1958, 4, 191.
- 24\_HAGEN, P.O., in "Inhibition and destruction of the microbial cell"  
(p.39) (W.B. Hugo), Academic Press, New York, 1971.
- 25\_HARRISON, A.P., Antonie Van Leeuwenhoek, 1956, 22, 407.
- 26\_HENDERSON, P.J.F., Annu. Rev. Microbiol., 1971, 25, 393.
- 27\_HENRY, B.S. & FRIEDMAN, C.A., J. Bacteriol., 1937, 33, 323.
- 28\_HILLARD, C.H. & DAVIS, M.A., J. Bacteriol., 1918, 3, 423.
- 29\_HITCHINS, A.D. & GOULD, G.W., Nature, 1964, 203, 895.
- 30\_HOLLANDER, D.H. & NELL, E.E., Appl. Microbiol., 1954, 2, 164.
- 31\_IONESCO, H., MICHEL, J., CAMI, B. & SCHAEFFER, P., J. Appl. Bacteriol.,  
1970, 33, 13.
- 32\_JANSSEN, F.W., LUND, A.J. & ANDERSON, L.E., Science, 1958, 127, 26.
- 33\_JOHANNSEN, E., J. Appl. Bacteriol., 1972, 35, 415.
- 34\_KEITH, S.C., Science, 1913, 37, 877.
- 35\_KOHN, A., J. Bacteriol., 1960, 79, 697.

- 36\_KONDO, M., TAKEDA, Y. & YONEDA, M., Biken's J., 1964, 7, 153.
- 37\_KUO, S.C. & MacLEOD, R.A., J. Bacteriol., 1969, 98, 651.
- 38\_LAMPRECH, E.D. & FOSTER, E.M., J. Appl. Bacteriol., 1963, 26, 359.
- 39\_LEWIS, J.C., SNELL, N.S. & BURR, H.K., Science, 1960, 132, 544.
- 40\_MacFADYEN, A., Proc. R. Soc., 1900, B 66, 180.
- 41\_MacLEOD, R.A., KUO, S.C. & GELINAS, R., J. Bacteriol., 1967, 93, 961.
- 42\_MAJOR, C.P., McDOUGAL, J.D. & HARRISON, A.P., J. Bacteriol., 1955, 69, 244.
- 43\_MAZUR, P., Mechanisms of injury in frozen and frozen-dried cells, in  
"Culture collections : perspectives and problems", (p.59)  
(S.M. Martin), University of Toronto Press, Toronto, 1963.
- 44\_MAZUR, P., Physical and chemical basis of injury in single-celled micro-  
organisms subjected to freezing and thawing, in "Cryobiology"  
(p.74) (H.T. Meryman), Academic Press, New York, 1966.
- 45\_MAZUR, P., Science, 1970, 168, 939.
- 46\_MEAD, D.D., WESSMAN, G.E., HIGUCHI, K. & SURGALLA, M.J., Appl. Microbiol.,  
1960, 8, 55.

- 47\_MINO SOTELO, H., D.E.A de Biochimie Univ. Sc. et Tech. Lille I, 1974.
- 48\_MORICHI, T., IRIE, R., YANO, N. & KEMBO, H., J. Gen. Appl. Microbiol., 1963, 9, 149.
- 49\_MORICHI, T., in "Freezing and drying of microorganisms" (p.53) (T. Nei), University Park Press, Baltimore, 1969.
- 50\_MOSS, C.W. & SPECK, M.L., Appl. Microbiol., 1963, 11, 326.
- 51\_MOSS, C.W. & SPECK, M.L., J. Bacteriol., 1966, 91, 1098.
- 52\_MOSS, C.W. & SPECK, M.L., J. Bacteriol., 1966, 91, 1105.
- 53\_MURREL, W.G. & WARTH, A.D., in "Spores III" (p.1) (L.L. Campbell & H.O. Halvorson), Am. Soc. Microbiol., Ann Arbor, Michigan, U.S.A., 1965.
- 54\_NEI, T., in "Recent researches in freezing and drying" (p. 78) (A.S. Parkes & A.U. Smith), Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1959.
- 55\_NEI, T., ARAKI, T. & MATSUSAKA, T., in "Cellular injury and resistance in freezing organisms Vol. II" (p. 157) (A. Asahima), The Institute of low temperature science, Hokkaido University, Sapporo, 1967.
- 56\_NEI, T., ARAKI, T. & MATSUSAKA, T., in "Freezing and drying of microorganisms" (p.3) (T. Nei), University Park Press, Baltimore, 1969.

