

7<sup>ème</sup> REUNION DES INSTITUTS DE RECHERCHES SUR LES VIANDES

du 18 au 24 Septembre 1961

V A R S O V I E

METHODE DE NUMERATION SELECTIVE DES PRINCIPAUX GROUPES MICROBIENS PRESENTS

DANS LES SAUMURES ET JAMBONS DE PARIS.

CARACTERES DISTINCTIFS DES GROUPES HALOTOLERANTS ET NON HALOPHILES

par Jeanne FOURNAUD, P. RAIBAUD et G. MOCQUOT

Station Centrale de Recherches Laitières et de Technologie des Produits Animaux

Centre National de Recherches Zootechniques - JOUY EN JOSAS

292

METHODE DE NUMERATION SELECTIVE DES PRINCIPAUX GROUPES MICROBIENS PRESENTS  
DANS LES SAUMURES ET JAMBONS DE PARIS.

CARACTERES DISTINCTIFS DES GROUPES HALOTOLERANTS ET NON HALOPHILES.

Jeanne FOURNAUD, P. RAIBAUD et G. MOCQUOT

Dans un précédent travail (1), nous avons étudié en détail les bactéries halophiles et certaines bactéries halotolérantes des saumures utilisées dans la fabrication du Jambon de Paris. Nous avons souligné l'importance de celles qui réduisent les nitrates en nitrites et, par là, sont nécessaires à la fabrication du jambon puisque, nous le rappelons, l'addition de nitrites dans les saumures est interdite en France.

Mais les bactéries halophiles ne sont pas seules présentes dans les saumures. Et, si l'on considère la flore bactérienne du jambon mis en saumure, on peut constater que d'autres bactéries sont en nombre plus important que les bactéries halophiles. Il s'agit des bactéries halotolérantes et des bactéries non halophiles, dont nous rappelons les définitions données par GIBBONS (2) :

- les bactéries non halophiles ne se développent pas dans un milieu dont la concentration en chlorure de sodium est supérieure à 10 % ; leur croissance optimum est obtenue dans un milieu contenant environ 0,08 % de chlorure de sodium.

- les bactéries halophiles ne se développent pas en l'absence de chlorure de sodium.

- les bactéries halotolérantes se développent en l'absence de chlorure de sodium et dans des milieux dont la concentration en chlorure de sodium est supérieure à 10 %.

La présence dans les saumures et jambons de divers groupes bactériens répondant à ces définitions a déjà été signalée par divers auteurs : les lactobacilles par DEIBEL et NIVEN (3) ; le groupe Pseudomonas-Achromobacter par BUTTIAUX (4) et LEISTNER (5), les bactéries d'origine fécale (Escherichia, Streptococcus faecium, Clostridium) par BUTTIAUX (4), LEISTNER (5), PATTON (6) et RIEMAN (7).

L'objet du présent travail est de déterminer d'une part quels sont les groupes de bactéries halotolérantes et de bactéries non halophiles que l'on peut rencontrer dans les saumures et jambons de Paris et, d'autre part, comment on peut y dénombrer sélectivement les principaux groupes de micro-organismes halophiles, halotolérants et enfin non halophiles.

.../...

MATERIEL ET METHODES

293

I - ORIGINE DES ECHANTILLONS

Les jambons analysés provenaient de l'abattoir du C.N.R.Z. à JOUY EN JOSAS ; ils ont été salés et cuits à la charcuterie du Centre Technique de la Charcuterie, de la Salaison et des Conserves de Viandes. Les saumures ont été prélevées soit dans cette charcuterie expérimentale, soit dans des ateliers artisanaux.

Toutes les souches mentionnées dans ce travail ont été isolées à partir de ces jambons et 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 ).

II - TECHNIQUES D'IDENTIFICATION DES GROUPES MICROBIENS

Les souches à identifier sont repiquées, après purification, trois fois à 24 heures d'intervalle sur le milieu LAPTgIO décrit par RAIBAUD et al (8), dont nous rappelons la composition :

- autolysat de levure (Difco) ..... I p. 100
  - peptone (Evans) ..... 1,5 p. 100
  - tryptone (Difco) ..... I p. 100
  - glucose ..... I p. 100
- pH : 7,4

Pour certains tests d'identification, le milieu LAPTgIO a été modifié par addition de gélose à 2 % et modification de la nature et de la concentration en glucides ; les milieux qui en dérivent sont notés ainsi : le milieu GAPTgI contient de la gélose et 0,1 % de saccharose, le milieu GAPTg20 contient de la gélose et 2 % de glucose, le milieu GAPTgIO contient de la gélose et 1 % de glucose.

Les tests d'identification sont les suivants :

A - TESTS GENERAUX : Nous les avons appliqués à toutes les souches.

1) Morphologie, caractères de mobilité et de coloration : la morphologie et la mobilité sont observées à l'état frais au microscope à contraste de phase sur une goutte de culture en milieu LAPTgIO âgée de 18 h. Les colorations sont faites par la méthode de Gram.

2) Présence de catalase : On recherche la présence de catalase en émulsionnant dans de l'eau oxygénée à 11 volumes une colonie prélevée sur un tube de milieu GAPTgI ou GAPTg20 incliné.

3) Type respiratoire : On ensemence les souches dans un tube Veillon qui contient du milieu GAPTgIO.

4) pH des cultures en fin d'incubation : le pH est mesuré à l'aide d'un pH-mètre à électrode de verre ("Photovolt"), après 8 jours d'incubation à 22° C des souches cultivées sur bouillon LAPTgIO.

.../...

5) Réduction des nitrates en nitrites : Le milieu LAPTg10 est additionné de nitrate de potassium à la concentration de 0,8 p. 100. 294  
 La présence de nitrite est recherchée après 8 jours d'incubation à 22° C par la méthode de GRIESS, la présence de nitrate par addition de poudre de Zn et recherche du nitrite éventuellement formé.

6) Production d'indole : Les souches sont cultivées sur eau peptonée (2,5 p. 100 de peptone, pH voisin de 7,0) et la recherche de l'indole s'effectue suivant la technique de FEARON (9), d'abord après incubation de 24 h. et ensuite après incubation de 15 jours à 22° C.

7) Hydrolyse de la gélatine : Elle est recherchée suivant la technique de FRAZIER (10) après 3 semaines d'incubation à 22° C.

8) Croissance à différentes températures : Une goutte de 18 heures sur bouillon LAPTg10 estensemencée dans 8 cm<sup>3</sup> de ce même bouillon et incubée 15 jours à 4° C et 8 jours à 22° C, 30° C, 37° C, 42° C et 45° C.

8) Thermorésistance : L'épreuve a été effectuée suivant la technique d'ABD-EL-MALEK et GIBSON (11). Les combinaisons suivantes ont été essayées : 10 minutes à 55° C et 30 minutes à 63° C.

10) Tolérance au chlorure de sodium : Une goutte d'une culture de 18 heures en milieu LAPTg10 estensemencée dans 8 cm<sup>3</sup> de milieu LTVS dont la concentration en chlorure de sodium est variable.

