

Malgré une réglementation rigoureuse, des altérations sur le jambon cuit prétranché sont parfois observées et peuvent être représentées par un gonflement des barquettes sous atmosphère modifiée, par la présence de mauvaises odeurs dans la masse du produit ou encore par l'apparition de mucus filamenteux.

Ces observations associées à des analyses bactériologiques sur ces produits à défauts ont souvent permis de conclure à une origine microbienne du phénomène. Une première étude intitulée « Altérations microbiennes liées aux bactéries lactiques hétérofermentaires dans le jambon cuit supérieur » (octobre 2004), financée en partie par l'Office de l'Élevage, a permis d'identifier certaines bactéries responsables de ces altérations. En effet, en plaçant les sachets de jambons cuits prétranchés dans des conditions favorables au développement bactérien (stockage régulé à +8 °C), le rôle des bactéries lactiques hétérofermentaires a été confirmé et les espèces majoritaires ont été identifiées. Ce travail a permis de conclure que les *Leuconostoc* font partie des germes impliqués dans l'altération des jambons cuits, et plus particulièrement les espèces *Leuconostoc carnosum* et *Leuconostoc mesenteroides*.

Sur six entreprises partenaires (sur un total de sept entreprises), un nombre non négligeable de souches non identifiées a été constaté. Trois des industriels impliqués dans cette étude ont souhaité aller plus loin avec pour objectif d'identifier les espèces non identifiées, de confirmer la responsabilité des deux espèces *L. carnosum* et *L. mesenteroides* identifiées et surtout d'évaluer leurs degrés de résistance aux températures de cuisson.

En effet, le processus de fabrication du jambon implique quatre étapes principales : la sélection et préparation de la viande, le saumurage, le barattage et la cuisson. Ces quatre phases sont des points critiques de la fabrication des jambons cuits supérieurs, susceptibles d'engendrer une contamination des produits par l'apport d'ingrédients ou de solutés (telle que l'eau...) ou par la manipulation des produits.

Ce projet (faisant suite aux résultats de la première étude) s'est donc attaché à la quatrième étape, étape sensiblement stérilisatrice des produits, la cuisson. En effet, d'un point de vue bactériologique, cette dernière étape a pour effet de décontaminer les produits de toute charge bactérienne. Ainsi, le projet s'est orienté vers l'étude de la thermorésistance des souches de *Leuconostoc* responsables des altérations et isolées lors du précédent programme. En effet, deux suppositions peuvent permettre de conclure quant à l'origine de la contamination :

- soit les souches de *Leuconostoc* incriminées sont thermorésistantes et la contamination a lieu avant la cuisson ;
- soit les souches sont thermosensibles et la contamination a lieu après l'étape de cuisson.

Pendant une année, grâce au financement de l'Office de l'Élevage et de trois partenaires industriels du secteur, nous avons donc pu définir les caractéristiques de résistance des *Leuconostoc* au procédé de cuisson du jambon cuit.

Qualité microbiologique du jambon cuit

Étude de la thermorésistance des souches de *Leuconostoc* majoritairement responsables des altérations observées dans le jambon cuit prétranché

L'étude de la thermorésistance des *Leuconostoc* (bactéries lactiques hétérofermentaires), avait pour objectif principal de valider l'une des deux hypothèses suivantes : soit les souches de *Leuconostoc* incriminées sont thermorésistantes et la contamination a lieu avant cuisson, soit les souches sont thermosensibles et l'origine de la contamination est post-cuisson et a lieu lors des phases de transformation, déconditionnement/reconditionnement.

RIVOLLIER M., CHRISTIEANS S.
Adiv

Pôle Hygiène & Sécurité des Aliments
ZAC Parc Industriel des Gravanches — 10, rue Jacqueline Auriol
63039 CLERMONT-FERRAND Cedex 2

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Étape 1 : Identification des bactéries précédemment isolées

L'identification des germes d'altération du jambon cuit supérieur s'est orientée vers les bactéries lactiques hétérofermentaires. Ces souches isolées des produits altérés ont été identifiées par la méthode moléculaire REP-PCR permettant de mettre en évidence une conservation des séquences REP (répétées) au sein d'une même espèce. Majoritairement, les germes responsables des défauts ont été identifiés comme appartenant aux trois espèces suivantes :

- *Leuconostoc carnosum*, dans 50% des cas,
- *Leuconostoc mesenteroides*, dans 18% des cas,
- *Leuconostoc gasicomitatum*, identifié chez un seul partenaire (0,85%).

