

Vème REUNION DES INSTITUTS DE RECHERCHES SUR LES VIANDES
Paris, 7 - 12 Septembre 1959

- - - - -

N° 30

ETUDE BACTERIOLOGIQUE DES SAUMURES DE JAMBON DE PARIS

Mise au point de milieux sélectifs
Principaux genres de bactéries rencontrées

Jeanne FOURNAUD, P. RAIBAUD et G. MOCQUOT (*)
Station Centrale de Recherches Laitières et de
Technologie des Produits animaux
C.N.R.Z. Jouy-en-Josas - France

INTRODUCTION -

En France, la bactériologie des saumures de jambon présente une grande importance ; en effet, l'addition de nitrite, qui donne la couleur rose à la viande après cuisson, est interdite par la législation actuelle. La formation de ce corps est donc entièrement sous la dépendance des microorganismes halophiles et cryophiles, capables de réduire les nitrates en nitrites. Divers auteurs (HENRY, GORET & JOUBERT(1), BUTTIAUX (2), ont étudié les principaux types de bactéries que l'on peut trouver dans la flore dominante de saumures de jambon de Paris, c'est-à-dire de saumures dont la concentration est d'environ 15 % en moyenne. Pour des saumures à plus forte concentration en sel (type boeuf ou bacon), d'autres auteurs (SMITH (3), GIBBONS cité par JENSEN (4), HORNSEY & MALLOWS (5), JESPERSEN & RIEMANN (6), INGRAM, KITCHELL & INGRAM(7), SULZBACKER (8), ont cherché à mettre au point les meilleures méthodes de numération et d'identification de la microflore.

Etant donné la diversité des types microbiens rencontrés (germes halophiles ou non halophiles, producteurs de nitrite ou non producteurs, acidifiants ou alcalinisants), nous avons pensé qu'il serait utile de mettre au point une méthode et des milieux capables de révéler l'équilibre existant entre ces divers types dans une saumure donnée. Une telle méthode doit permettre de suivre l'évolution de l'équilibre microbien et d'étudier les relations éventuelles entre cet équilibre microbien et les qualités organoleptiques du produit fini, c'est-à-dire du jambon tel qu'il est présenté au consommateur.

....

*) Avec la collaboration technique de R. LACOMBE, Centre Technique de la Salaison, de la Charcuterie et Conserves de Viande.

MATERIEL et METHODES -A - Origine des échantillons

Les saumures examinées dans ce travail proviennent de la charcuterie expérimentale du Centre Technique (*) ou d'ateliers artisanaux.

Toutes les souches décrites ont été isolées de ces saumures, sauf deux souches de Vibrio costicolus qui nous ont été envoyées par le Dr. BUTTIAUX (Institut Pasteur de Lille) et par les Etablissements OLIDA, Paris (**).

B - Techniques de numérations

Les numérations à l'état frais sont effectuées avec une cellule de Thoma.

Pour les numérations par culture, nous avons utilisé la méthode des dilutions décimales et l'ensemencement en milieu gélosé.

1) Diluant : Le diluant choisi a la composition suivante :

Extrait de Viande (Lab-Lemco)	10 g
Chlorure de sodium	130 g
Nitrate de potassium	8 g
Saccharose	8 g
Eau distillée	1000 cm ³

On ajuste le pH avant le premier autoclavage à 7,2. On autoclave à 120°C pendant 20 minutes. On filtre sur papier et on répartit 9,9 cm³ par tube de 18 x 180 mm. La stérilisation est faite à 118°C pendant 20 minutes.

2) Milieus de numération :a/ Milieus non sélectifs

Milieu T.V.S. (Tryptone, extrait de Viande, sel).

Le milieu T.V.S. est destiné à la numération de la flore dominante. Il a la composition suivante :

....

Centre Technique de la Salaison, de la Charcuterie et Conserves de Viande, 7 rue Alfred de Vigny, Paris (8ème). La charcuterie expérimentale est installée au Centre National de Recherches Zootechniques, à Jouy-en-Josas (S. & O.)

Nous adressons au Dr. BUTTIAUX et aux Ets OLIDA nos plus vifs remerciements pour l'envoi de ces souches.

Extrait de viande (Lab-Lemco)	25 g
Tryptone (Difco)	5 g
Chlorure de sodium	65 g
Nitrate de potassium	8 g
Saccharose	8 g
Pourpre de bromo crésol	0,02 g
Gélose	20 g
Eau distillée	1000 cm ³

On ajuste le pH avant le premier autoclavage à 7,2. On autoclave à 120°C pendant 20 minutes ; on filtre sur papier et on répartit 15 cm³ par tube de 18 x 180 mm. La stérilisation est faite pendant 20 minutes à 118°C.

Milieu au jus de viande (Milieu nutritif de BUTTIAUX cité par GRANVILLE & FIEVEZ (9) :

Extrait de viande	3 g
Tryptose	10 g
Glucose	5 g
Saccharose	5 g
Extrait de levure	3 g
Chlorure de sodium	130 g
Gélose	20 g
Eau	1000 cm ³
pH : 7	

On autoclave à 120°C pendant 20 minutes. On filtre sur papier et on répartit 15 cm³ par tube de 18 x 180 mm. La stérilisation est faite à 118°C pendant 20 minutes.

Au moment de verser le milieu en boîte de Pétri, on ajoute 1,5 cm³ de jus provenant de viande de porc fraîche, stérilisé par filtration sur filtre Seitz et dilué au 1/5.