Ce milieu LTVS, décrit par FOURNAUD et al (1) a la composition suivante :

- extrait de viande (Lab-Lemco)..... 2,5 p . 100
  - tryptone (Difco)..... 0,5 p . 100
  - nitrate de potassium ..... 0,8 p . 100
  - saccharose ..... 0,8 p . 100
- pH: 7,2 - 7,0.

B - TESTS PARTICULIERS : Ont été identifiés :

- 1) Les Lactobacillus d'après DEIBEL et NIVEN (12), (3)
- 2) Les Pediococcus d'après DEIBEL et NIVEN (13)
- 3) Les Microbacterium d'après Mc LEAN et SULZBACHER (14)
- 4) Les Streptococcus d'après ABD-EL-MALEK et GIBSON (11), BARNES (15), SHARPE et SHATTOCK (16).

D'autre part, pour certaines souches, les tests suivants ont été réalisés :

- 1) Hydrolyse de l'arginine , dans le milieu synthétique de DICKINSON et MOCQUOT (17). La présence d'ammoniac est révélée par le réactif de NESSLER.
- 2) Hydrolyse de l'urée, dans le milieu de HORMACHE et MUNILLA (18).
- 3) Utilisation du citrate, dans le milieu de SIMMONS, mais non gélosé.
- 4) Fermentation des glucides, dans le milieu synthétique de SELEEN et STARK (19).

.../...

III - TECHNIQUE DE NUMERATION SELECTIVE DES GROUPES MICROBIENS SUR LES MILIEUX NON ADDITIONNES DE CHLORURE DE SODIUM

295

1) - Prélèvement et préparation des échantillons :

a) Saumure : 1 cm<sup>3</sup> de saumure est prélevé à la pipette dans le bac de saumure ou dans l'échantillon de saumure envoyé par l'artisan.

b) Viande : un cube d'environ 12 g de viande de jambon maigre est prélevé dans le muscle choisi, à l'aide de couteaux et de pinces stériles. On prend 4 à 6 g de cet échantillon et on le dilue au dixième dans du bouillon. La composition centésimale de ce bouillon est: 0,5 g d'extrait de viande, 0,5 g de peptone, 1 g de tryptone, pH : 7. Le broyage est réalisé aseptiquement, dans un homogénéiseur "Virtis" muni d'un dispositif anti-mousse.

2) Technique de dilution : la suspension de viande ainsi préparée ou l'échantillon de saumure sont dilués selon la technique des dilutions décimales. Le diluant choisi est celui que nous utilisons pour préparer la suspension de viande.

3) Milieux de base :

a) Milieu GAPT<sub>s</sub>1, utilisé pour le test de la catalase  
b) Milieu As BBT. Il a la même formule et le même mode de préparation que le milieu précédent, mais on ajoute avant la stérilisation 2,5 cm<sup>3</sup> d'une solution de bleu de bromothymol par litre de milieu. Cette solution alcaline et alcoolique contient 1,5 p. 100 de bleu de bromothymol (R. A.L.).

c) Milieu DPTS. Ce milieu a la composition centésimale suivante :

- Désoxycholate de sodium (Difco).....	0,1	p.	100
- Peptone (Evans).....	1,5	p.	100
- Tryptone (Difco).....	1	p.	100
- Safranine (R.A.L.).....	0,002	p.	100
- Gélose .....	2	p.	100
pH 7,5 - 7,4:			

4) Inhibiteurs : Les inhibiteurs suivants ont été utilisés : les concentrations indiquées sont celles des solutions-mères.

a) solution aqueuse d'acétate de thallium (Prolabo) : à 7,5 p. 100, (p/v). Elle est stérilisée par un séjour de 20 minutes au bain-marie bouillant et conservée au froid.

b) Solution aqueuse de tellurite de potassium (B.D.H.) à 1 p. 100, (p/v). Elle est stérilisée par filtration sur membrane Carlson et conservée au froid.

c) Solution aqueuse de nitrure de sodium (Merck) et chlorure de triphényl-tétrazolium (Merck). On prépare la solution aqueuse suivante:

- Nitrure de sodium .....	0,45	p.	100
- Chlorure de triphényltétrazolium.	0,15	p.	100

.../...

296

Nous la désignerons dans ce qui suit par les initiales A.T. ( A = nitrure ou azide de sodium, T = chlorure de triphényltétrazolum).

- d) Solution aqueuse d'orange d'acridine (GURR) à 0,03 p. 100, (p/v.)
- c) Solution aqueuse de p. benzoquinone (Prolabo) à 0,6 p. 100, (p/v.)

Les solutions c) d) et e) sont stérilisées par un séjour de 20 minutes au bain-marie bouillant et conservées au froid et à l'abri de la lumière.

5) Technique d'ensemencement :

- Cas des milieux sans inhibiteurs : Les milieux ne contenant pas d'inhibiteurs sont ensemencés en aérobiose et en anaérobiose :

a) en Aérobiose : 1 cm<sup>3</sup> de la dilution adéquate est introduit dans une boîte de Pétri stérile. On ajoute le milieu gélosé convenable et on agite soigneusement.

b) en Anaérobiose : 1 cm<sup>3</sup> de la dilution adéquate est placé dans un tube stérile de 18 x 180 mm que nous appellerons tube intermédiaire. On ajoute dans ce tube 15 cm<sup>3</sup> de milieu gélosé; le contenu du tube intermédiaire est transvasé, sans agiter, dans un grand tube stérile de 8 x 420 mm.

- Cas des milieux contenant des solutions d'inhibiteurs : On répartit d'abord, dans les tubes intermédiaires, les volumes convenables des solutions-mères d'inhibiteurs suivant les indications données au paragraphe ci-après. On pipette ensuite dans ces tubes intermédiaires le cm<sup>3</sup> de la dilution adéquate. On laisse en contact l'inhibiteur et les bactéries contenues dans le cm<sup>3</sup> de dilution 5 minutes à température ambiante (22-24°C).

Une fois ce temps de contact écoulé, on verse les 15 cm<sup>3</sup> du milieu de base choisi dans le tube intermédiaire et on transvase le contenu de ce tube soit dans une boîte de Pétri, soit dans un tube de 8 x 420 mm.

6) Milieux sélectifs : Les milieux que nous allons décrire représentent une combinaison des milieux de base, des inhibiteurs et des techniques d'ensemencement cités. Ils ont été choisis, parmi d'autres, après de nombreux essais. Les volumes d'inhibiteurs que nous indiquons dans ce qui suit sont ceux que l'on ajoute au tube intermédiaire.

a) Milieu As A.T. : 15 cm<sup>3</sup> de milieu GAPT<sub>1</sub> + 1 cm<sup>3</sup> du mélange A.T. Incubation en aérobiose.

b) Milieu As OA : 15 cm<sup>3</sup> de milieu GAPT<sub>1</sub> + 0,2 cm<sup>3</sup> d'orange d'acridine. Incubation en aérobiose.

c) Milieu As tK : 15 cm<sup>3</sup> de milieu GAPT<sub>1</sub> + 0,5 cm<sup>3</sup> de tellurite de potassium. Incubation en aérobiose.

d) Milieu As PBQ : 15 cm<sup>3</sup> de milieu GAPT<sub>1</sub> + 0,5 cm<sup>3</sup> de p. benzoquinone. Incubation en anaérobiose.

