

RECHERCHES PRELIMINAIRES SUR LA CONTAMINATION DES ANCHOIS EN SAUMURE PAR *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS*

par François CAMPELLO et Anne COLAS ⁽¹⁾

Résumé

Les auteurs recherchent l'origine de la contamination des anchois mûrs (*Engraulis encrasicolus* L.) par des anaérobies sulfite-réducteurs (A.S.R.). Ils disposent (1) de poissons pêchés le long des côtes du Roussillon en juin 1981, mûris à 20° C selon la méthode sicilienne sur lesquels ils prélèvent les filets et la partie distale de l'intestin qui reste après étêtage et éviscération, (2) de viscères totaux d'anchois pêchés dans le golfe de Gascogne en mars 1982, présalés pendant 12 h et maintenus à -18° C pendant 5 jours et (3) de sel marin. Ils utilisent une formule commerciale de la gélose SPS salée à 3 % ou non salée,ensemencée avec des broyats chauffés ou non. L'anchois mûr a des caractéristiques qui le classent parmi les aliments acides à humidité intermédiaire et qui entraînent la sporulation des bactéries qui le peuvent. La contamination a une origine intestinale. Les souches testées sont identifiées à *Clostridium perfringens*. Elles ne peuvent plus cultiver si la teneur en sel du milieu est supérieure à 6 %. Cette salinité est voisine de celle du poisson après 12 h de pré-salage. La technologie stabilise le nombre des ASR en les faisant sporuler. Il est pratiquement possible d'éliminer les spores de la partie consommable.

Abstract

The contamination of maturated anchovies (*Engraulis encrasicolus* L.) by sulfite reducing anaerobes (S.R.A.) is investigated. Samples are (1) fishes from Roussillon coast caught in june 1981, maturated at 20° C according to the *carne a carne* method which gives filets and final intestin remaining after nobbing, (2) total viscera of anchovies from the Bay of Biscaye fished in march 1982, presalted during 12 h and maintained at -18° C during 5 days, (3) solar salt. The numerations are made in SPS agar, 0 and 3 % salt added, sowed with heated or not grinds. The mature anchovy is lightly acid and has a weak a_w value. It is an intermediate moisture product in which bacteria sporule. The contamination has a gut origin. The tested microorganisms are *Clostridium perfringens*. They cannot make black colonies in an agar the salinity of which is more than 6 %. This salted level is nearly that of the fish after 12 h of pre-salting. Technology may limited the S.R.A. level by sporulation. In actual fact spores can be eliminated from the edible part.

(1) I.S.T.P.M., Département Utilisation et Valorisation des produits, B.P. 1049, 44037 Nantes cedex.

I. — Historique.

1. Milieux d'avant 1979.

Depuis les recherches sur la réduction des sulfates et des sulfites minéraux par les bactéries anaérobies (PRÉVOT, 1948), les méthodes utilisées pour la recherche des *Clostridium* dans les produits alimentaires et leur dénombrement en milieux solides reposent sur la formation de précipités noirs de sulfure de fer autour des colonies. BUTTIAUX *et al.* (1955) ont utilisé cette propriété. Malheureusement d'autres bactéries possèdent aussi des sulfites-réductases : entérobactéries, streptocoques, staphylocoques, Bacillaceae. Dès 1959, MOSSEL supprime la croissance de la plupart des Enterobacteriaceae par addition de sulfate de polymyxine B. Les recherches se poursuivent pour mettre au point une gélose sélective pour les anaérobies sulfito-réducteurs toxico-infectieux parmi lesquels se trouve *Clostridium perfringens*.

En 1962, la gélose SPS (sulfite-polymyxine-sulfadiazine) de ANGELOTTI *et al.* bloque la croissance des entérocoques, des staphylocoques et des entérobactéries testés. Elle permet la numération de plusieurs souches de *C. perfringens*, mais laisse croître d'autres *Clostridium*, tels que *C. bifementans*. Utilisée en routine de contrôle, elle donne des résultats du même ordre de grandeur qu'une gélose non sélective. Quelques années plus tard, plusieurs auteurs (HAUSCHILD *et al.*, 1967; HARRIS et LAWRENCE, 1970; HARMON *et al.*, 1971) signalaient le faible taux de récupération de *C. perfringens* avec les préparations commerciales.