L'identification de 44 souches qui n'ont pas pu être identifiées par cette méthode a été réalisée selon le protocole suivant :

- revivification des souches conservées sous la forme de cryobilles dans 10 mL de MRS (Gélose de Man Rogosa Sharp) pendant 24 h à 30 °C. À répéter 2 fois;
- à partir de ces bouillons de précultures, 0,1 mL ont été déposés sur les géloses sélectives des cibles bactériennes choisies.

Les cibles bactériennes choisies ont été les levures (milieu OGA), *Brochothrix thermosphacta* (milieu STAA), *Pseudomonas* (milieu CFC), *Streptococcus* (milieu Slanetz), *Aeromonas hydrophila* (milieu Ryan), *Bacillus* (milieu Mossel).

Par la suite, dès la présence de colonies caractéristiques sur les milieux sélectifs, les identifications des souches ont été réalisées par méthode biochimique (galerie API).

Étape 2 : Reproduction des défauts avec les *Leuconostoc* majoritaires

L'objectif de cette deuxième étape étant de s'assurer et de confirmer la responsabilité des souches incriminées, les trois souches isolées lors du précédent programme ont été testées :

- *Leuconostoc carnosum*,
- *Leuconostoc mesenteroides*,
- *Leuconostoc gasicomitatum*.

Au préalable de la réalisation du challenge test, les souches ont été revivifiées selon le protocole décrit ci-dessus puis les ensemencements ont été effectués. Ces trois souches ont été ensemencées individuellement à raison de 10² germes/cm² sur des tranches de jambon cuit supérieur et selon quatre répétitions (soit 12 sachets). Neuf sachets ont été conditionnés sous atmosphère modifiée et stockés en conditions accélérées de vieillissement (+8 °C); les trois sachets restant ont été placés en conditions normales de conservation (+4 °C) afin de déterminer l'influence de la température sur la vitesse d'apparition des défauts.

Étape 3 : Évaluation de la thermorésistance des *Leuconostoc*

Évaluation de la thermorésistance au laboratoire en conditions « in vitro »

Chaque souche testée a été ensemencée individuellement (entre 6 et 8 log/mL) en bouillon de culture MRS (Man Rogosa

Sharp), milieu favorable à la croissance des *Leuconostoc* et des bactéries lactiques de façon générale. Un premier dénombrement a été effectué sur la suspension mère sur milieu MRS pour évaluer et vérifier le taux d'inoculation initial. Ensuite, pour chaque souche, la suspension mère a été répartie dans plusieurs tubes Eppendorf (6 tubes correspondant aux 6 temps d'analyses visés et 1 tube témoin de montée en T°C). La thermorésistance a été testée à deux températures 60 °C ou 65 °C (températures à cœur à atteindre lors de la cuisson du jambon).

Pour les trois souches d'étude, dès que le tube témoin muni d'une sonde affiche la température à atteindre, un tube a été retiré toutes les minutes pendant 6 minutes. À chaque temps d'analyse, le contenu de chaque tube Eppendorf a été transféré dans un tube de 9 mL d'EPT (Eau Peptonnée tamponnée) pour effectuer les dilutions et les dénombrements (milieu MRS – incubation à 30 °C pendant 72 h).

Étude in situ par challenge-test sur des jambons cuits supérieurs

Challenges-tests et fabrication du jambon cuit supérieur

Pour plus de praticité, une commande de noix de jambon injectées de saumure et barattées a été effectuée auprès d'un industriel partenaire de l'étude.

Après réception à l'Adiv, les noix prévues pour chaque essai (sauf l'essai témoin) ont été ensemencées individuellement à l'aide d'une seringue avec la souche à tester à raison de 6 log/g de viande. Après moulage des jambons, mise sous vide et une phase de repos d'environ 18 h à 12 °C, le programme de cuisson basé sur les pratiques industrielles les plus courantes a été programmé. Suite à l'étape de refroidissement rapide à -1 °C pendant 48 h, les jambons ont été conservés sous vide à 4 °C pendant 30 jours.