.../...

e) Milieu As ath : 15 cm<sup>3</sup> de milieu GAPT<sub>s1</sub> + 0,2 cm<sup>3</sup> d'acétate de thallium. Incubation en anaérobiose.

f) Milieu As BBT ath : 15 cm<sup>3</sup> de milieu As BBT + 0,1 cm<sup>3</sup> d'acétate de thallium. Incubation en aérobie.

7) Température et durée d'incubation: Les boîtes et les tubes sont incubés 8 jours à 22° C.

8) Lecture des résultats : Au moment de la numération des boîtes et des tubes, il faut noter avec soin :

a) la forme des colonies :

- en surface : les colonies peuvent être petites ou grosses, à bords réguliers ou irréguliers, lisses ou rugueux.

- dans la gélose : elles peuvent être lenticulaires, poly-lenticulaires ou irrégulières.

b) la couleur des colonies : elle varie en fonction de l'inhibiteur contenu dans le milieu; ainsi, en présence de chlorure de triphényltétrazolium, les colonies sont rouges si les bactéries le réduisent, blanches si elles ne le réduisent pas.

c) Présence ou absence d'odeur dans le milieu de culture.

Tous ces caractères ne sont pas en eux-mêmes des critères absolus mais entrent en jeu dans l'interprétation des résultats obtenus sur les milieux sélectifs décrits.

#### IV - TECHNIQUES DE NUMERATION SELECTIVE DES GROUPES MICROBIENS SUR MILIEUX ADDITIONNES DE CHLORURE DE SODIUM

Les numérations sur milieux additionnés de chlorure de sodium ont été effectuées selon les techniques décrites précédemment (FOURNAUD et al (1)). Nous avons utilisé, dans ce travail, un diluant contenant 13 % de NaCl et des milieux contenant 6,5 p 100 de NaCl, sélectifs ou non, qui sont :

- TVS
- TVS BBT, qui contient 0,004 p. 100 de bleu de bromothymol
- TVS ath, qui contient 0,1 p. 100 d'acétate de thallium
- TVS A, qui contient 0,01 p. 100 de nitruure de sodium
- TVS saf, qui contient 0,002 p. 100 de safranine.

Tous ces milieux sont incubés en boîte de Pétri 8 jours à 22° C.

### RESULTATS

#### I - CARACTERES DISTINCTIFS DES SOUCHES APPARTENANT AUX DIVERS GROUPES MICROBIENS

Les souches halotolérantes ont été isolées à la fois sur les milieux GTVS et GAPT<sub>s1</sub>. Les souches non halophiles ont été isolées sur le milieu GAPT<sub>s1</sub> en aérobie et certaines sur le milieu sélectif DPTS en aérobie.

.../...

a) - les groupes suivants ont été décrits dans un précédent article (FOURNAUD et al (I) ).

- groupe I ..... Vibrio costicola : halophile
- groupe II..... Bacillus sp. : halophile
- groupe III a,b,c,d,..... Flavobacterium sp. halophile
- groupe III e,..... Flavobacterium sp. halotolérant
- groupe X..... Micrococcus sp. : halotolérant.

b) - Groupe IV. Au cours de l'analyse de la flore bactérienne de saumures défectueuses, nous avons isolé des bacilles à coloration de Gram positive et dépourvus de catalase. Leur croissance en anaérobiose, le fait qu'ils ne réduisaient pas les nitrates en nitrites permettait de les classer dans le genre Lactobacillus.

Nous avons comparé (tableaux I et 2) les caractères des souches de lactobacilles ainsi isolées avec ceux observés par DEIBEL et NIVEN (12), (3) : les caractères sont identiques, sauf en ce qui concerne la fermentation de la salicine, négative pour toutes nos souches, alors qu'elle est positive pour la majorité des souches isolées par DEIBEL et NIVEN.

c) - Groupe V. Au cours d'analyses de jambons de Paris et de saumures qui provenaient d'ateliers artisanaux, nous avons isolé 23 souches de bacilles anaérobies facultatifs à coloration de Gram positive, à catalase positive et non sporulés : 21 souches proviennent de jambons et 2 de saumures.

Les caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques indiqués dans le tableau 3 sont identiques à ceux des bacilles décrits par Mc LEAN et SULZBACHER (14) sous le nom de Microbacterium thermosphactum. Les seuls caractères qui diffèrent sont la fermentation du lactose et celle du dulcitol, négatives pour toutes nos souches.

d) - Groupes VI et VII. Certaines bactéries, fréquentes dans les saumures et les jambons que nous avons analysés, présentent les caractères d'identification résumés dans le tableau 4. Ces bactéries n'ont pu être définitivement rangées dans un genre déterminé:

Nous distinguons deux groupes qui diffèrent par leur tolérance au chlorure de sodium, la production d'ammoniaque dans un milieu peptoné, et l'hydrolyse de l'urée.

e) - Groupe VIII a, b. : d'un petit nombre d'échantillons, nous avons pu isoler des streptocoques en nombre important: 10 par cm<sup>3</sup> de saumures. 6 souches ont été étudiées (tableau 5). Les souches du type a, isolées de saumures, appartiennent à l'espèce Streptococcus faecium. Les souches du type b, isolées de jambons, ne peuvent être classées d'après les caractères que nous avons étudiés.

f) - Groupes IX : D'une saumure défectueuse, nous avons obtenu des coques isolés ou en amas plans, à coloration de Gram positive. La catalase est présente sur des milieux à 0,1 p. 100 de saccharose, négative sur les milieux à 2 p. 100 de glucose. Ils sont anaérobies facultatifs, ne réduisent pas les nitrates en nitrites. Il s'agit donc du genre Pediococcus. Nous les avons comparés aux Tetracocci décrits par DEIBEL et NIVEN (13) . Le tableau 6 montre qu'ils sont identiques. Les fermentations de glucides, qui

ne sont pas rapportées sur ce tableau, sont également identiques.

g) Groupes XI et XII : Ces deux groupes sont étudiés par DICKINSON qui les classe provisoirement dans le groupe Hafnia pour le groupe XI et dans le genre Achromobacter pour le groupe XII.

h) - Groupe XIII : Nous avons pu dénombrer dans certaines saumures, par  $\text{cm}^3$ ,  $10^5$  à  $10^6$  microorganismes qui à l'examen microscopique présentaient la forme caractéristique de levure. Le tableau 7 indique les concentrations minima et maxima en chlorure de sodium tolérées par les différents groupes. Si l'on se réfère à la définition de GIBBONS (2), on voit que les bactéries appartenant aux groupes I, II, III a, b, c, d, sont des bactéries halophiles. Celles qui appartiennent aux groupes IIIe, IV a, VI, VII, IX, X, XIII sont des microorganismes halotolérants et celles qui appartiennent aux groupes IV b, V, VIII, XI, XII sont des bactéries non halophiles.