En 1965, MARSCHAL *et al.* présentent la gélose TSN (tryptose-sulfite-néomycine) comme supérieure aux préparations commerciales de la gélose SPS. Elle a l'inconvénient d'inhiber la croissance de certaines souches de *C. perfringens* (HARMON *et al.*, 1971, a et b). Ces auteurs donnent la composition de la gélose TSC (tryptose-sulfite-cyclosérine) à la suite des travaux de FÜZI et CSUKAS qui, en 1969, avaient mis en évidence la sélectivité apportée par la cyclosérine vis-à-vis de *C. perfringens*.

En 1971 également, SHAHIDI et FERGUSON publient la composition et les résultats obtenus avec leur gélose SFP (Shahidi-Fergusson-Perfringens) aux sulfates de polymyxine B et de kanamycine. Elle n'inhibe pas certaines entérobactéries, *Streptococcus faecalis* et *Bacillus cereus*. En 1974, HAUSCHILD et HILSHEIMER modifient la composition de la gélose TSC en éliminant le jaune d'œuf. Cette formule devient la méthode AOAC (Association of Official Analytical Chemists).

En 1978, ERICKSON et DEIBEL proposent leur bouillon RPM (Rapid Perfringens Medium). Il permet le dénombrement par la technique du nombre le plus probable (NPP ou MPN). Sa sélectivité, présentée comme supérieure à celle des géloses SPS et TSC, est basée sur le mélange des sulfates de polymyxine B et de néomycine. Ce bouillon n'est pas suffisamment connu quand l'arrêté relatif aux critères microbiologiques dans les denrées animales ou d'origine animale est publié en 1979. C'est la raison pour laquelle il conseille trois géloses : SPS, TSN et TSC pour la recherche et le dénombrement des anaérobies sulfito-réducteurs.

2. Milieux d'après 1979.

ROMOND *et al.* présentent, en 1981, un bouillon au lactose qui contient du métabisulfite de sodium anhydre et du citrate de fer ammoniacal, mais pas d'antibiotique. Il est comparé à la gélose TSC dans laquelle la cyclosérine est omise en raison de son pouvoir inhibiteur. Cette gélose ne donne de résultat qu'après 72 h et elle exige de nombreuses manipulations. La nouvelle technique permet d'obtenir les mêmes résultats en 12-24 h, même en présence d'un nombre important de *Clostridium* sulfito-réducteurs autres que *C. perfringens*.

Pendant 10 ans (1970-1980), le Service des Contrôles de l'I.S.T.P.M. recherche les spores d'anaérobies sulfito-réducteurs (ASR) dans une gélose non sélective : la gélose au sulfite et au fer, salée à 3 % et incubée à 37° C. Il n'y a pratiquement jamais de développement de colonies noires. En 1981, son remplacement par une formule commerciale, non salée, de la gélose SPS, choisie parce qu'il n'y a aucune addition à effectuer au moment de l'emploi, révèle la présence de formes végétatives et/ou sporulées d'ASR dans les différentes présentations d'anchois.

3. Intoxications alimentaires à ASR en France.

Le principal agent des toxi-infections alimentaires qui soit en même temps anaérobie et sulfito-réducteur est *Clostridium perfringens*. Il ressort d'une étude récente (BILLON *et al.*, 1977) portant sur 114 intoxications alimentaires que les causes les plus fréquentes sont les ASR, dont le type est *C. perfringens*, avec près de 30 % des cas. La numération est alors supérieure à 10⁵/g. Cependant, parmi les 10 produits de la pêche examinés, les ASR ne sont responsables que d'une seule intoxication et encore ne doit-il pas s'agir d'un produit hyper-salé.