Suivis bactériologiques

Des analyses préalables sur la matière première réceptionnée ont été réalisées pour évaluer la charge initiale en flore totale sur milieu PCA, en flore lactique sur MRS, en *Leuconostoc* sur MAYEUX et en *Aeromonas hydrophila* sur RYAN. À chaque point clé du procédé et de la conservation [avant cuisson, après cuisson, à mi DLC (J15) et en fin de DLC (J30)], un jambon de chaque essai (témoin et inoculé) a été analysé en prélevant à la fois à la surface et au cœur du produit. Les flores recherchées ont été les suivantes :

- jambon témoin : flore totale sur PCA,
- jambon inoculé avec les *L. carnosum* ou *L. mesenteroides* : flore totale sur PCA, flore lactique sur MRS et sur MAYEUX (car certaines souches de *Leuconostoc* privilégient comme milieu de culture MRS ou MAYEUX),
- jambon inoculé avec *Aeromonas hydrophila* : flore totale sur PCA et *Aeromonas* sur RYAN (milieu spécifique et sélectif à cette bactérie).

Pour les jambons témoins et inoculés analysés à DLC, en plus des analyses microbiologiques classiques décrites précédemment, un enrichissement de 4 h à 37 °C a été effectué sur l'ensemble des broyats puis les flores ont de nouveau été recherchées. Ces analyses complémentaires ont été effectuées pour évaluer une éventuelle persistance des flores endogènes ou apportées.

RÉSULTATS

Étape 1 : Identification des souches

Après revivification sur milieu de culture, les résultats des identifications par galerie API montrent principalement que :

- 27% des isolats sont des *Pseudomonas cepacia* (contaminant

de l'environnement et de la viande dans une moindre mesure),

- 25% des isolats sont des *Aeromonas hydrophila* (contaminant de l'environnement et de la viande dans une moindre mesure),
- 20% des isolats sont des *Carnobacterium divergens* (bactérie lactique largement présente dans la viande fraîche).

Étape 2 : Reproduction des défauts avec les *Leuconostoc* majoritaires

Les deux tableaux 1 et 2 résument la chronologie d'apparition des défauts qui semble être souche-dépendante. Toutes les souches entraînent le gonflement des sachets, mais par la suite, les défauts spécifiques à chaque souche apparaissent.

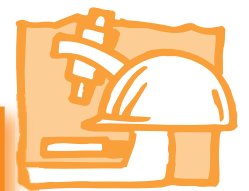


Tableau 1
CHRONOLOGIE D'APPARITION DES DÉFAUTS SUR LES JAMBONS CUITS ENSEMENCÉS APRÈS CONSERVATION EN CONDITIONS ACCÉLÉRÉES DE VIEILLISSEMENT (+8 °C)

<i>Leuconostoc carnosum</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Leuconostoc gasicomitatum</i>
J0 : ensemencement	J0 : ensemencement	J0 : ensemencement
J3 : gonflement des sachets – bel aspect des produits	J3 : gonflement des sachets – bel aspect des produits	J3 : pas de gonflement des sachets – bel aspect des produits
J4 : léger exsudat	J4 : apparition d'exsudat	J4 : léger exsudat
J5 à J10 : pas d'évolution, présence de ces défauts	J5 : apparition de reflets nacrés	J5 : apparition de tâches blanches en surface des produits
J11 : apparition de reflets nacrés en surface des produits	J6 à J10 : pas d'évolution	J6 à J10 : pas d'évolution
J12 à J18 : pas d'évolution	J11 : exsudats supérieurs à <i>L. carnosum</i> – et identiques à <i>L. gasicomitatum</i>	J11 : exsudats supérieurs à <i>L. carnosum</i>
	Reflets nacrés	Gonflement inférieur à <i>L. carnosum</i>
	Gonflement identique à <i>L. carnosum</i>	Reflets nacrés/verdâtres
J19 : apparition de tâches blanches en surface des produits	J12 à J19 : pas d'évolution	J12 à J19 : pas d'évolution

Étape 3 : Étude de la thermorésistance des *Leuconostoc*

Évaluation de la thermorésistance au laboratoire en conditions « in vitro »

Les résultats obtenus pour l'étude de la thermorésistance in vitro à 60 °C apparaissent dans le tableau 3.