## II - NUMERATIONS COMPAREES DES SOUCHES APPARTENANT AUX DIVERS GROUPES MICROBIENS.

Afin de dénombrer les divers groupes microbiens des saumures et des jambons nous avons établi une gamme de milieux sélectifs. Le degré d'inhibition exercé par ces milieux vis à vis des différents groupes, germes et espèces décrits est obtenu à l'aide de souches pures des microorganismes à étudier, ensemencées en milieu de base (non sélectif) d'une part, en milieu sélectif d'autre part. On détermine, pour chaque souche pure, le rapport entre la numération en milieu sélectif et la numération en milieu non sélectif.

a) - Milieux contenant 6,5 p. 100 de chlorure de sodium : Le tableau 8 montre les résultats obtenus avec divers milieux sélectifs salés ensemencés avec les bactéries non halophiles et halotolérantes appartenant aux divers groupes décrits. Les résultats précédemment obtenus avec les souches halophiles (FOURNAUD et al. (I) ) y sont inclus.

Ces milieux sélectifs contiennent des indicateurs de pH (pourpre de bromocrésol ou bleu de bromothymol). Il est important de noter leurs changements de teinte qui diffèrent suivant le groupe microbien considéré :

- dans les milieux TVS et TVS Ath : les bactéries des groupes IV a et IX font virer le pourpre de bromocrésol au jaune franc. Les bactéries des groupes II et X au gris jaune.

- dans le milieu TVS BBT, les bactéries du groupe III font virer le bleu de bromothymol au bleu, les microorganismes des groupes I, X et certaines souches du groupe XIII le font virer au jaune.

- dans le milieu TVS A, les bactéries des groupes IV a et IX font virer le pourpre de bromocrésol au jaune. De plus, les bactéries du groupe III donnent du gaz dans tous les milieux où elles se développent, excepté le groupe III e qui n'en donne pas sur le milieu TVS Ath.

b) - Milieu contenant moins de 0,5 p. 100 de chlorure de sodium : le tableau 9 montre les résultats obtenus sur les divers milieux de numération non salés, ensemencés avec les bactéries appartenant aux 13 groupes décrits. Il est complété par les remarques suivantes :

- le milieu GAPT<sub>s1</sub>, qui ne contient pas d'inhibiteurs, permet la croissance de toutes les souches étudiées en aérobiose et des souches de bactéries anaérobies facultatives en anaérobiose. Ces bactéries ne donnent pas toutes les mêmes types de colonies :

.../...

1 - En aérobiose, les bactéries du groupe V forment en surface des colonies plates, transparentes, arborescentes et, dans la zone de microaérophilie, des colonies ouatées. Les bactéries des groupes VI et VII forment en surface de grosses colonies bombées, irrégulières, luisantes, opaques, de couleur brun-jaune. L'odeur qui s'en dégage est désagréable; dans le cas du groupe VI, on perçoit une odeur d'ammoniac. Les colonies du groupe XII sont à peu près semblables à celles des bactéries du groupe VI. Pour certaines, la couleur est légèrement différente, plutôt jaune que brun-jaune. Au bout de 8 jours à 22° C, l'odeur est désagréable.

2 - En anaérobiose et dans la zone de microaérophilie, les bactéries du groupe VIII a et certaines souches du groupe X peuvent, à l'isolement, donner des colonies polyenticulaires.

- le milieu As BBT Ath, permet la numération des seuls microorganismes dont la coloration de Gram est positive, sauf celle des bactéries des groupes VI et VII et certaines du groupe X. Le virage éventuel du bleu de bromothymol n'apporte pas d'indications utilisables pour la distinction des groupes.

- le milieu As A.T. permet la numération sélective des bactéries appartenant aux groupes IV, VIII a, IX et de certaines appartenant au groupe X. On doit noter que les bactéries du groupe IV b ne réduisent pas le chlorure de triphényltétrazolium et forment donc des colonies blanches alors que celles des groupes IV a, VIII a, IX et X le réduisent et donnent alors des colonies rouges. On peut ainsi dénombrer quelques colonies blanches parmi de nombreuses colonies rouges ou, inversement, quelques colonies rouges parmi de nombreuses colonies blanches.

- le milieu As Oa est peu inhibiteur. Cependant, les souches du groupe IV y sont inhibées ainsi que celles du groupe VIII b. Les différents types de colonies décrits pour les bactéries des groupes V, VI, VII et XII sur le milieu GAPT<sub>1</sub> sont semblables dans ce milieu.

- le milieu As tK permet la numération sélective des groupes VI et VII. Leurs colonies y ont le même aspect que sur le milieu GAPT<sub>1</sub>, mais elles sont noires, car, ces bactéries réduisent le tellurite de potassium. Sur ce milieu peuvent aussi se développer les microorganismes des groupes VIIIa, IX, XIII. Les souches du groupe VIII a peuvent donner des colonies noires ou grises.

- le milieu DPTS permet la numération sélective des microorganismes des groupes XI, XII, XIII en aérobiose et du groupe XI seulement en anaérobiose.

1 - en aérobiose, on peut différencier les bactéries des groupes XI, XII et XIII par l'aspect de leurs colonies en surface: les colonies des bactéries du groupe XII sont semblables aux colonies observées sur le milieu GAPT<sub>1</sub>, mais elles sont rouges. Les colonies des microorganismes du groupe XIII sont roses et très bombées.

.../...

2 - en anaérobiose , les colonies des bactéries du groupe XI sont jaunes car elles réduisent la safranine. De plus elles sont gazogènes.

- le milieu As PBQ en anaérobiose permet la numération sélective de certaines bactéries du groupe IV et du groupe VIII, celles du groupe IX sont partiellement inhibées.

- le milieu As Ath permet la numération sélective des bactéries du groupe VIIIa. Certaines souches du groupe IV a peuvent aussi se développer quantitativement dans ce milieu .

Dans le tableau 9 ne figurent pas les bactéries du genre Clostridium qui peuvent être présentes dans les saumures. L'expérience nous a montré que leurs cellules végétatives sont inhibées par la p. benzoquinone et l'acétate de thallium. Par contre, les spores peuvent donner naissance à des colonies dans les divers milieux sélectifs anaérobies décrits.

### III - EXEMPLES D'ANALYSES BACTERIOLOGIQUES DE SAUMURES ET JAMBONS SUR LES MILIEUX SELECTIFS ADDITIONNES OU NON DE CHLORURE DE SODIUM.

Les tableaux 10 et 11 montrent qu'une analyse bactériologique faite suivant les méthodes décrites permet de distinguer et de dénombrer plusieurs groupes microbiens différents : 6 dans le cas des saumures, 4 et 5 dans le cas des jambons analysés.

Pour obtenir ces résultats, il faut tenir compte de l'aspect et du nombre des colonies sur les différents milieux ensemencés, non seulement sur ceux qui sont indiqués dans les tableaux 10 et 11, mais aussi sur les autres milieux utilisés pour établir les tableaux 8 et 9.