Milieu à la Tryptose (BUTTIAUX (2)

Tryptose (Difco)	15 g
Extrait de viande de boeuf	3 g
Saccharose	20 g
Chlorure de sodium	60 g
Extrait de levure	3 g
Pourpre de bromocrésol	0,025 g
Gélose	15 g
Eau distillée	1000 cm ³
pH final : 7	

On autoclave à 120°C pendant 20 minutes. On filtre sur papier et on répartit 15 cm³ par tube de 18 x 180 mm. La stérilisation est faite à 118°C pendant 20 minutes.

b/ Milieux sélectifs

Milieu à l'acétate de thallium - Ajouter extemporanément à 15 cm³ de milieu T.V.S. 0,1 cm³ d'une solution à 15 % d'acétate de thallium stérile (concentration finale de l'acétate de thallium dans le milieu : 0,1 %).

Milieu à l'azide de sodium - On utilise 0,1 cm³ d'une solution à 1,5 % d'azohydrate (azide) de sodium stérile que l'on ajoute extemporanément à 15 cm³ de milieu T.V.S. (concentration finale de l'azide de sodium dans le milieu : 0,01 %).

Milieu au bleu de bromothymol - Le pourpre de bromocrésol du milieu TVS est remplacé par du bleu de bromothymol :

Broyer 1,5 g de bleu de bromothymol dans 16 cm³ de soude N/10. Ajouter de l'alcool à 70 % pour compléter à 100 cm³. Mettre 2,5 cm³ de cette solution mère pour 1000 cm³ de milieu TVS avant le premier autoclavage (concentration finale du bleu de bromothymol dans le milieu : 0,004 %).

Milieu à la safranine - Ajouter extemporanément 0,2 cm³ d'une solution stérile à 1 % de safranine dans 100 cm³ d'un milieu de même composition que le milieu TVS, mais ne contenant ni pourpre de bromocrésol ni saccharose (concentration finale de la safranine dans le milieu : 0,002 %).

Les solutions mères d'acétate de thallium, d'azide de sodium, de safranine sont stérilisées par séjour d'une demi-heure au bain-marie bouillant.

3) Technique d'ensemencement :

1 cm³ de chacun des tubes de dilution choisis est introduit dans une boîte de Pétri stérile. Puis on ajoute le milieu gélosé nutritif et on agite soigneusement.

En ce qui concerne le milieu sélectif à l'azide, nous utilisons une technique un peu différente : on pipette 1 cm³ du tube de dilution convenable dans un tube stérile intermédiaire de 18 x 180 mm qui a reçu au préalable 0,1 cm³ de la solution d'azide de sodium à 1,5 %. On laisse ce tube 5 minutes à la température ambiante (22°C - 24°C), maintenant ainsi les germes apportés par le cm³ de dilution dans une solution 15 fois plus concentrée en azide que le milieu gélosé final. Puis on ajoute 15 cm³ de milieu TVS et on verse le contenu du tube stérile intermédiaire dans une boîte de Pétri stérile (il n'est alors pas besoin d'agiter la boîte).

4) Température et durée d'incubation :

Les boîtes sont incubées 7 jours dans une étuve à 22°C. Une première lecture peut être faite au bout de 4 jours.

C - Tests d'identification

Avant d'effectuer les tests d'identification des souches isolées des divers milieux à partir des saumures analysées, on les repique 3 fois, toutes les 24 heures dans du bouillon et on les cultive à 22°C. Ce bouillon a la même composition que le milieu TVS, mais il ne contient ni gélose, ni pourpre de bromocrésol.

Les caractères suivants ont été étudiés :

1) Morphologie et coloration :

La morphologie et la mobilité sont observées à l'état frais au microscope à partir d'une goutte de culture en bouillon âgée de 18 heures. Pour faire une préparation colorée, on laisse sécher la goutte déposée sur la lame à la température ambiante. On fixe ensuite 10 minutes à l'éthanol à 95 % (PENSO, ORTALI & GORI (10), puis on colore par la méthode de Gram.

La disposition des cils a été recherchée par photographie au microscope électronique (*).

2) Présence de catalase :

On recherche la présence de catalase par émulsion d'une colonie prélevée sur un tube de gélose inclinée (milieu TVS sans saccharose) dans de l'eau oxygénée à 11 volumes.

3) Type respiratoire :

On ensemence les souches, cultivées sur bouillon sans nitrate, dans un tube Veillon. Cette recherche du type respiratoire est faite en parallèle sur milieu TVS et sur milieu TVS sans nitrate.

....

(*) Nous remercions vivement M. CORNUET, de la Station de Pathologie végétale du Centre National de Recherche Agronomique de Versailles, ainsi que le personnel du Service du Microscope électronique, pour leur précieux concours.

4) Recherche des nitrites :

La formation éventuelle des nitrites est décelée par la méthode de Griess.

5) pH des cultures :

Le pH est mesuré (à l'aide d'un pHmètre à électrode de verre) après 8 jours d'incubation à 22°C de la souche cultivée sur bouillon, avec ou sans nitrate.

6) Recherche de l'hydrogène sulfuré :

On ensemence les souches dans du bouillon qui contient, soit de l'hyposulfite de sodium (concentration finale de 0,05 %), soit du chlorhydrate de cystéine (concentration finale de 0,01 %). La production d'H₂S est décelée par la méthode du papier imprégné d'acétate de plomb basique. L'incubation est poursuivie 15 jours à 22°C.

7) Recherche de l'indole :

Les souches sont cultivées sur eau peptonée salée :

Peptone Evans	25 g
Chlorure de sodium	65 g
Eau distillée	1000 cm ³
pH 7	

Le milieu est réparti à raison de 5 cm³ en tube de 16 x 160 mm. On stérilise à 120°C pendant 20 minutes.

La recherche de l'indole s'effectue suivant la technique de FEARON (11), d'abord après incubation de 24 heures et ensuite après incubation de 15 jours à 22°C.

8) Recherche de la gélatinase :

Elle s'effectue sur milieu gélosé enrichi en gélatine ; à 100 cm³ de milieu TVS sans nitrate ni pourpre de bromocrésol, on ajoute 2 cm³ d'une solution aqueuse à 20 % de gélatine stérilisée à l'autoclave. Ce mélange, fait extemporanément, est coulé en boîte de Pétri, à raison de 15 à 20 cm³ par boîte (BUTTIAUX (12)).