Notons que les résultats obtenus à 65 °C sont similaires : dans les deux cas, les souches de *Leuconostoc* testées (*L. mesenteroides*, *L. gasicomitatum* et *L. carnosum*) ne sont résistantes ni à 60 °C, ni à 65 °C. En effet, une fois la température cible atteinte, les dénombrements obtenus sont inférieurs au seuil de détection malgré une concentration de départ comprise entre $5,5 \cdot 10^6$ et $1,9 \cdot 10^8$ bactéries/mL.

Cette non thermorésistance obtenue in vitro permet d'émettre l'hypothèse que la contamination des produits a lieu après cuisson, donc probablement lors du tranchage ou du conditionnement des jambons. Pour confirmer cette dernière hypothèse, des challenges tests (ensemencement artificiel) sur des jambons cuits supérieurs ont été réalisés avec ces souches.

Étude in situ par challenge-test sur des jambons cuits supérieurs

Le tableau 4 regroupe les résultats des suivis microbiologiques au cours du procédé.

Tableau 2
CHRONOLOGIE D'APPARITION DES DÉFAUTS SUR LES JAMBONS CUITS ENSEMENCÉS EN CONDITIONS NORMALES DE CONSERVATION (+3 °C)

<i>Leuconostoc carnosum</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Leuconostoc gasicomitatum</i>
J0 : ensemencement	J0 : ensemencement	J0 : ensemencement
J3 : gonflement des sachets – bel aspect des produits	J3 : gonflement des sachets – bel aspect des produits	J3 : pas de gonflement des sachets – bel aspect des produits
J4 : léger exsudat	J4 : apparition d'exsudat	J4 : léger exsudat
J5 à J19 : pas d'évolution	J5 à J19 : pas d'évolution	J5 à J18 : pas d'évolution
		J19 : apparition de tâches blanches

Tableau 3
RÉSULTATS DES DÉNOMBREMENTS OBTENUS SUR TROIS LEUCONOSTOC À DIFFÉRENTS TEMPS D'ANALYSES APRÈS UNE MONTÉE EN TEMPÉRATURE À 60 °C

60 °C	<i>L. mesenteroides</i> I606	<i>L. carnosum</i> H833	<i>L. gasicomitatum</i> H831
t0	$1,9 \cdot 10^8$	$4,1 \cdot 10^7$	$6,1 \cdot 10^7$
t0 à 60 °C	< 10	< 10	< 10
t1min	< 10	< 10	< 10
t2min	< 10	< 10	< 10
t3min	< 10	< 10	< 10
t4 min	< 10	< 10	< 10
t6min	< 10	< 10	< 10

En combinant l'ensemble des données, les analyses microbiologiques réalisées sur la matière première injectée de saumure et barattée ont mis en évidence une forte concentration en flore lactique ($4,60 \cdot 10^5$ germes/g) avec des *Leuconostoc* aux alentours de $1,30 \cdot 10^3$ germes/g. Il est important de mentionner que les

Leuconostoc testés dans cette étude ont été sélectionnés sur milieu MRS et ne croissent pas sur milieu de MAYEUX. De ce fait, les dénombrements sur milieu MRS englobent à la fois la flore lactique endogène et exogène (*Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc carnosum*) et les espèces *Leuconostoc* présentes sur le milieu