#### I - Cas des saumures :

Saumure 1 : dans le milieu TVS BBT, les colonies sont bleues et gazogènes : il s'agit des Flavobacterium type b et c, car on ne les retrouve pas en nombre équivalent dans le milieu TVS saf. Dans le milieu TVS A, les colonies sont jaunes : elles correspondent soit aux lactobacilles halotolérants, soit aux pédiocoques. Comme la numération sur le milieu As tK, où les pédiocoques se développent quantitativement est inférieure à celle obtenue sur le milieu TVS A, on peut conclure que les colonies jaunes de TVS A sont celles des lactobacilles halotolérants. Le fait que l'on obtienne un nombre de colonies voisin dans les milieux As tK et TVS saf, l'aspect de ces colonies sur le milieu As tK et leur odeur permettent de conclure à la présence de Brevibacterium, dont la numération peut être faite sur l'un ou l'autre de ces deux milieux. Dans le milieu As A.T., les colonies blanches correspondent aux lactobacilles non halophiles que l'on peut ainsi dénombrer. Dans le milieu DPTS en aérobiose, l'aspect des colonies et leur odeur correspondent aux caractères des colonies d'Achromobacter. Enfin, dans le milieu DPTS en anaérobiose, on dénombre les seules bactéries du groupe Hafnia qui réduisent la safranine.

Saumure 2 : Dans le milieu TVS BBT, les colonies sont jau-

.../...

nes : il s'agit de Vibrio costicolus car les numérations sur TVS BBT et TVS saf sont identiques et que l'on n'observe pas de colonies gris-jaunes de micrococques, ni sur TVS, ni sur TVS ath. Comme dans le cas précédent et pour les mêmes raisons, les colonies observées sur le milieu TVS A sont celles des lactobacilles halotolérants. De même sur As A.T., les colonies blanches indiquent la présence et le nombre des lactobacilles non halophiles. Sur As tK, l'aspect et l'odeur des colonies présentes correspondent aux caractères de Brevibacterium et Corynebacterium. A priori on ne peut dire lequel de ces 2 groupes est présent. Le seul milieu sélectif susceptible de nous renseigner est le milieu TVS saf. Mais sur ce milieu, les colonies de V. costicolus masquent les éventuelles colonies de Brevibacterium. Comme pour la saumure I, on dénombre dans le milieu DPTS en aérobiose les Achromobacter (aspect des colonies, odeur) et dans le milieu DPTS en anaérobiose les bactéries du groupe Hafnia (réduction de la safranine, gaz).

2 - Cas du jambon : Pour les numérations des Achromobacter et du groupe Hafnia, les remarques faites dans le cas des saumures s'appliquent aussi au cas des jambons.

- jambon avant cuisson : dans les milieux TVS et TVS A, les colonies sont jaunes et les numérations obtenues sur les 2 milieux sont identiques, aux erreurs d'expérience près. Elles peuvent correspondre soit aux lactobacilles halotolérants, soit aux pédiococques : ici, ce sont des lactobacilles car il n'y a aucune colonie à la dilution  $10^{-2}$  sur le milieu As tK. Dans le milieu TVS BBT, les colonies sont jaunes comme dans le cas de la saumure 2, mais ici il s'agit de Micrococcus, car aucune colonie n'était présente à la dilution  $10^{-1}$  dans le milieu TVS saf. Dans les milieux GAPT<sub>s1</sub> et As A.T., il s'agit donc de lactobacilles non halophiles.

- jambon conservé 15 jours sous "Cryovac" : dans le milieu TVS, on observe des colonies gris-jaunes et, dans le milieu TVS BBT, le même nombre de colonies jaunes : ce sont celles des Micrococcus. Dans le milieu TVS A, les colonies sont jaunes : ce sont celles des lactobacilles halotolérants, car il n'y a pas de colonies à la dilution  $10^{-2}$  sur le milieu As tK. Sur le milieu GAPT<sub>s1</sub>, on observe des colonies plates arborescentes qui correspondent à celles des Microbacterium. Enfin, sur le milieu As A.T., on peut dénombrer les colonies blanches de lactobacilles non halophiles.

## DISCUSSION

Ces 4 exemples d'analyses bactériologiques sur différents milieux, sélectifs ou non, prouvent la complexité de la microflore d'échantillons pris au hasard, dans des saumures ou des jambons de fabrication courante.

Un tel résultat n'aurait pu être obtenu si nous nous étions contentés d'utiliser un ou deux milieux seulement pour dénombrer cette microflore.

Est-ce à dire que la méthode proposée suffit à dénombrer ai-

.../...

sément tous les groupes microbiens présents dans l'échantillon ? Nous ne saurions, certes, l'affirmer.

D'une part, la gamme actuelle de milieux proposés et l'interprétation, souvent laborieuse, qu'impose la croissance sur plusieurs milieux sélectifs d'un même groupe microbien ne permettent pas encore de dénombrer certains groupes en présence d'autres plus nombreux : c'est le cas, par exemple, de certaines souches de streptocoques en présence de lactobacilles non halophiles plus nombreux que les streptocoques. En effet, lactobacilles et streptocoques se développent quantitativement dans les mêmes milieux.

Il y a là une limitation de la méthode que nous nous efforçons d'éliminer.

D'autre part il est possible que d'autres groupes de microorganismes en nombre suffisant, non trouvés par nous, soient présents dans les saumures et les jambons. Le cas des bactéries anaérobies strictes, en particulier, mérite d'être discuté ; leur présence ne saurait nous échapper (puisque nous ensemençons des milieux en anaérobiose stricte) mais à condition qu'elles soient plus nombreuses que les bactéries anaérobies facultatives. Cependant, nous avons pu dénombrer, dans un échantillon de saumure, un Clostridium dans le milieu sélectif DPTS : les colonies dans ce cas étaient rouges, non gazogènes et ne pouvaient être confondues avec des colonies du groupe Hafnia.

Il faut d'ailleurs noter que ces insuffisances de la méthode proposée ne sont que provisoires. En effet, lorsque nous isolons sur un milieu non sélectif ou sélectif une souche qui n'appartient pas aux groupes déjà identifiés, nous la cultivons dans l'ensemble des milieux sélectifs dont nous disposons. Si des bactéries appartenant à des groupes différents ne peuvent être différenciées sur ces milieux, nous cherchons à mettre au point un milieu sélectif qui nous permette de les distinguer. Ainsi, par éliminations successives, nous pouvons espérer avoir une notion de plus en plus complète sur la composition de la flore microbienne des échantillons analysés.

Mais la poursuite de ce but réclame une observation minutieuse des résultats de numération, des identifications nombreuses et des essais rigoureux en culture pure.

Ici, nous devons signaler un point délicat dans la méthode que nous proposons. Une souche étudiée, en culture pure, sur divers milieux sélectifs peut sur certains de ces milieux se développer de façon différente lorsqu'elle provient de l'échantillon à analyser. Ainsi, les souches de Microbacterium, étudiées en culture pure, peuvent se développer sur les milieux TVS et TVS ath, alors qu'elles sont inhibées sur ces mêmes milieux à l'isolement des échantillons de saumures ou de jambons. Inversement, à l'isolement, les souches de lactobacilles non halophiles peuvent se développer, sous forme de colonies translucides, sur les milieux TVS et TVS ath, alors qu'elles sont inhibées lorsqu'on les étudie en culture pure. BUTTIAUX (4) signale que le milieu au desoxycholate préparé par Difco n'est pas inhibiteur vis-à-vis des Enterobacteriaceae cultivées en bouillon, alors qu'il peut l'être lorsque les Enterobacteriaceae sont en petit nombre dans les saumures. Nous avons aussi observé ce fait, qui nous a conduit à préférer, pour le dénombrement des bactéries appartenant à ce groupe, le milieu DPTS au milieu de Difco.