- 57\_O'HARA, Y., *Low Temp. Sci. Ser. B, Biol. Sci.*, 1954, 12, 37.
- 58\_PFENNIG, N., *Ark. Mikrobiol.*, 1957, 26, 345.
- 59\_PICTET, R. & YUNG, E., *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, 1884, 98, 747.
- 60\_POSTGATE, J.R. & HUNTER, J.R., *J. Gen. Microbiol.*, 1961, 26, 367.
- 61\_POSTGATE, J.R. & HUNTER, J.R., *J. Appl. Bacteriol.*, 1963, 26, 405.
- 62\_POWELL, J.F. & STRANGE, R.E., *Biochem. J.*, 1953, 54, 205.
- 63\_POWELL, J.F., *Biochem. J.*, 1953, 54, 210.
- 64\_PROKOP, A. & HUMPHREY, A.E., *Folia Microbiol.*, 1972, 17, 435.
- 65\_RAPATZ, G. & LUYET, B., *Abstracts of the Biophysical Society, 7<sup>th</sup> Annual Meeting, New York, 1963*, WE 11.
- 66\_RAY, B., JANSSEN, D.W. & BUSTA, F.F., *Appl. Microbiol.*, 1972, 23, 803.
- 67\_RAY, B., & SPECK, M.L., *Appl. Microbiol.*, 1972, 24, 258.
- 68\_RAY, B. & SPECK, M.L., *Appl. Microbiol.*, 1972, 24, 585.
- 69\_RAY, B., SPECK, M.L. & DOBROGOSZ, W.J., *Abstracts of the annual meeting of the American Society for Microbiology, 1973*, 18.

- 70\_RAY, B. & SPECK, M.L., Rev. Clin. Lab. Sci. U.S.A., 1973, 4, 161.
- 71\_REYNOLDS, E.S., J. Cell. Biol., 1963, 17, 208.
- 72\_ROSS, K.F.A. & BILLING, E., J. gen. Microbiol., 1957, 16, 418.
- 73\_RYTER, A. & KELLENBERGER, F., Z. Naturforsch., 1958, 13<sup>b</sup>, 597.
- 74\_RYTER, A., SCHAEFFER, P. & IONESCO, H., Ann. Inst. Pasteur, 1966, 110, 305.
- 75\_SATO, T., Low Temp. Sci. Ser. B, Biol. Sci., 1954, 12, 39.
- 76\_SCHAEFFER, P., MILLET, J. & AUBERT, J.P., Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.,  
1960, 54, 704.
- 77\_SMITTLE, R.B., GILLILAND, S.E. & SPECK, M.L., Appl. Microbiol., 1972,  
24, 551.
- 78\_SPACKMAN, D.H., STEIN, W.A. & MOORE, S., Anal. chem., 1958, 30, 1190.
- 79\_STRAKA, R.P. & STOKES, J.L., J. Bacteriol., 1959, 78, 181.
- 80\_SWARTZ, H.M., Cryobiology, 1970, 6, 546.
- 81\_SWARTZ, H.M., Cryobiology, 1971, 8, 255.
- 82\_TALLENTIRE, A., J. Appl. Bact., 1970, 33, 141.

83\_TOYOKAWA, K. & HILLANDER, D.M., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1956, 92, 499.

84\_TSUJI, K. & PERKINS, W.E., J. Bact., 1962, 84, 81.

85\_VINTER, V., Folia Microbiol., 1960, 5, 217.

86\_VINTER, V., in "Spores II" (p. 127) (H.O. Halvorson), Burgess Publishing Co., Minneapolis, U.S.A., 1961.

87\_VINTER, V., in "Spores III" (p. 25) (L.L. Campbell & H.O. Halvorson), Am. Soc. Microbiol., Ann Arbor, Michigan, U.S.A., 1965.

88\_VINTER, V., Physiology and biochemistry of sporulation in "The bacterial spore", (p. 73) (G.W. Gould & A.H. Hurst), Academic Press, New York, 1969.

89\_WARSECK, M., Master's Thesis, North Carolina State University, 1973.

90\_WARTH, A.D., OHYE, D.F. & MURREL, W.G., J. Cell. Biol., 1963, 16, 579.

91\_WARTH, A.D., OHYE, D.F. & MURRELL, W.G., J. Cell Biol., 1963, 16, 593.

92\_WEISER, R.S. & OSTERUD, C.M., J. Bacteriol., 1945, 50, 413.

93\_WOODBURN, M.J. & STRONG, D.H., Appl. Microbiol., 1960, 8, 109.