Tableau 4
RÉSULTATS DES DÉNOMBREMENTS POUR LES TROIS SOUCHES *LEUCONOSTOC*
À DIFFÉRENTS TEMPS D'ANALYSES

Jours	Essais	Flore totale (PCA) (ufc/g)	Flore lactique (MRS) (ufc/g)	<i>Leuconostoc</i> (Mayeux) (ufc/g)	<i>Aeromonas hydrophila</i> (Ryan) (ufc/g)
J0 (avant cuisson)	Témoin	5,00.10 ⁵	4,60.10 ⁵	1,30.10 ³	<10
	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> I606	3,30.10 ⁶	2,85.10 ⁶	1,10.10 ²	/
	<i>Leuconostoc carnosum</i> H833	5,50.10 ⁵	1,50.10 ⁶	1,60.10 ²	/
	<i>Aeromonas hydrophila</i> A720	5,50.10 ⁶	/	/	2,50.10 ⁶
J4 (après cuisson et refroidissement)	Témoin	4,50.10 ¹	<10	<10	/
	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> I606	1,50.10 ²	<10	<10	/
	<i>Leuconostoc carnosum</i> H833	1,80.10 ²	<10	<10	/
	<i>Aeromonas hydrophila</i> A720	1,00.10 ¹	/	/	<10
Mi-DLC (J15)	Témoin	2,00.10 ¹	<10	<10	/
	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> I606	<10	<10	<10	/
	<i>Leuconostoc carnosum</i> H833	<10	<10	<10	/
	<i>Aeromonas hydrophila</i> A720	1,00.10 ¹	/	/	<10
Fin DLC (J30)	Témoin	<10	<10	<10	/
	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> I606	<10	<10	<10	/
	<i>Leuconostoc carnosum</i> H833	<10	<10	<10	/
	<i>Aeromonas hydrophila</i> A720	<10	/	/	<10
Fin DLC (J30) après enrichissement 4 h — 37 °C	Témoin	<10	7,00.10 ¹	<10	/
	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> I606	<10	6,00.10 ¹	<10	/
	<i>Leuconostoc carnosum</i> H833	<10	7,00.10 ¹	<10	/
	<i>Aeromonas hydrophila</i> A720	<10	/	/	<10

MAYEUX correspondent à des souches initialement présentes dans les noix de jambon réceptionnées.

Ainsi, il a été délicat d'estimer précisément le taux de contamination artificielle en *L. carnosum* et *mesenteroides* contrairement à *Aeromonas hydrophila* où les dénombrements réalisés sur le milieu RYAN, spécifique de cette souche, ont montré un taux d'ensemencement artificiel de l'ordre de 5,50.10⁶ germes/g.

Après cuisson et refroidissement, les analyses effectuées sur les produits (témoins et essais inoculés) ont mis en évidence que sur les milieux sélectifs (MRS, MAYEUX et RYAN) quelle que soit la flore, endogène ou inoculée, les dénombrements étaient inférieurs au seuil de détection (inférieurs à 10 germes/g). En revanche, les dénombrements de la flore totale sur milieu PCA se situaient aux alentours de 100 germes/g. Les mêmes analyses réalisées à mi-DLC ont donné des résultats similaires avec une flore totale encore plus faible pour le témoin et l'essai avec

Aeromonas hydrophila et une absence pour les essais inoculés avec les deux *Leuconostoc*. Ces résultats de présence d'une flore totale résiduelle correspondent probablement à une persistance (à faible taux) d'une flore qui peut être attribuée aussi bien à la flore endogène qu'à la flore lactique ensencée. Afin de vérifier si cette flore résiduelle est une flore lactique, à DLC (J30), il a été envisagé d'effectuer des analyses avec et sans enrichissement. Cette étape d'enrichissement permet d'une part de revivifier les germes stressés à basse température et d'autre part d'augmenter leur nombre s'il y a présence.

En fin de DLC (J30), les analyses réalisées sans enrichissement préalable ont donné des résultats inférieurs au seuil de détection quelle que soit la flore recherchée (endogène ou inoculée). Après un enrichissement pendant 4 h à 37 °C, les dénombrements réalisés dans les mêmes conditions ont mis en évidence le développement d'une flore lactique sur milieu MRS à raison de 70 germes/g

pour les essais témoin et inoculés avec les trois souches. Ces résultats montrent que dans la mesure où les témoins non inoculés montrent la même concentration en flore lactique que les essais, il est donc probable que la persistance obtenue soit attribuée à la flore lactique initialement présente dans la matière première de départ.