Pour pallier cet inconvénient, il importe de bien choisir les

inhibiteurs et la façon de les utiliser. Le choix de ces inhibiteurs ou des mélanges d'inhibiteurs est, essentiellement, question d'expérimentation. En effet, souvent leur mode d'action est inconnu ou mal connu, et dépend des conditions de leur emploi : composition du milieu de culture, technique d'ensemencement. Le pouvoir inhibiteur d'une substance ne peut souvent pas être prévu qu'après avoir été expérimenté: des colorants, tels que la safranine, le bleu de bromothymol, l'orange d'acridine, le chlorure de triphényltétrazolium ne sont inhibiteurs que dans les conditions strictes d'emploi que nous avons décrites. Par contre, le nitrure de sodium, l'acétate de thallium sont moins dépendants des conditions d'emploi.

Certains de ces inhibiteurs sont utilisés pour la classification des espèces bactériennes, le tellurite de potassium par exemple; d'autres, au contraire, ont une spécificité d'action plus large, tel le nitrure de sodium. Il n'y a pas, dans l'état actuel de nos connaissances, une relation étroite entre la nature de l'inhibiteur et le genre microbien sensible à cet inhibiteur. Ceci se comprend aisément si l'on considère la variabilité des critères biochimiques ou physiologiques qui, actuellement, servent à définir un genre microbien et plus encore une espèce microbienne. Mais, dans la mesure où l'on peut définir un genre bactérien par un nombre restreint de systèmes enzymatiques communs, et dans la mesure où l'on peut trouver des inhibiteurs spécifiques d'un seul système enzymatique dans des conditions suffisamment définies, l'idée d'utiliser une gamme de milieux sélectifs pour différencier des genres microbiens nous semble valable.

Bien entendu, une telle méthode n'est pas d'un emploi commode et ne saurait être utilisée comme méthode de routine. Il faut la considérer comme une méthode de recherches. On peut, du reste, la simplifier beaucoup. Ainsi, le dénombrement des seuls genres Lactobacillus et Achromobacter peut se faire en utilisant uniquement les milieux TVS A, As A.T., DPTS.

Mais, si nous avons essayé de mettre en évidence le plus grand nombre possible de groupes microbiens, c'est en vue de discerner, dans ce mélange bactérien complexe, les éléments utiles, nuisibles ou indifférents pour la technologie du jambon; car il nous paraît difficile d'affirmer a priori que tel groupe microbien ne joue aucun rôle en technologie. Or, dans la littérature, on trouve surtout des travaux relatifs à tel genre ou même à telle espèce de microorganismes présents dans la saumure ou la viande: LEISNER (5) signale cependant la présence dans un même échantillon de plusieurs familles ou genres bactériens, mais sans préciser la façon de les dénombrer séparément.

Ainsi, malgré ses imperfections, nous pensons que la méthode d'analyse bactériologique que nous proposons est plus appropriée que les méthodes actuellement décrites pour étudier le rôle des microorganismes dans la technologie du jambon.

#### RESUME

Une méthode est décrite, qui a pour but de dénombrer des microorganismes appartenant à des groupes différents simultanément présents, en nombre variable, dans un échantillon donné de saumure ou de jambon de Paris.

Cette méthode repose sur l'emploi de milieux de culture appropriés, sélectifs ou non. Différents groupes microbiens halotolérants et non halophiles ont été décrits. 13 groupes de microorganismes halophiles, halotolérants et non halophiles ont été étudiés en culture pure sur l'ensemble des milieux décrits. Des exemples d'analyse bactériologique de saumures et jambons de Paris ont donnés : ils font apparaître la complexité de la population microbienne que l'on peut y rencontrer. Les limites d'emploi et la valeur de la méthode proposée sont discutées.

-:-

Nous remercions vivement Miss Anne B. DICKINSON pour l'étude de certains groupes bactériens ; Messieurs HERMIER et DEVOYOD, pour l'étude de la sporulation et celle de la configuration de l'acide lactique.

Nous remercions aussi vivement Messieurs FENDRY et DUNON pour l'aide précieuse qu'ils nous ont apportée.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) FOURNAUD Jeanne, RAIBAUD P. et MOCQUOT G. - Etude bactériologique des saumures de jambons de Paris. Mise au point de milieux sélectifs. Principaux genres de bactéries rencontrées. Vème Réunion des Instituts de Recherches sur les Viandes. PARIS 1959.
- (2) GIBBONS N.E. - The effect of salt concentration on the biochemical reactions of some halophilic bacteria. *Canad. J. Microbiol.*, 3, 249-255, 1957.
- (3) DEIBEL R.H., NIVEN C.F. - Microbiology of meat curing. II - Characteristics of a Lactobacillus in ham curing brines which synthesizes a polysaccharide from sucrose. *Appl. Microbiol.*, 7, 138-141, 1959.
- (4) BUTTIAUX R. - Technique simple d'examen bactériologique des saumures de jambon et ses résultats. 2nd Intern. Symposium on Food Microbiology, Cambridge, 137-148, 1957.
- (5) LEISTNER L. - Bakterielle Vorgänge bei der Pökellung von Fleisch. I. Der Keimgehalt von Pökellaken. *Fleischwirtschaft*, 10, 74-79, 1958.
- (6) PATTON J. - Observations of coliform bacteria in bacon curing brines. 2nd Intern. Symposium on Food Microbiology, Cambridge, 271-275, 1957.
- (7) RIEMANN H. - The survival of some group D Streptococci in ham curing brines. 2nd Intern. Symposium on Food Microbiology, Cambridge, 263-269, 1957.
- (8) RAIBAUD P., CAULET M., GALPIN J.V. et MOCQUOT G. - Studies on the bacterial flora in the alimentary tract of pigs : 2. Streptococci : selective enumeration and differentiation of the dominant groups. *J. appl. Bact.* (sous presse)
- (9) FEARON W.R. cité par DICKMAN S.R. et WESTCOTT W.L. - Reactions of xanthodrol. I Amino-acids *J. Biol. chem.* 210, 481, 1954.
- (10) FRAZIER cité par SMITH - Aerobic spore forming bacteria. *Agriculture Monograph N° 16*, U.S. Department of Agriculture, 1952.
- (11) ABD-EL-MALEK Y. et GIBSON T. - Studies in the bacteriology of milk. I. The Streptococci of milk. *J. Dairy Sci.* 15, 245-248, 1947-1948.
- (12) DEIBEL R.H. et NIVEN Jr C.F. - Microbiology of meat curing. I. The Occurrence and significance of a motile microorganism of the genus Lactobacillus in ham curing brines. *Appl. Microbiol.* 6, 323-327, 1958.