Une goutte de la culture sur bouillon de la souche à étudier est ensemencée à la surface du milieu gélatiné (sans étalement). L'incubation se poursuit pendant 3 semaines à 22°C.

La recherche de l'hydrolyse de la gélatine s'effectue à l'aide d'une solution de sublimé (eau : 100 cm³, acide chlorhydrique concentré : 20 cm³, chlorure mercurique : 15 g).

Cette solution est versée dans la boîte de Pétri. Une auréole translucide autour de la colonie indique la présence d'une gélatinase.

9) Présence de pigment :

La présence de pigment est observée lors de la recherche de la gélatinase.

10) Croissance à différentes températures :

Une goutte d'une culture sur bouillon, âgée de 18 heures, estensemencée dans 8 cm³ de bouillon. Le temps d'incubation est de 15 jours à 4°C et de 8 jours à 22°C, 30°C, 37°C, 42°C et 45°C.

11) Tolérance au sel :

Une goutte d'une culture sur bouillon, âgée de 18 heures, estensemencée dans 8 cm³ de bouillon dont la concentration en chlorure de sodium est variable.

Les concentrations essayées, exprimées en g de chlorure de sodium pour 100cm³ de bouillon non salé, ont été : 0 - 2,5 - 5 - 10 - 15 - 20 - 22,5 - 25 - 27,5 - 30.

L'incubation se poursuit pendant 3 semaines à 22°C.

RESULTATS -

I - Dénombrement de la flore dominante

En premier lieu, nous avons cherché à dénombrer la flore dominante que pouvait contenir une saumure de jambon de Paris. Nous avons considéré successivement le choix du diluant, du milieu, de la température et de la durée d'incubation.

a) Liquide de dilution :

Après RIVIERE (13), nous avons essayé l'eau stérile pour diluer la saumure, mais nous avons observé des irrégularités dans les numérations : par exemple, on trouve de nombreuses colonies dans les boîtes ensemencées avec la dilution 10⁻⁴ et aucune

colonie dans les boîtes ensemencées avec la dilution 10^{-5} . De nombreux auteurs (INGRAM (14), JESPERSEN & RIEMANN (6), GIBBONS (15)) ont d'ailleurs souligné l'importance du sel dans le liquide de dilution. En principe, la concentration optimum en sel dans le liquide de dilution serait celle de la saumure à analyser, mais elle est assez difficile à réaliser en pratique, car la concentration en sel des saumures de charcuterie peut varier de 12 à 20 %.

Pratiquement, le diluant à 13 % de chlorure de sodium décrit plus haut donne toute satisfaction ; en effet, le nombre de colonies comptées sur les boîtes aux dilutions croissantes de la saumure décroît suivant un rapport décimal, aux erreurs d'expérience près.

b) Choix du milieu :

De nombreux essais, portant sur la dose de chlorure de sodium et d'extrait de viande, et sur la présence de tryptone, nous ont conduit à la composition du milieu T.V.S. Au cours de ces recherches, nous avons pu mettre en évidence (tableau I) l'importance de la nature de l'extrait de viande. L'incubation, pour cet essai, a été prolongée pendant un mois.

c) Choix de la température et de la durée d'incubation :

Des essais préliminaires ont montré qu'une incubation à 30°C permet un développement rapide, mais donne un nombre plus faible de colonies. Les colonies ainsi dénombrées ne correspondent d'ailleurs pas à la flore dominante (tableau 5) : ce sont surtout des microcoques. La durée des incubations à 4°C et 15°C est beaucoup plus longue qu'à 22°C et le nombre des colonies est le même.

En pratique, à 22°C, une première lecture peut être faite au bout de 4 jours, mais l'incubation doit être poursuivie pendant 7 jours.

d) Comparaison avec d'autres milieux :

Les numérations obtenues sur le milieu TVS ont été comparées avec la numération microscopique directe (tableau 2) et avec l'un des milieux enrichis en jus de viande de porc utilisé par divers auteurs (GRANVILLE & FIEVEZ (9), HORNSEY (16), JESPERSEN & RIEMANN (6) - (tableau 3). On voit que les valeurs obtenues sont tout à fait comparables, étant donné le degré de précision des méthodes.

Il ne nous a pas paru utile de comparer avec les milieux enrichis en plasma (INGRAM (14), KITCHELL (17), GIBBONS (15), car HORNSEY (16) comparant ces milieux aux milieux enrichis en jus de viande, a obtenu de meilleurs résultats avec le jus de viande.

Le milieu à la tryptose de BUTTIAUX (2) permet une numération identique à celle obtenue sur le milieu TVS comme l'indique le tableau 4. L'apparition des colonies est cependant plus rapide, et pour certaines souches les colonies sont mieux développées sur le milieu de BUTTIAUX que sur le milieu TVS.

II - Caractères des souches isolées des saumures

Sur le milieu TVS, nous avons pu isoler un certain nombre de souches microbiennes qui nous ont paru représentatives de la flore dominante des saumures étudiées. Ces souches appartiennent aux familles suivantes : Lactobacillaceae, Micrococcaceae, Achromobacteriaceae, Bacillaceae, Spirillaceae (selon la classification du Manuel de détermination de Bergey, 7ème édition).

Le tableau 6 indique quelques caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques qu'il nous a paru intéressant d'étudier puisque ces bactéries peuvent être nombreuses dans les saumures. En particulier, nous avons pu remarquer que toutes les souches qui réduisent le nitrate en azote ont un type respiratoire profondément modifié suivant la présence ou l'absence de nitrate dans le milieu de culture. D'autre part, certains genres sont capables de produire de l'hydrogène sulfuré à partir de la cystéine ou de l'hyposulfite de sodium.