Ces différents constats nous amènent à conclure que les souches ensencées (*Leuconostoc carnosum*, *Leuconostoc mesenteroides* et *Aeromonas hydrophila*) semblent être thermosensibles. De ce fait, ces bactéries précédemment isolées de produits à défauts devaient avoir comme origine une recontamination post-cuisson. En revanche, cette étude a permis de démontrer que certaines flores lactiques présentes dans les noix saumurées semblent persister à de faibles taux. Cette persistance dans les produits cuits est problématique car les étapes de tranchage et de reconditionnement, bien que réalisées dans des conditions d'hygiène



strictes, fragilisent le produit. En effet, l'environnement gazeux (atmosphère modifiée) est connu pour être favorable au développement des bactéries lactiques.

POUR CONCLURE

En reprenant les trois étapes majeures de ce programme, nous pouvons conclure qu'il existe, en plus des *Leuconostoc*, d'autres bactéries en cause dans l'altération du jambon cuit supérieur. Le bilan des identifications de chaque salaison (hors bactéries lactiques) a permis de mettre en évidence que chaque salaison a sa propre écologie microbienne. En effet, même si deux espèces sont majoritairement représentées (*Pseudomonas cepacia* (27%) et *Aeromonas hydrophila* (25%)), ce pourcentage est variable à la fois, selon les salaisons et selon les saisons. Ces deux espèces majoritaires sont connues pour être des contaminants de l'environnement et, dans une moindre mesure, des contaminants de la viande. Si l'eau du réseau, l'eau apportée au cours du procédé (ex : saumure), les animaux ou encore les « mains des opérateurs » sont contaminés, une contamination de la viande devient alors quasi inévitable.

Dans la seconde partie du projet, il s'agissait de s'assurer que les trois espèces *Leuconostoc carnosum*, *Leuconostoc mesenteroides* et *Leuconostoc gasicomitatum*, identifiées lors du précédent programme, étaient bien responsables des altérations répertoriées auparavant.

Après un ensemencement des tranches de jambon cuit et une conservation en conditions accélérées de vieillissement à +8 °C ou en conditions « standards » à 4 °C, les observations ont montré que ces trois souches étaient bien responsables des défauts d'altérations du jambon cuit supérieur. Selon le scénario de température défini, un décalage dans l'apparition des défauts a été visible : une température de 4 °C a retardé les altérations alors qu'une température de 8 °C (chaîne du froid mal maîtrisée) les a favorisées. Chaque espèce a provoqué un gonflement des sachets, puis, au cours de la conservation, un défaut particulier à chaque espèce a été observé : reflets nacrés ou tâches blanches en surface des produits. À noter qu'au cours du précédent programme, la chronologie d'apparition des défauts était différente ce qui est logique car, lors de challenges-tests, les trois espèces d'intérêt ont été inoculées à des taux supérieurs à leur contamination naturelle, d'où des altérations plus rapides.

Dans la dernière étape, l'évaluation de la thermorésistance des *Leuconostoc carnosum*, *Leuconostoc mesenteroides* et *Leuconostoc gasicomitatum* en conditions *in vitro* a montré qu'elles étaient thermosensibles aux températures ciblées (60 °C et 65 °C); les dénombrements étaient inférieurs au seuil de détection (soit 10 germes/g) au bout de quelques secondes de montée en température. Pour valider ce constat *in situ* (sur matrice jambon), des tests de croisances (challenges-tests) ont été réa-

lisés et ils ont montré que les souches inoculées artificiellement (*Leuconostoc carnosum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Aeromonas hydrophila*) étaient également thermosensibles. Par ailleurs, le challenge-test a mis en évidence qu'une partie de la flore lactique endogène persistait jusqu'à DLC (J30) sur des jambons entiers conservés sous vide à 4 °C. Il est important de mentionner que cette flore lactique résiduelle n'a pu être dénombrée qu'après une phase d'enrichissement et de revivification.

Ainsi, pour remonter à l'origine de la contamination, des analyses ont été menées sur site :

- sur les matières premières (jambons frais) à réception : une faible contamination initiale en flore totale et en flore lactique a été constatée;
- après la phase de saumurage : ces mêmes matières premières ont présenté des fortes concentrations en flore totale et en flore lactique.

Nous pouvons en déduire que le processus technologique de cuisson permet certes une très forte réduction des germes mais pas leur destruction totale. Par conséquent, cette flore persistante, bien que faible (inférieures au seuil de détection : 10 germes/g), se retrouve, une fois les produits tranchés et conditionnés, dans des conditions favorables à son développement.