4. Les *Clostridium* isolés en gélose SPS.

Si l'on emploie une gélose SPS, seules des espèces du genre *Clostridium* donnent des colonies noires d'après ANGELOTTI *et al.* (1962). Elles sont au nombre de 5 : *C. bifermentans*, *C. perfringens*, *C. putrefaciens*, *C. sporogenes* et *C. tetani*. Les toxi-infections étudiées par ces auteurs sont causées par deux *Clostridium* : *C. bifermentans* et *C. perfringens*. L'identification de *C. perfringens* est aisée puisqu'il est le seul à posséder en même temps les deux caractères d'immobilité et de réduction des nitrates en nitrites.

5. L'agent causal des toxi-infections alimentaires (TIA).

Nous savons, depuis les travaux de FRIEBEN et DUNCAN (1973) et de DUNCAN (1975), que l'entérotoxine des *Clostridium perfringens* type A est liée à la spore. La TIA à *C. perfringens* est la conséquence de l'ingestion d'un grand nombre de formes végétatives qui sporulent dans les intestins. La sporulation, avec formation concomitante d'entérotoxine, peut être réalisée en milieux complexes (DUNCAN et STRONG, 1968). Nous n'avons que peu d'information sur sa fréquence et son étendue dans les aliments. Le dosage de l'entérotoxine est possible après ensemencement massif et incubation d'aliments (NAIK et DUNCAN, 1977 ; CRAVEN *et al.*, 1981).

II. — But de l'étude.

Technologiquement il n'y a pas de différence entre anchois au sel et anchois en saumure : ils sont tous en saumure au cours et à la fin de leur maturation. En effet, quelle que soit la technologie employée : méthode sicilienne ou basque, le pressage auquel ils sont soumis fait exsuder une partie de l'eau de constitution immédiatement transformée en saumure saturée dans laquelle les poissons baignent pendant toute la durée de leur maturation. Ensuite ils ont plusieurs destinées. Dans tous les cas ils sont débarrassés des parties non consommables : peau, arête centrale, résidus d'organes et cristaux de sel. Ils ne sont jamais dessalés. Les filets peuvent être présentés entiers de diverses façons ou broyés avec des ingrédients variés.

D'après les résultats dont nous disposons : 100 % des anchoïades, des crèmes d'anchois, des filets au vinaigre et des filets à l'huile et aux câpres, 77,8 % des anchois au sel, 75 % des anchois au vinaigre et 61,5 % des filets à l'huile sont contaminés par des ASR en quantité variable. Cette contamination est mise en évidence au Service du Contrôle par mise en culture en gélose SPS non salée d'un broyat non chauffé.

Nous nous proposons de rechercher les origines de cette contamination dans les éléments en présence.

III. — Matériel et méthodes.

Nous disposons :

1) d'anchois mis au sel par un industriel selon la méthode sicilienne, placés dans une enceinte thermostatée et arrivés à maturation à 20° C. Pour chaque essai nous prélevons 5 anchois, soit environ 75 g. Les filets sont levés, puis lavés, soit en saumure stérile, soit dans de l'eau du réseau

de distribution publique. Les industriels lavent les anchois avant le désarêtage. Nous avons reporté cette opération après. Nous prélevons 4 g de chair par anchois pour en obtenir 20 g ;

2) des résidus de leur intestin inévitables dans des anchois non présentés en filets, après étêtage et éviscération manuels. Il faut environ 50 anchois pour obtenir 20 g de parties terminales du tube digestif ;

3) de viscères d'anchois prélevés après quelques heures de présalage, maintenus à — 18° C pendant 5 jours et analysés après décongélation. Le prélèvement est aussi de 20 g.

Analyses n°	Cellules et spores/g		Spores/g	
	SPS 0 % NaCl	SPS 3 % NaCl	SPS 0 % NaCl	SPS 3 % NaCl
1	0	0	0	0
2	1	0	0	0
3	0	0	0	0
4	0	0	0	0
5	1	0	0	0
Moyenne	0,4	0	0	0

TABL. 1. — Recherche des anaérobies sulfito-réducteurs dans les anchois mûrs ; filets lavés en saumure saturée stérile.