Enfin, la plupart des souches isolées des saumures sont des halophiles stricts mais modérés, avec un optimum de croissance à une concentration en sel d'environ 6 %.

L'ensemble de ces caractères ne permet pas une identification précise des espèces, identification que nous poursuivons actuellement. Cependant, dans la suite du texte et pour la compréhension de l'exposé, nous appelons Flavobacterium les types pigmentés et Achromobacter les types non pigmentés de la famille des Achromobacteriaceae.

III - Etude des milieux sélectifs

Pour essayer de dénombrer séparément dans un même échantillon les divers groupes de bactéries présentes, nous avons comparé (tableau 7) des numérations obtenues sur le milieu TVS et sur les milieux sélectifs décrits.

Le tableau 7 appelle les remarques suivantes :

1) Le milieu à l'azide de sodium permet une numération quantitative des Lactobacillus, sauf certaines espèces halophiles strictes (souche P 8) et des Cocci anaérobies facultatifs. On peut distinguer ces deux genres d'après le virage du pourpre de bromocrésol : autour des colonies de Lactobacillus le milieu est franchement acide (couleur jaune), alors qu'il est faiblement acide (couleur gris jaune) autour des colonies de Cocci. L'azide de sodium empêche le développement de toutes les bactéries à Gram négatif, de certains Cocci aérobies et des Bacillus.

2) Le milieu à l'acétate de thallium permet le dénombrement quantitatif des Lactobacillus, des Cocci, de Vibrio costicolus, de certains Flavobacterium halophiles facultatifs (souches CB et F45), et des Bacillus. Là encore, le virage de l'indicateur permet de distinguer les colonies de Lactobacillus (milieu jaune) des colonies de Cocci et de Bacillus (milieu gris jaune) et des bactéries à Gram négatif (milieu bleu). Achromobacter et Flavobacterium halophiles stricts sont inhibés.

3) Le milieu au bleu de bromothymol permet le dénombrement quantitatif de Vibrio costicolus, Achromobacter, Flavobacterium, des Cocci anaérobies facultatifs. Deux caractères sont importants pour distinguer Vibrio costicolus, Cocci, Achromobacter et Flavobacterium : autour des colonies de V. costicolus et des Cocci le milieu est acide (jaune) ; autour des colonies d'Achromobacter le milieu est alcalin (bleu) ; autour des colonies de Flavobacterium le milieu est également alcalin, mais il apparaît en outre une ou deux bulles de gaz.

Les Lactobacillus, les Bacillus et certains Cocci aérobies stricts sont inhibés dans ce milieu.

4) le milieu à la safranine permet la numération quantitative de certaines bactéries à gram négatif et, parmi celles-ci, de V. costicolus, des Achromobacter et de certains Flavobacterium. On reconnaît ces différents germes d'après l'aspect des colonies : celles d'Achromobacter sont petites et transparentes ; les colonies de Vibrio costicolus et de Flavobacterium sont rouges, avec présence de gaz autour des colonies de Flavobacterium.

Les germes appartenant aux genres Lactobacillus, Bacillus, Cocci et quelques souches de Flavobacterium sont inhibés dans ce milieu.

Ces résultats sont valables dans le cas de saumures présentant la composition habituelle en sel, sucre, nitrate. Le tableau 8 montre que si la saumure contient des phosphates (saumure expérimentale), Vibrio costicolus est parfois inhibé dans certains milieux sélectifs, alors que cette inhibition ne se produit pas lorsque l'on fait la numération de ce même germe en partant de saumures sans phosphates.

IV - Exemples de numération

Nous donnons (tableau 9) quatre types représentatifs de numérations, choisis parmi les nombreux examens que nous avons pu faire sur des saumures d'origine diverse.

- Saumure 1

Elle donne un exemple type d'un mélange de divers genres de bactéries, toutes présentes en nombre comparable.

En effet, le milieu à l'azide de sodium est acide (jaune) autour des colonies de Lactobacillus, développées dans le milieu TVS. Le milieu au bleu de bromothymol est alcalin (bleu), avec quelques bulles de gaz autour de certaines colonies : ce sont les Flavobacterium. Il est acide (jaune) autour d'autres colonies qui peuvent être des Vibrio ou des Cocci ; mais s'il s'agissait de Cocci, le milieu TVS serait gris jaune autour des colonies, ce qui n'est pas. De plus, sur le milieu à la safranine, on obtient un nombre de colonies voisin de celui obtenu sur le milieu au bleu de bromothymol, avec les deux types de colonies rouges, gazogènes pour les Flavobacterium et non gazogènes pour les Vibrio.

Vibrio costicolus se retrouve sur le milieu à l'acétate de thallium avec les Lactobacillus. La couleur du milieu autour des colonies permet de les distinguer.

La comparaison des résultats sur les divers milieux permet donc de connaître le nombre et la nature des germes (Lactobacillus, Vibrio costicolus, Flavobacterium) présents dans la saumure analysée.

- Saumure 2

Dans la saumure 2, la flore dominante est constituée uniquement par des Lactobacillus ; le nombre et le type des colonies sont les mêmes sur les milieux à l'azide de sodium, à l'acétate de thallium et sur le milieu TVS. Mais les milieux à la safranine et au bleu de bromothymol montrent la présence de Vibrio costicolus et de Flavobacterium en nombre dix fois moins élevé que les Lactobacillus.

- Saumure 3

Dans le milieu TVS, à la dilution 10^{-6} , on observe la présence de colonies autour desquelles le milieu est gris-jaune. On retrouve des colonies sur milieu à l'acétate de thallium. Elles sont absentes sur le milieu à l'azide de sodium. Elles correspondent donc, soit aux Cocci aérobies stricts, soit aux Bacillus. Ici il est indispensable de procéder à un examen microscopique, encore que le type de colonie des Cocci soit, pour un oeil tant soit peu exercé, tout différent de celui des colonies de Bacillus (colonies souvent poly-lenticulaires pour les Cocci, toujours lenticulaires pour les Bacillus).