- (I3) DEIBEL R.H. et NIVEN C.F. - Comparative Study of Gaffkya homari, Aerococcus viridans, tetrad forming cocci from meat curing brines, and the genus Pediococcus. J. Bact. , 79, 175-180, 1960.
- (I4) Mc LEAN R.A. et SULZBACHER W.L. - Microbacterium thermosphactum spec. nov., a non heat resistant bacterium from fresh pork sausage. J. Bact., 65, 428-433, 1953.
- (I5) PARNES E.M. - Methods for the isolation of faecal Streptococcus (Lancefield group D) from bacon factories. J. appl. Bact., 19, 193-203, 1956.
- (I6) SHARPE M.E. et SHATTOCK P.M.F. - The serological typing of group D Streptococci associated with outbreaks of neonatal diarrhoea. J. gen. Microbiol. 6, 150-165, 1958.
- (I7) DICKINSON Anne B., MOCQUOT G. - Studies on the bacterial flora in the alimentary tract of pigs : I Enterobacteriaceae and other Gram negative bacteria. J. appl. Bact. (sous presse)
- (I8) HORMAECHE, MUNILLA M. - Internat. Bull. Bact. Nomen. and Tax. 7, I -20, 1957.
- (I9) SELEEN W.A., STARK C.N. - Some characteristics of green-fluorescent pigment producing bacteria. J. Bact. 46, 491-500, 1943.

TABLEAU I

## GROUPE IV a : LACTOBACILLUS, SOUCHES HALOTOLERANTES

Leurs caractères d'identification : comparaison avec ceux obtenus par Deibel et Niven

Caractères étudiés	<u>Lactobacillus</u> sp. DEIBEL et NIVEN 17 souches	FOURNAUD et al. 34 souches
Morphologie	Bacilles souvent incurvés, parfois mobiles.	Bacilles parfois incurvés, parfois mobiles.
Coloration de Gram	+	+
Catalase	-	-
Réduction des nitrates	-	-
Lait tournesolé	Légèrement acide	Légèrement acide
Formation de CO <sub>2</sub> à partir du glucose	-	-
Hydrolyse de l'arginine	-	-
" la gélatine	-	- *
Croissance à 10° C	+	+
" 37° C	n.t. **	+
" 40° C	-	n.t.
" 42° C	n.t.	-
" en présence de :		
10 % de NaCl	+	+
20 % de NaCl	n.t.	+
Fermentation de :		
Glucose	+	+
Saccharose	+	+
Maltose	+	+
Tréhalose	+	+
Cellobiose	+	+
Mannitol	+	+
Mélézitose	-	-
Glycérol	-	-

\* 4 souches étudiées

\*\* n.t. = caractère non étudié

TABLEAU 2

## GROUPE IV b : LACTOBACILLUS, SOUCHES NON HALOPHILES

Leurs caractères d'identification : comparaison avec ceux obtenus par DEIBEL et NIVEN

Caractères étudiés	Lactobacillus sp. DEIBEL et NIVEN 23 souches	FOURNAUD et al. 19 souches
Coloration de Gram	+	+
Catalase	-	-
Réduction des nitrates	-	-
Lait tournesolé	-	-
Formation de CO <sub>2</sub> à partir du glucose	-	-
Hydrolyse de l'arginine	8+ ; 15-	17+ ; 2-
" la gélatine	-	-
" l'amidon	-	-
Croissance à 10° C	+	+
" 45° C	2+ ; 21-	-
" en présence de :		
5 % NaCl	+	17+ ; 2-
" 10 % de NaCl	12+ ; 11-	-
Fermentation de :		
glucose	+	+
saccharose	+	+
Lactose	-	-
Mannitol	-	-
Sorbose	-	-
Salicine	14+ ; 9-	-

TABLEAU 4  
GROUPES VI et VII

311

Caractères étudiés	Groupe VI	Groupe VII
Morphologie	Bacilles courts isolés ou parfois en chaîne	Bacilles coccoïdes parfois en palissades
Coloration de Gram	Variable	+
Catalase	+	+
Croissance en anaérobiose	-	-
Réduction des nitrates en nitrites	+	+
pH des cultures en fin d'incubation	8,4 à 8,5	6,7
Production d' $\text{NH}_3$ en milieu peptoné	+	-
Croissance à 4° C	+	+
" 30° C	+	+
" 37° C	-	+
" 42° C	-	-
Croissance en présence de		
12,5 % de NaCl	+	+
" 15 % "	-	+
" 17,5 % "	-	+
" 20 % "	-	-
Thermorésistance 30 min à 63° C	-	-
Liquéfaction du sérum coagulé	-	-
Croissance sur p.de terre	-	-
Lait tournesolé	alcalin	alcalin
Hydrolyse de l'arginine	-	-
" la gélatine	-	-
" l'urée	+	-
Formation d'indole	-	-
Fermentation des glucides	-	-
Oxydation des glucides	-	-
Nom de genre proposé	<u>Brevibacterium</u> sp.	<u>Corynebacterium</u> sp.

TABLEAU 5

## GROUPE VIII : STREPTOCOCCUS

Caractères d'identification des types a et b

312

Caractères étudiés	Type a 3 souches	Type b 3 souches
Morphologie	Coques en chaîne	Coques en chaîne
Coloration de Gram	+	+
Catalase	-	-
Croissance à 4° C	+	+
" 10° C	+	+
" 37° C	+	-
" 45° C	+	-
Croissance en présence de :		
6,5 % de NaCl	+	+
10 % "	+	-
12,5 % "	-	-
Hydrolyse de l'arginine	+	-
" la gélatine	-	-
Hémolyse (sang de cheval)	α	-
Réduction des nitrates	-	-
Lait tournesolé	RAC	-
Croissance en présence de tellurite à 1/2500	2 + ; 1 -	-
Réduction aérobie du TTC à pH 6,0	-	-
Précipitation avec le sérum du groupe D de Lancefield	+	-
Désignation de l'espèce	<u>Str. faecium</u>	Non classé

TABLEAU 6  
GROUPE IX : PEDIOCOCCUS

33

Leurs caractères d'identification : comparaison avec ceux obtenus par DEIBEL et NIVEN

Caractères étudiés	<u>Tetracocci</u> DEIBEL et NIVEN 9 souches	FOURNAUD et al 3 souches
Catalase sur milieu contenant :		
0,1 % de glucose	+	+
1 % de glucose	n. t.	-
Croissance en anaérobiose	+	+
Réduction des nitrates	-	-
pH des cultures en fin d'incubation	4,7 à 5,0	4,8 à 5,0
Production de CO <sub>2</sub> à partir du glucose	-	-
Croissance en présence de 10 % de NaCl	+	+
Croissance à 10° C	+	+
37° C	+	+
45° C	-	-
Hydrolyse de l'hippurate Na	7 + ; 2 -	+
l'esculine	6 + ; 3 -	-
l'arginine	2 + ; 7 -	2 - ; 1 +

\* n.t. = caractère non étudié.

TABLEAU 7

314

DEVELOPPEMENT DES SOUCHES PURES APPARTENANT AUX DIFFERENTS GROUPE MICROBIENS DES VIANDES ET SAUMURES EN PRESENCE DE CONCENTRATIONS VARIABLES DE NaCl.