Analyses n°	Cellules et spores/g		Spores/g	
	SPS 0 % NaCl	SPS 3 % NaCl	SPS 0 % NaCl	SPS 3 % NaCl
1	0	0	0	1
2	0	0	0	0
3	1	0	0	0
4	0	0	0	0
5	0	0	0	0
Moyenne	0,2	0	0	0,2

TABL. 2. — Recherche des anaérobies sulfito-réducteurs dans les anchois mûrs ; filets lavés à l'eau urbaine

Dans tous les cas, le prélèvement est mis en suspension au 1/5 dans le diluant préconisé par ROMOND *et al.* (1981) pour les anaérobies. Après broyage dans des conditions aseptiques une partie du broyat est portée à 80° C pendant 10 mn puis refroidie sous un courant d'eau. L'autre partie n'est pas chauffée. Les dilutions successives ultérieures sont au 1/10 dans le même diluant. Nous ensemençons des volumes de 1 ml dans des tubes de 20 ml de gélose SPS, l'une normale (0 % NaCl), l'autre salée (3 % NaCl) ;

4) de gros sel de mer. Nous avons analysé deux saumures saturées, constituées par dissolution de 178,5 g de sel dans 500 ml d'eau distillée stérile. Des parties aliquotes représentant 0,36, 1, 10, 20 et 50 g de NaCl sont filtrées sur membrane stérile. Chacune est déposée sur une gélose SPS non salée fraîchement préparée puis recouverte de 20 ml de la même gélose régénérée à 100° C et refroidie à 46° C. Les boîtes sont disposées dans des sachets de polyamide scellés sous vide et incubées à 46° C pendant 24 h.

IV. — Résultats.

1. Résultats quantitatifs.

A partir des filets mûrs lavés en saumure (tabl. 1), on observe qu'il n'y a pas de croissance à partir du broyat chauffé. De même, nous notons l'absence de croissance dans la gélose salée à partir du broyat non chauffé. Il y a en moyenne 0,4 ASR/g de filet. Ces mêmes filets lavés à l'eau (tabl. 2) donnent une culture avec 1 colonie dans la gélose salée à partir du broyat chauffé de même que dans la gélose non salée à partir du broyat non chauffé. Il y a absence de culture dans les deux autres cas. Il y a environ 0,2 ASR/g de filet. Une méthode de lavage donne un résultat double de l'autre ; cela ne semble pas significatif étant donné le petit nombre des analyses. Au stade final de la maturation la contamination est faible (0,3 ASR/g) sans pour autant être nulle.

Les résidus d'intestin (tabl. 3) ne donne pas de croissance dans les géloses salées. Le broyat chauffé met en évidence 6 spores dans la gélose non salée. Le broyat non chauffé donne un résultat voisin : 4 colonies dont on ne peut pas affirmer qu'elles ne proviennent pas de spores. En moyenne il y a 1 ASR/g de résidu d'intestin. Avec les viscères décongelés et faiblement salés (tabl. 4), les cultures sont rares et pauvres dans les géloses salées. Elles sont déjà plus nombreuses

Analyses n°	Cellules et spores/g		Spores/g	
	SPS 0 % NaCl	SPS 3 % NaCl	SPS 0 % NaCl	SPS 3 % NaCl
1	0	0	1	0
2	4	0	0	0
3	0	0	2	0
4	0	0	3	0
5	0	0	0	0
Moyenne	0,8	0	1,2	0

TABL. 3. — Recherche des anaérobies sulfito-réducteurs dans les anchois mûrs ; résidus d'intestin.

et plus abondantes à partir du broyat chauffé ensemencé dans une gélose non salée. Les 5 essais fournissent des cultures, parfois très abondantes, à partir du broyat non chauffé ensemencé en gélose non salée : environ 30 ASR/g. Dans le cas du sel (tabl. 5), les colonies n'apparaissent que si des quantités assez importantes sont ensemencées. Nous n'avons pas procédé à la recherche des spores après chauffage. Nous pensons qu'ici toutes les formes sont sporulées : 0,02 ASR/g. Le tableau 6 récapitule les résultats obtenus. Les viscères sont la source principale de contamination des anchois salés.