Cette saumure contenait également une population sous dominante de Lactobacillus, de Vibrio costicolus et de Flavobacterium comme l'indiquent les milieux à l'azide de sodium et au bleu de bromothymol. Le milieu à la safranine apporte dans ce cas une précision supplémentaire : en effet, seules les colonies rouges s'y sont développées, sans former de gaz : le Flavobacterium décelé sur le milieu au bleu de bromothymol appartient donc au type inhibé par la safranine.

- Saumure 4

L'interprétation des résultats est aisée, puisque les colonies dominantes se comportent comme celles de Vibrio costicolus. Le milieu à l'azide montre cependant la présence de 3×10^5 Lactobacillus par cm³ de saumure.

V - Relation entre la numération des différents germes décrits et la valeur technologique de la saumure

Nous pouvons voir (tableau 6) que l'on peut classer les germes décrits en trois grandes catégories du point de vue biochimique :

- germes qui acidifient sans nitrifier
- germes qui acidifient et nitrifient
- germes qui alcalinisent et dénitrifient.

1) Saumures riches en germes qui acidifient sans nitrifier :

Ce sont des saumures dont la flore dominante est représentée par des Lactobacillus : le type est la saumure 2 du tableau 9. Cette saumure ne contient pas de nitrites et les jambons sont verts après cuisson. Nous avons également pu constater que des jambons provenant de saumures du type de la saumure 1, c'est-à-dire renfermant une forte proportion de Lactobacillus, présentaient des taches vertes après cuisson.

2) Saumures riches en germes qui nitrifient et acidifient :

Ce sont les saumures dont la flore dominante est représentée, soit par Vibrio costicolus, soit par des Cocci.

a) Vibrio costicolus : lorsqu'il constitue la flore dominante, ce germe très réducteur donne des saumures à taux de nitrite normal (500 à 1000 mg/l) exprimé en nitrite de potassium, et la viande contient alors une forte proportion de nitrites (environ 400 mg de $\text{NO}_3\text{K/kg}$) ;

b) les Cocci : ces germes sont de mauvais nitrifiants à la température de saumurage (5-6°C) et nous avons pu observer des jambons à taches vertes dans des saumures dont la flore dominante était représentée uniquement par des Cocci.

3) Saumures riches en germes dénitrifiants :

Les saumures dont la flore est uniquement constituée par les germes dénitrifiants et alcalinisants renferment peu de nitrites. De plus, le pH s'élève (jusqu'à des valeurs parfois supérieures à pH 7). La saumure présente alors une odeur particulière ("Off-Odor" des auteurs américains) et la viande n'a pas un goût agréable.

DISCUSSION -

Les résultats obtenus dans cette étude montrent, dans les saumures de jambon de Paris, la présence d'un nombre élevé de microorganismes : 10^7 à 10^9 germes par cm^3 , et indiquent une certaine variété dans la nature des germes constituant la flore dominante.

1 - Parmi les divers types de bactéries rencontrées, les Bacillus n'ont pas été, à notre connaissance, signalés par les autres auteurs qui ont étudié les saumures. Seuls EDDY & INGRAM (18) ont décrit un Bacillus halotolérant, isolé de bacon en boîte, qui diffère du Bacillus présent dans les saumures que nous avons étudiées par de nombreux caractères. Il est d'ailleurs rare de trouver ce dernier dans les saumures étudiées en nombre tel qu'on puisse le reconnaître facilement dans la méthode que nous avons proposée.

Quant aux autres bactéries, DEIBEL & NIVEN (19), LEISTNER (28) ont noté la présence de Lactobacillus dans les saumures nitritées ; BUTTIAUX (2), après HENRY & al. (1), a montré l'importance de Vibrio costicolus ; BUTTIAUX (2), LISTON & SHEWAN (21) ont indiqué et discuté la présence de Pseudomonas et d'Achromobacter.

LINDBERG (22) a décrit un Achromobacter sp. dont les colonies sur milieu gélosé présentent une coloration rouge. Les souches pigmentées en rouge et appartenant à la famille des Achromobacteriaceae que nous avons isolées présentent des caractères

d'identification très proches de ceux décrits par LINDEBERG, sauf en ce qui concerne les températures de croissance. Comme le suggère LINDEBERG, nous pensons qu'il peut s'agir du genre Flavobacterium.

2 - La méthode que nous avons proposée pour mettre en évidence l'équilibre existant entre les différentes bactéries des saumures a, certes, des limites.

- En premier lieu, il n'est pas exclu que sur nos milieux sélectifs se développent des germes différents de ceux que nous avons décrits. Une large utilisation de la méthode peut donc seule en confirmer ou en infirmer la valeur.

- En second lieu, la méthode nécessite une interprétation soigneuse des résultats : en effet, nous l'avons vu, un même germe peut se développer sur un, deux ou trois milieux. A cet égard, Vibrio costicolus et les Flavobacterium qui se développent sur les milieux à la safranine et à l'acétate de thallium rendent impossible la recherche du Bacillus, des Cocci et des Lactobacillus inhibés par l'azide de sodium, lorsque les germes appartenant à ces trois derniers genres sont 100 fois moins nombreux que les premiers cités. En effet, on ne peut espérer déceler une colonie différente des autres dans une boîte de Pétri sur laquelle se sont développées plus de 100 colonies. Et même si l'on peut y déceler quelques rares colonies différentes des autres, la précision de la numération est fortement diminuée.

Nous avons essayé, sans résultat, divers artifices pour inhiber Vibrio costicolus sans inhiber les Cocci et les Bacillus : addition de teepol au milieu TVS, chauffage des dilutions de la saumure, inhibition par le crystal violet ou le tellurite de potassium.