		NaCl en g/ 100 cm <sup>3</sup>										
Souches		0	2,5	5	7,5	10	12,5	15	17,5	20	22,5	25
		- *	+ **	+	+	+	+	+	+	+	+	-
		-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
a		-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
b		-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
c		-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
d		-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
e		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
a		+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
b		+	+	+***	+	-	-	-	-	-	-	-
		+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
		+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
I		+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
II a		+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
b		+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
		+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
III		+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
III		+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-

\* - = développement faible ou nul  
 \*\* + = bon développement  
 \*\*\* + - = résultats variant selon les souches.

TABEAU 8

NUMERATIONS COMPAREES DE SOUCHES PURES APPARTENANT AUX DIFFERENTS GROUPEES  
MICROBIENS DES VIANDES ET SAUMURES DANS DIFFERENTS MILIEUX SELECTIFS  
CONTENANT 6,5 % de NaCl

Groupes	Milieux sélectifs			
	TVS BBT	TVS Ath	TVS A	TVS saf
I	+	+	-	+
II	-	+	-	-
III a	+	-	-	+
b	+	-	-	-
c	+	-	-	-
d	+	-	-	+
e	+	+	-	+
IV a	-	+	+	-
b	-	-	-	-
V	-	I	-	-
VI	+	-	-	+
VII	+	-	-	-
VIII a	-	+	+	-
b	-	-	-	-
IX	-	+	+	-
X	+ ou I	+	+	-
XI	-	-	-	-
XII	-	-	-	-
XIII	+	-	-	+

Explication des signes. On compare, pour une souche pure, les numérations obtenues en milieu sélectifs et les numérations obtenues en milieu non sélectif. On calcule le rapport :

$$R = \frac{\text{Numération en milieu sélectif}}{\text{Numération en milieu non sélectif}}$$

Dans le tableau, la valeur approchée de R est indiquée par des signes conventionnels de la façon suivante:

- 1,2 > R > 0,8 : signe +
- 0,8 > R > 10<sup>-3</sup> : signe I
- 10<sup>-3</sup> > R : signe -

Résultats variables selon les souches ± , + ou I

NUMÉRATIONS COMPARÉES DE SOUCHES PURES APPARTENANT AUX DIFFÉRENTS GROUPES MICROBIENS DES VIANDES ET SAUURES DANS DIFFÉRENTS MILIEUX SÉLECTIFS CONTENANT MOINS DE 0,5 % de NaCl.

Technique d'ensemencement

Groupes	Aérobiose					Anaérobiose				
	BET ath	As AT	As oA	As TK	DPTS	As	As PBQ	As Ath	DPTS	
I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
II	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
IIIa,b,c,d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
e	-	-	I	-	-	-	-	-	-	
IV a	+	+	+	-	-	+	+	I	-	
b	+	+	-	-	-	+	+	-	-	
V	+	-	+	-	-	+	-	-	-	
VI	-	-	+	+	-	-	-	-	-	
VII	-	-	+	+	-	-	-	-	-	
VIII a	+	+	+	+	-	+	+	+	-	
b	+	-	-	-	-	+	+	-	-	
IX	+	+	+	+	-	+	I	-	-	
X	+	+	+	-	-	-	-	-	-	
XI	-	-	+	-	+	+	-	-	+	
XII	-	-	+	-	+	-	-	-	-	
XIII	-	-	+	+	+	-	-	-	-	

Explication des signes. On compare, pour une souche pure, les numérations obtenues en milieux sélectifs et les numérations obtenues en milieu non sélectif. On calcule le rapport :

$$R = \frac{\text{Numération en milieu sélectif}}{\text{Numération en milieu non sélectif}}$$

Dans le tableau, la valeur approchée de R est indiquée par des signes conventionnels de la façon suivante :

1,2 > R > 0,8 : signe +  
 0,8 > R > 10<sup>-3</sup> : signe I  
 10<sup>-3</sup> > R : signe -

Résultats variables suivant les souches +, ...

TABLEAU 10

## EXEMPLES D'ANALYSE BACTERIOLOGIQUE DE SAUMURES ARTISANALES

Technique d'ensemencement	Milieu de numération	Saumure 1		Saumure 2	
Aérobiose	TVS BBP	Groupe III b, c, : 8,7 (*)	<u>Flavobacterium</u>	Groupe I : 6,7	<u>Vibrio costicolus</u>
	TVS A	Groupe IV a : 8,2	<u>Lactobacillus</u> <u>halotolérant</u>	Groupe IV a : 6,8	<u>Lactobacillus</u> <u>halotolérant</u>
	TVS saf	Groupe VI : 6,9	<u>Brevibacterium</u>	Groupe I : 6,7	<u>Vibrio costicolus</u>
	As I.T.	Groupe IV b : 3,6	<u>Lactobacillus</u> <u>non halophile</u>	Groupe IV b : 4,3	<u>Lactobacillus</u> <u>non halophile</u>
	As tK	Groupe VI : 6,9	<u>Brevibacterium</u>	Groupe V ou VI : 3,8	<u>Brevibacterium</u> ou <u>Corynebacterium</u>
	DPTS	Groupe XII : 6,1	<u>Achromobacter</u>	Groupe XII : 3,5	<u>Achromobacter</u>
Anaérobiose	DPTS	Groupe XI : 2,6	<u>Groupe Hafnia</u>	Groupe XI : 1,7	<u>Groupe Hafnia</u>

(\*)  $\text{Log}_{10}$  du nombre de bactéries viables par  $\text{cm}^3$  de saumure

TABLEAU II

EXEMPLES D'ANALYSE BACTERIOLOGIQUE DE JAMBON AVANT CUISSON ET DE JAMBON CUIT CONSERVE 15 JOURS SOUS "CRYOVAC"

Technique d'ensemencement	Milieux de numération	Jambon avant cuisson		Jambon conservé 15 jours sous "cryovac"	
Aérobiose	TV3	Groupe IV a	: 6,7 (*) <u>Lactobacillus halotolérant</u>	Groupe X	: 6,8 <u>Micrococcus</u>
	TVS BBT	Groupe X	: 4,6 <u>Micrococcus</u>	Groupe X	: 6,8 <u>Micrococcus</u>
	TVS Δ	Groupe IV a	: 6,7 (*) <u>Lactobacillus</u>	Groupe IV a	: 4,6 <u>Lactobacillus halotolérant</u>
	Δs	Groupe IVb	: 8,2 <u>Lactobacillus non halophile</u>	Groupe V	: 7,6 <u>Microbacterium</u>
	Δs A.T.	Groupe IV b	: 8,2 <u>Lactobacillus non halophile</u>	Groupe IV b	: 4,7 <u>Lactobacillus non halophile</u>
	DPTS	Groupe XII	: 3,7 <u>Achromobacter</u>	Groupe XI, XII et XIII	< I
Anaérobiose	DPTS	Groupe XI	: 2,3 <u>Groupe Hafnia</u>	Groupe XI	< I

(\*)  $\log_{10}$  du nombre de bactéries viables par g de viande.