Analyses n°	Cellules et spores/g		Spores/g	
	SPS 0 % NaCl	SPS 3 % NaCl	SPS 0 % NaCl	SPS 3 % NaCl
1	51	0	5	0
2	15	0	2	0
3	78	0	0	0
4	8	0	3	0
5	6	1	3	1
Moyenne	31,6	0,2	2,6	0,2

TABL. 4. — Recherche des anaérobies sulfito-réducteurs dans les anchois pré-salés ; viscères décongelés.

Analyses n°	Cellules et spores/g		Spores/g	
	SPS 0 % NaCl	SPS 0 % NaCl	SPS 0 % NaCl	SPS 3 % NaCl
1	2	/	/	/
2	2	/	/	/
Moyenne/g	0,02	/	/	/

TABL. 5. — Recherche des anaérobies sulfito-réducteurs dans du gros sel de mer ; saumure saturée.

		Formes sporulées et végétatives/g	Formes sporulées/g
Anchois mûrs	Filets lavés	0,3	0,0
	Résidus d'intestin	0,8	1,0
Anchois présalés	Viscères décongelés	32,6	2,6
Sel de mer	Saumure saturée	0,02	/

TABLEAU 6

2. Résultats qualitatifs.

45 % des souches obtenues sont repiquées en gélose nitrate-mobilité et une coloration de Gram est réalisée. Toutes sont constituées de bacilles à Gram positif non sporulés. Après 24 h d'incubation à 46° C, toutes les souches sont immobiles. L'addition de quelques gouttes de réactif de Griess fait apparaître une coloration rouge dans tous les tubes. Parmi les ASR isolés en gélose SPS, seul *C. perfringens* est immobile et réduit les nitrates en nitrites. Nous identifions toutes nos souches à cette espèce. Nous n'avons pas isolé de *C. bifermentans* ou tout autre *Clostridium*. Les souches testées pour leur halophilie, à 46° C en 24 h, au cours de ce travail, ne peuvent plus former de précipité noir en gélose SPS salée à 6 % et dont la teneur en eau libre, a_w est de 0,98. Il est respectivement de 0,99 et de 0,95 dans les géloses SPS salées à 5 et à 7 %.

V. — Discussion.

Une gélose SPS dont la salinité est voisine de celle de l'eau de mer ne permet pas la formation de colonies noires, sauf rares exceptions. Il semble qu'avec ou sans antibiotique et en présence de 3 % de chlorure de sodium une gélose au sulfite et au fer ne soit pas un bon milieu pour la récupération des ASR au sortir d'un aliment fortement salé. La même gélose non salée paraît être un milieu plus favorable pour leur développement : des cultures sont souvent obtenues. Ceci éclaire le fait que pendant quelques années peu de colonies noires aient été vues dans la gélose au sulfite et au fer sans agent sélectif, salée à 3 % bien que des ASR soient présents dans le broyatensemencé.

Il ne semble pas y avoir de différence dans les numérations que les broyats soient chauffés ou non, sauf dans le cas des viscères décongelés, soit que la sporulation ne soit pas complète, soit que la décongélation ait permis une germination suivie d'un début de multiplication. Il se peut que le faible taux de récupération des spores soit dû à la qualité de la gélose employée (HARMON *et al.*, 1971) et/ou au nombre restreint de nos ensemencements effectués à partir d'un seul récipient de maturation de qualité homogène.

L'anchois, dès les premières heures de sa mise au sel, n'offre plus les conditions nécessaires à la vie végétative des *Clostridium*. En effet, après une douzaine d'heures de pré-salage, étape qui suit immédiatement la pêche, la multiplication des ASR dans l'intestin, en particulier les sporulés, protéolytiques, non putréfiants, est inhibée puisque la teneur en chlorure de sodium y atteint déjà 7 %. L'étêtage-éviscération, stade suivant de la technologie de l'anchoitage, contribue largement à l'élimination de cette source de contamination.