De même, nous l'avons signalé aussi, la distinction entre Bacillus et Cocci sur milieu à l'acétate de thallium, repose sur le simple aspect des colonies et doit être en pratique contrôlée par un examen microscopique. Ceci alourdit singulièrement la méthode.

Une autre limite de la méthode est implicitement notée dans le tableau 7 : nous avons considéré le milieu comme suffisamment sélectif si le taux de survie (*) dans ce milieu est inférieur ou égal à 1/10.000. Il importe de souligner cette différence, qui est grande, entre une méthode qui permet la recherche d'une Salmonella (par exemple) dans un milieu où pullulent d'autres bactéries, et notre méthode dont le but est de mettre en évidence un équilibre entre divers genres de bactéries susceptibles de se développer dans une saumure.

En effet, il nous paraît primordial, sous l'angle technologique, de connaître les nombres respectifs de ces divers genres, puisque chaque type de bactérie implique la présence d'un ensemble différent d'enzymes. Or, dans les réactions enzyme-substrat que nous avons à considérer ici, la quantité d'enzymes est probablement le facteur le plus

....

(*) Nous définirons le "taux de survie" comme le rapport du nombre de germes capables de se développer dans un milieu sélectif au nombre de germes estimé sur un milieu non sélectif.

important à observer. Ceci est particulièrement net pour la réaction qui aboutit à la formation du nitrite : dans une saumure qui contient moins de 10^6 germes nitrifiants par cm^3 (et pas de germes dénitrifiants), la formation de nitrite est pratiquement nulle (cas de la saumure "vierge" par exemple). Elle commence lorsqu'on atteint et dépasse le million de germes nitrifiants par cm^3 de saumure. On peut penser que ce facteur nombre agit de même manière dans les processus microbiologiques qui aboutissent à la formation de l'arôme du jambon.

Ainsi il nous paraît peu important, toujours sous l'angle technologique, de rechercher la présence d'un germe (mis à part, bien entendu, le cas des germes pathogènes) lorsque ce germe n'est représenté que par un petit nombre de cellules vivantes, moins de 10^5 par cm^3 par exemple, et que ces cellules se trouvent dans des conditions de milieu qui ne permettent pas leur développement.

En ce qui concerne les milieux sélectifs proposés, nous insisterons sur le fait que le milieu TVS doit être utilisé comme milieu de base (sans saccharose dans le cas du milieu à la safranine). Ainsi, lorsqu'on utilise comme milieu de base le milieu à la tryptose de BUTTIAUX (2), qui permet une croissance plus rapide de la flore dominante, le taux de survie de Vibrio costiculus en présence de l'azide de sodium est trop élevé. D'autre part, l'absence de nitrate de potassium dans le milieu de base ne permet plus de distinguer les colonies de Vibrio costiculus des colonies de Flavobacterium parce que, dans ce cas, les Flavobacterium ne donnent pas de gaz et n'alcalinisent pas le milieu.

L'azide de sodium, en tant qu'agent sélectif, est utilisé dans un grand nombre de milieux : pour dénombrer certains streptocoques (MALLMAN (23)) et certains anaérobies stricts, sporulés ou non sporulés (MOSSEL (24), BEERENS (25)). De même, l'acétate de thallium a été préconisé par SHARPE (26) dans les milieux pour lactobacilles.

Le bleu de bromothymol, s'il a été utilisé dans un certain nombre de milieux comme indicateur de pH, ne semble pas avoir été signalé comme agent sélectif.

De même la safranine, qu'on utilise couramment comme indicateur d'oxydo-réduction, n'est pas employée classiquement, comme agent sélectif.

Nous avons montré, dans le présent travail, l'intérêt de ces deux dernières substances pour inhiber certains germes des saumures.

Les exemples de numération que nous avons présentés montrent qu'il existe probablement toujours un équilibre entre différents genres, mais que certains germes, notamment les germes acidifiants non nitrifiants, se rencontrent souvent en flore dominante dans des saumures qui ne donnent pas satisfaction aux charcutiers. D'autre part, une saumure qui donne de bons résultats contient la plupart du temps, en flore dominante, non pas un seul germe, mais un mélange de germes. Ceci conduit à penser qu'un seul germe ne peut prétendre répondre à toutes les exigences biochimiques nécessaires à la production d'un jambon possédant les qualités organoleptiques les meilleures.

Aussi envisageons-nous actuellement l'utilisation de "pieds de cuve" mixtes pour substituer, dans la saumure, un équilibre microbien connu à un équilibre microbien hasardeux. Nous étudions aussi les moyens qui permettent de conserver au cours du saumurage l'équilibre microbien choisi dans la saumure. A ce sujet, nous soulignons l'intérêt de l'observation de LINDBERG (22) concernant le rôle favorable du nitrate dans la croissance en anaérobiose de certains germes. L'un des rôles bénéfiques du nitrate dans la saumure pourrait être de permettre la croissance de ces germes dans la masse de la saumure qui n'est jamais agitée, donc jamais aérée dans la pratique courante.

RESUME -

Une méthode est proposée pour déterminer l'équilibre entre différents germes microbiens, Vibrio, Achromobacter, Flavobacterium, Lactobacillus, Bacillus, Cocci rencontrés au cours de l'examen bactériologique de plusieurs saumures.