Un travail antérieur a permis de constater qu'au bout de quelques jours de mise au sel la

salinité du filet est très forte : 16 % de la matière humide, et qu'elle ne varie plus. Le pH (5,3) relativement acide n'est pas un facteur particulièrement favorable à la multiplication *. Après 15 jours de saumurage la teneur en eau libre est abaissée à 0,75, alors qu'elle est voisine de 1 dans l'anchois frais. L'anchois mûr est donc un aliment à humidité intermédiaire. Cette a_w réduite empêche toute vie végétative pour les germes pathogènes et toxigènes (LEISTNER, comm. pers.). Dans de telles conditions d'environnement les ASR présents sporulent. À ce stade, bien avant la fin de la maturation qui intervient après 2 à 3 mois, le nombre des spores d'ASR est fixé à sa valeur définitive qui est très basse.

Les numérations en géluses salées et non salées se recourent. Il n'y a qu'un très petit nombre de formes sporulées d'ASR dans les anchois étêtés-éviscérés. Ce sont elles qui sont importantes dans les toxi-infections alimentaires. Ici elles ne peuvent pas être nuisibles à la santé du consommateur si une technologie convenable est appliquée. Le nombre des spores dans nos anchois mûrs est bien trop faible pour permettre un dosage de l'entérotoxine existante.

Ces quelques analyses prouvent que l'anchois héberge des ASR, en particulier des *C. perfringens*, dans son tube digestif. Ceci ne doit pas nous surprendre étant donné l'universalité de ce germe. Le sel amène quelques rares ASR dans le milieu de maturation. Il agit en créant des conditions peu favorables à leur développement, surtout par limitation de l'eau disponible. À la fin d'un séjour de quelques mois en milieu fortement imprégné de chlorure de sodium, les résidus d'intestin ne renferment plus qu'un ASR par gramme au lieu de 30. Quand l'anchois est mûr, la plupart des ASR n'est plus revivifiable.

L'industriel qui procède à la mise en filets et le consommateur qui achète pour ses besoins personnels des anchois « au sel » vont ôter la peau du poisson et le débarrasser des autres parties non consommables. Les filets sont ainsi mis à l'abri de leur source principale de contamination. La consommation peut avoir lieu immédiatement ou après un séjour limité dans l'huile ou le vinaigre, à température convenable, sans danger.

Conclusion.

Du fait des caractéristiques physico-chimiques qu'il acquiert en cours de maturation, l'anchois devient un aliment qui est à l'abri de la prolifération des germes pathogènes, toxigènes et putréfiants habituels. Il peut être le siège d'une multiplication de germes halophiles et halotolérants ainsi que d'une action enzymatique s'il n'est pas placé à + 4° C quand sa maturation est terminée. Si nous ne connaissons pas l'effet des germes exigeants et tolérants vis-à-vis du chlorure de sodium sur la santé publique, nous savons par contre que l'entreposage prolongé à une température supérieure à celle de la réfrigération aboutit à une protéolyse totale.

Actuellement l'arrêté du 21 décembre 1979 relatif aux critères microbiologiques des denrées animales ou d'origine animale divise les anchois en « anchois au sel ou à l'huile » d'une part et en « anchois en saumure » d'autre part. Cette séparation ne nous semble pas justifiée. À la lumière de la technologie et de l'hygiène nous pensons qu'il conviendrait mieux de séparer les anchois différemment : d'une part les anchois salés tels quels et les produits qui en dérivent, d'autre part les filets avec les produits qui en sont issus.

Manuscrit reçu le 14 septembre 1982.

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier les personnes de l'I.S.T.P.M. qui nous ont permis de réaliser ce travail, notamment MM. HAN-CHING, chef du laboratoire "Qualité" qui a autorisé ces recherches. P. DURAND qui a effectué des prélèvements lors d'une campagne océanographique et G. PICLET du Service des Contrôles qui a mis ses statistiques d'analyses à notre disposition.

* Le taux de matière sèche est de 50 % de celui de la matière humide dès le neuvième jour et il reste constant.