Cette méthode fait appel à la technique de dilution décimale et à l'ensemencement en milieux gélosés sélectifs et non sélectifs. Les agents sélectifs proposés sont l'azide de sodium, l'acétate de thallium, la safranine et le bleu de bromothymol. Le milieu non sélectif utilisé est un milieu riche en extrait de viande. Les conditions d'utilisation de ces milieux et l'interprétation des résultats sont exposées en détail. Les limites de la méthode et les renseignements qu'elle permet d'obtenir sont discutés.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES -

- (1) HENRY M. GORET P. JOUBERT L. - Description et caractères biologiques d'une espèce bactérienne non encore décrite, isolée des saumures en "fermentation active". Son rôle dans l'évolution des saumures. C.R.Soc.Biol. 148, 900. 1954
- (2) BUTTIAUX R. - Technique simple d'examen bactériologique des saumures de jambon et ses résultats. 2nd Intern.Symposium on Food Microbiology, Cambridge, 137. 1957
- (3) SMITH F.B. - An investigation of a taint in rib bones of Bacon. The determination of halophilic Vibrio (Nov.sp). Proc.Roy.Soc.Queensland, 49, 29. 1938
- (4) JENSEN L.B. - Microbiology of meats. 3rd Ed.Garrard Press, Champaign, Ill. 1954
- (5) HORNSEY H.C. MALLOWS J.H. - Beef curing Brines. I- Bacterial and chemical changes occurring in rapidly developing, short life brines. J.Sci.Fd Agric. 12, 573. 1954
- (6) TOFTE JESPERSEN N.J. RIEMANN H. - The numbers of salt- tolerant bacteria in curing brine and on bacon. 2nd Intern.Symposium on Food Microbiol. Cambridge, 177. 1957
- (7) INGRAM M. KITCHELL A.G. INGRAM G.C. - Sensitive halophilic bacteria of bacon curing brines. 2nd Intern.Symp.Food Microbiol. Cambridge, 205. 1957
- (8) SULZBACKER W.L. - Associated bacteriological and chemical changes in meat-curing brines. 2nd Intern.Symp.Food Microbiol. Cambridge, 315. 1957
- (9) GRANVILLE A. FIEVEZ L. - Survie des Bacillus dans les saumures de viande. 2nd Intern.Symp.Fd Microb. Cambridge, 225. 1957
- (10) PENSO G. ORTALI V. GORI G.B. - Contribution to the morphological and biochemical study of halophilic bacteria. 2nd Intern.Symp.Fd Microb. Cambridge, 21. 1957
- (11) FEARON W.R. cité par DICKMAN S.R. & WESTCOTT W.L. - Reactions of xanthidrol. I- Amino-acids. J.Biol.Chem. 210, 481. 1954
- (12) BUTTIAUX R. - Communication personnelle
- (13) RIVIERE J. - Contribution à l'étude de la transformation des nitrates en nitrites dans les salaisons. Ann.Inst.Nat.Agron. 35, 8. 1948
- (14) INGRAM M. - The general microbiology of bacon-curing brines with special references to methods of examination. 2nd Intern.Symp.Food Microb. Cambridge, 121. 1957
- (15) GIBBONS N.E. - The effect of salt on the metabolism of halophilic bacteria. 2nd Intern.Symp.Fd Microb. Cambridge, 69. 1957
- (16) HORNSEY H.C. - Sensitive halotolerant bacteria of Beef-curing brines. 2nd Intern.Symp.Food Microb. Cambridge, 197. 1957
- (17) KITCHELL A.G. - The micrococci of pork and bacon and of bacon brines. 2nd Intern.Symp.Fd Microb. Cambridge, 191. 1957

- (18) EDDY B.P. INGRAM M. - A salt-tolerant denitrifying Bacillus strain which "blows" canned bacon. J.Appl.Bact. 19, 62. 1956
- (19) DEIBEL R.H. NIVEN C.F. - Studies on the microflora of commercial ham-curing brines and their significance in curing. 2nd Intern.Symp.Fd Microb.Cambridge, 149. 1957
- (20) LEISTNER L. - Bakterielle Vorgänge bei der Pökellung von Fleisch. I- Der Keimgehalt von Pökellaken. Fleischwirtschaft, 10, 74. 1958
- (21) LISTON J. SHEWAN J.M. - Bacteria brought into brines on fish. 2nd Intern.Symp. Food Microb. Cambridge, 35. 1957
- (22) LINDEBERG G. - Levan producing halophilic bacteria in sugar containing herring brines. 2nd Intern.Symp.Food Microb. Cambridge, 157. 1957
- (23) MALLMAN W.L. - in Sew.Works J. 12, 875. 1940
- (24) MOSSEL D.A.A. BRUIN A.S. De, DIEPEN H.M.J. Van VENDRIG G.M.A. ZOUTEWILLE G. - The enumeration of anaerobic bacteria, and of Clostridium species in particular, in foods. J.Appl.Bact. 19, 142. 1956
- (25) BEERENS H. - Milieux sélectifs pour l'isolement de quelques espèces de bactéries anaérobies à Gram négatif. Ann.Inst.Pasteur Lille, 9, 86. 1957
- (26) SHARPE M.E. - Group D Streptococci in the faeces of healthy Infants and of Infants with neonatal diarrhoea. J.Hyg. 50, 209. 1952

Tableau 1 - Influence de la nature de l'extrait de viande utilisé pour la préparation du milieu TVS sur les numérations de certaines souches bactériennes isolées des saumures.

Désignation des souches	S.L.	2 C 30	B 3.1	B 3.7	B 3.16
Extrait de viande Lab-Lemco	9,04 ⁽¹⁾	7,38	8,30	8,20	8,23
Extrait de viande Liebig	8,50	< 4	< 4	< 4	< 4

(1) Log 10 du nombre de bactéries viables par cm³ de culture

Tableau 2 - Comparaison des méthodes de numération microscopique directe et de numération en milieu gélosé (TVS) pour différentes saumures.

Saumures examinées	1	2	3	4	5	6	7
Numération microscopique	8,50 ⁽¹⁾	8,34	8,38	8,38	8,30	7,62	7,77
Numération sur TVS	8,27	8,11	8,49	8,71	8,30	8,0	7,81

(1) Les chiffres indiquent le log 10 du nombre de bactéries dans 1 cm³ de saumure.