BIBLIOGRAPHIE

- ANGELOTTI (R.), HALL (H.E.), FOTER (M.J.) et LEWIS (K.H.), 1962. — Quantitation *Clostridium perfringens* in foods. — *Appl. Microbiol.*, **10**: 193-199.
- BEERENS (H.), 1957. — La survie des *Clostridium* dans les saumures de viande. — Proc. 2nd int. Symp. Food Technol., 1958: 235.
- BILLON (J.), PERPEZAT (A.) et CHARRIER (M.), 1977. — Etude des 114 intoxications alimentaires. — *Médecine et Nutrition*, **13**: 277-280.
- BUTTIAUX (R.), COIN (L.), TROCHOU (P.) et MORIAMEZ (J.), 1955. — Le problème de la salubrité des huîtres dans le centre ostréicole de la Basse-Seudre. — *Rev. Hyg. Méd. soc.*, **3**: 409.
- CRAVEN (S.E.), BLANKENSHIP (L.C.) et McDONEL (J.L.), 1981. — Relationship of sporulation, enterotoxin formation and spoilage during growth of *Clostridium perfringens* in cooked chicken. — *Appl. environm. Microbiol.*, **41**: 1184.
- DUNCAN (C.L.), 1975. — Role of clostridial toxins in pathogenesis. — In: Microbiology 1975/Schlessinger (D.), édit. — Washington: American Society for Microbiology.
- DUNCAN (C.L.) et STRONG (D.H.), 1968. — Improved medium for sporulation of *Clostridium perfringens*. — *Appl. Microbiol.*, **16**: 82.
- ERICKSON (J.E.) et DEIBEL (R.H.), 1978. — New medium for rapid screening and enumeration of *Clostridium perfringens* in foods. — *Appl. environm. Microbiol.*, **36**: 567-571.
- FRIEBEN (W.) et DUNCAN (C.L.), 1973. — Homology between enterotoxin protein and spore structural protein in *Clostridium perfringens* type A. — *Eur. J. Biochem.*, **39**: 303.
- FUZI (M.) et CSUKAS (Z.), 1969. — New selective medium for the isolation of *Clostridium perfringens*. — *Acta Microbiol., Acad. Sci. Hung.*, **16**: 273-278.
- HARMON (S.M.), KAUTTER (D.A.) et PEELER (J.T.), 1971 a. — Comparison of media for the enumeration of *Clostridium perfringens*. — *Appl. Microbiol.*, **21**: 922-927.
- 1971 b. — Improved medium for enumeration of *Clostridium perfringens*. — *Appl. Microbiol.*, **22**: 688-692.
- HARRIS (L.F.) et LAWRENCE (J.V.), 1970. — *Bacteriol. Proc.*, **70**: 6.
- HAUSCHILD (A.H.W.), ERDMAN (I.E.), HILSHEIMER (R.) et THATCHER (F.S.), 1967. — Variation in recovery of *Clostridium perfringens* on commercial sulfite-polymyxine-sulfadiazine (SPS) agar. — *J. Food Sci.*, **32**: 469.
- HAUSCHILD (A.H.W.) et HILSHEIMER (R.), 1974. — Evaluation and modification of media for enumeration of *Clostridium perfringens*. — *Appl. Microbiol.*, **27**: 78-82.
- MOSSEL (D.A.A.), 1959. — Enumeration of sulfite reducing clostridia occurring in foods. — *J. Sci. Food Agric.*, **19**: 662.
- NAIK (H.S.) et DUNCAN (C.L.), 1977. — Enterotoxin formation in foods by *Clostridium perfringens* type A. — *J. Food Safety*, **1**: 7.
- PRÉVOT (A.R.), 1948. — Recherches sur la réduction des sulfates et des sulfites minéraux par les bactéries anaérobies. — *Ann. Inst. Pasteur*, **75**: 571.
- ROMOND (C.), BEERENS (H.), CRIQUELION (J.) et LE PAGE (C.), 1981. — Dénombrement en milieu liquide de *Clostridium perfringens* dans les aliments. — *Ann. Fals. Exp. chim.*, **74**: 181-184.
- SHAHIDI (S.A.) et FERGUSSON (A.R.), 1971. — New quantitative, qualitative and confirmatory media for rapid analysis of food for *Clostridium perfringens*. — *Appl. Microbiol.*, **21**: 500-506.