Tableau 3 - Comparaison du milieu TVS et du milieu au jus de viande de porc pour la numération de la flore dominante de différentes saumures

Saumures examinées	1	2	3	4	5	6
Milieu T.V.S.	7,95 ⁽¹⁾	8,32	7,83	8,27	7,56	8,23
Milieu au jus de viande de porc	8,17	8,23	7,82	8,36	7,44	8,14

(1) Les chiffres indiquent le log 10 du nombre de bactéries dans 1 cm³ de saumure.

Tableau 4 - Comparaison du milieu TVS et du milieu enrichi en tryptose pour la numération de certaines souches bactériennes isolées des saumures

Désignation des souches (1)	S.L	2C 10	2C 30	B3.16	F44	C _B	2C 60	B3 116
Milieu TVS	8,78 ⁽²⁾	8,65	8,39	8,17	8,01	8,41	8,25	7,64
Milieu enrichi en tryptose	8,73	8,72	8,88	8,14	7,92	8,53	8,23	7,47

(1) Les caractères des souches sont indiquées dans le tableau 6.

(2) Log 10 du nombre de bactéries viables par cm³ de culture (24 heures à 22°C).

Tableau 5 - Influence de la température d'incubation sur la numération de la flore dominante dans différentes saumures.

Saumures examinées	1	2	3	4
Incubation à 30°C	5,34 ⁽¹⁾	6,04	5,81	6,07
Incubation à 22°C	8,17	7,46	8,47	7,53

(1) Les chiffres indiquent le log 10 du nombre de bactéries dans 1 cm³ de saumure.

Tableau 5 - Influence de la température d'incubation sur la numération de la flore dominante dans différentes saumures.

Saumures examinées	1	2	3	4
Incubation à 30°C	5,34 ⁽¹⁾	6,04	5,81	6,07
Incubation à 22°C	8,17	7,46	8,47	7,53

(1) Les chiffres indiquent le log 10 du nombre de bactéries dans 1 cm³ de saumure.

Tableau 7 - Milieux sélectifs

Désignation: des familles	Désignation: des souches	Milieux de numération				
		Milieu T.V.S.	Milieu au bleu de bromothymol	Milieu à l'acétate de thallium	Milieu à l'azide de sodium	Milieu à la safranine
Spirilla- ceae	S.O.	8,38 ⁽¹⁾	8,60(j) ⁽²⁾	8,53	< 4	8,53
	S.L.	8,49	8,47(j)	8,61	< 4	8,56
Lactoba- cillaceae	2 C 10	8,51(j)	< 4	8,64(j)	8,49(j)	< 4
	F ₁	8,90(j)	< 4	8,92(j)	8,88(j)	< 4
	P ₈	7,72(j)	< 4	7,70(j)	< 4	< 4
Bacilla- ceae	3 A 32	7,66(i)	< 4	8,04(i)	< 4	< 4
Achromo- bacteria- ceae	2 C 60	8,49	8,46	< 4	< 4	8,47
	2 C 30	8,47(g) ⁽²⁾	8,49(g)	< 4	< 4	< 4
	B 3.1	8,17(g)	8,20(g)	< 4	< 4	< 4
	C 1	7,63(g)	7,64(g)	< 4	< 4	< 4
	B 3.16	8,01(g)	8,04(g)	< 4	< 4	< 4
	B 3.7	8,23(g)	8,23(g)	< 4	< 4	7,67(g)
	F ₄₄	8,53(g)	8,49(g)	< 4	< 4	8,49(g)
	C B	9,25(g)	9,04(g)	9,23	< 4	9,25(g)
	F ₄₅	8,43(g)	7,56(g)	8,56	< 4	7,72(g)
Micrococ- caceae	B 3.93	7,61(i)	7,56(j)	7,64(i)	7,47(i)	< 4
	B 3.116	7,64(i)	5,54(j)	7,55(i)	< 4	< 4

(1) Les chiffres indiquent le log₁₀ du nombre de bactéries viables par cm³ de culture (24 heures à 22°C)

(2) (g) gaz
(j) milieu jaune (acide) autour des colonies
(i) milieu gris jaune (peu acide) autour des colonies

Tableau 8 - Numération de *V. costiculus* provenant de 2 saumures expérimentales (1 et 2) qui contenaient des phosphates

Saumures examinées	Milieu T.V.S.	Milieu à l'acétate de thallium	Milieu à la safranine
1	6,36 ⁽¹⁾	6,23	5,67
2	5,25	4,79	3,90

(1) Les chiffres indiquent le log 10 du nombre de bactéries par cm³ de saumure.

Tableau 9 - Exemples d'analyses chimiques et bactériologiques de saumures

Saumures examinées	Concentration en sel (en g par l.)	Concentration en nitrite de potassium (en g par l.)	pH de la saumure	Milieu T.V.S.	Milieux de numération Milieu au bleu de bromothymol	Milieu à l'acétate de thallium	Milieu à l'azide de sodium	Milieu à la safranine
1	130	0,3	6,05	7,51 ⁽¹⁾ g, j, b ⁽²⁾	7,36 g, j, b	7,23 j, b	7,01 j	7,04 g
2	180	0,0	5,9	8,14 j	7,11 j, b, g	8,04 j	8,00 j	6,93 g
3	200	1,7	5,5	7,64 i, b	7,14 j, b, g	7,67 i, b	6,55 j	6,85
4	110	1,4	5,7	8,07 b	7,98 j	8,07 b	5,53 j	7,56

(1) Les chiffres indiquent le log 10 du nombre de bactéries viables dans 1 cm³ de saumure

(2)

- g gaz
- j milieu jaune (acide) autour des colonies
- b milieu bleu (alcalin) autour des colonies
- i milieu gris jaune (peu acide) autour des colonies