

La flore microbienne du smen marocain

II. Flores lipolytique et caséolytique

A. EL MARRAKCHI *, A. TANTAOUI-ELARAKI **, A. HAMAMA *
et A. GRINI *

* Institut agronomique et vétérinaire Hassan II,
Département d'Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale (H.I.D.A.O.A.),
B.P. 6202, Rabat-Instituts, Maroc

** Centre National de Coördination et de Planification de la Recherche Scientifique et Technique,
Rabat, Maroc

Résumé

Dans le présent travail, l'étude des flores lipolytique et caséolytique est entreprise aussi bien sur le smen du commerce que sur le produit au cours de son élaboration.

Du point de vue quantitatif, les nombres des lipolytiques et des caséolytiques du smen sont respectivement, de $N < 1$ à $2,4 \cdot 10^5$ et $N < 1$ à $1,4 \cdot 10^4$ bactéries par ml de la phase aqueuse du produit. Au cours de la maturation du smen, les nombres de ces microorganismes diminuent sensiblement.

Qualitativement, dans le beurre avant salage, les flores lipolytique et caséolytique sont représentées essentiellement par les bactéries à Gram négatif (*Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Vibrionaceae* et *Enterobacteriaceae*).

Au cours de l'élaboration du smen, ces bactéries sont supplantées par les espèces *Staphylococcus cohnii*, *Bacillus cereus* et *Aeromonas hydrophila*.

L'étude des activités lipolytiques de ces espèces révèle que la majorité des souches dégradent la tributyrine, les tweens 40, 60, 80 et 85, la matière grasse butyrique. La présence dominante de ces espèces ainsi que leur pouvoir enzymatique étendu leur confèrent un rôle important dans la dégradation de la matière grasse du smen.

Mots clés : Smen - Flore lipolytique - Flore caséolytique - Evolution au cours de la fabrication et du stockage.

Summary

Microbial flora of Moroccan « Smen ». II - Lipolytic and caseolytic flora

The study of lipolytic flora was conducted on marketed « smen » and on samples of « smen » taken during its processing.

The number of lipolytic and caseolytic microorganisms ranged from $N < 1$ to 2.4×10^5 and from $N < 1$ to 1.4×10^4 bacteria per ml of the product of the aqueous

phase, respectively. During smen ripening, there was a decrease in the number of these microorganisms.

The majority of Gram negative lipolytic and caseolytic bacteria recovered from butter before salting were found to belong to the groups *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Vibrionaceae* and *Enterobacteriaceae*. However, these bacteria were outnumbered during smen processing by members of *Staphylococcus cohnii*, *Bacillus cereus* and *Aeromonas hydrophila* species.

The analysis of the lipolytic properties of the strains of these species revealed that the majority of them were able to split simultaneously tributyrin, tween 40, 60, 80 and 85 and butter fat. The high prevalence of these microorganisms in this product and their wide enzymatic activities allow them to play an important role in splitting the smen fat.

Key words : Smen - Lipolytic flora - Caseolytic flora - Evolution during processing.

Introduction

L'étude chimique du smen marocain, corps gras d'origine laitière, a montré que le salage et les conditions d'entreposage (température ambiante pendant une durée d'au moins six mois) ne permettent pas une conservation en l'état du produit, mais, en revanche, entraînent une modification importante, caractérisée essentiellement par une hydrolyse de la matière grasse. Cette lipolyse, exprimée en indice d'acide, est, en moyenne, de 52,3 mg de potasse par gramme de matière grasse avec des valeurs extrêmes de 12,1 à 107,8 (EL MARRAKCHI *et al.*, 1986).

Cette transformation est recherchée et explique l'utilisation du smen pour relever le goût de certains plats traditionnels. Nous nous proposons donc, dans ce travail, de dénombrer et d'identifier la flore lipolytique du smen au cours de sa fabrication et de la comparer avec celle du smen du commerce. Parallèlement, sera réalisée l'étude des microorganismes caséolytiques dont le développement peut s'accompagner de modifications indésirables.

I. Matériel et méthodes

A. Origine des échantillons

Les échantillons de smen du commerce, au nombre de 22, proviennent de régions différentes (Meknès, Khémisset, Khouribga, Midelt, Rabat et Salé). Leur durée de conservation n'est pas connue. Parallèlement, et à titre de comparaison, un échantillon de beurre fermier d'âge inconnu et un échantillon de beurre salé importé d'Espagne et vendu sous appellation smen, ont été analysés.

L'étude du smen au cours de sa fabrication est réalisée sur deux lots de smen, codés A et B, les mêmes que ceux qui ont fait l'objet d'analyses chimiques et microbiologiques (EL MARRAKCHI *et al.*, 1986 et 1988).

Les prélèvements sont effectués à J₀ (beurre avant salage), J₇ (7^e jour après salage), J₄₀, J₇₁, et J₁₁₇.

B. Préparation de l'échantillon

La préparation de l'échantillon a été réalisée selon la technique utilisée précédemment (EL MARRAKCHI *et al.*, 1988).

C. Etude bactériologique

1. Dénombrements bactériens

Les dénombrements ont été, généralement, effectués selon les techniques décrites par SERRES *et al.*, 1973, après incubation à 30 °C pendant 3 jours. Un ml de chaque dilution est ensemencé en profondeur.

a) Flore caséolytique

Deux milieux sont utilisés, la gélose au lait et la gélose à la caséine d'Hammarsten, dont la préparation et la composition sont décrites par SERRES *et al.*, 1973. Les colonies caséolytiques apparaissent au centre de plages de lyse, plus ou moins grandes.

b) Flore lipolytique

Nous avons utilisé trois techniques différentes :

— La méthode modifiée par RATH et revue par la F.I.L. (Norme 41.1966) qui utilise la matière grasse butyrique associée au bleu Victoria (M.G.B.B.V.). Le test est considéré comme positif lorsque les colonies sont franchement bleues.

— La méthode de SIERRA (1957) au tween 80 où les microorganismes producteurs de « tweenase » apparaissent entourés d'un halo opaque dû à la formation de cristaux de sels de calcium.

— La méthode conseillée dans le British standard 1940 qui recommande l'utilisation de la gélose à la tributyrine dont la dégradation est appréciée par la présence d'une zone de lyse autour de la colonie.

2. Isolement des clones

Il est effectué à partir des boîtes de Pétri correspondant à la dilution retenue pour le dénombrement. Le nombre de colonies prélevé est égal à la racine carrée du nombre total des clones sans toutefois dépasser 10 par boîte comptable.

Les colonies bien isolées sont prises au hasard et repiquées dans un bouillon nutritif, puis dans le même milieu ayant servi au dénombrement, en vue d'assurer leur pureté. Elles sont, ensuite, repiquées sur gélose nutritive inclinée et stockées au réfrigérateur à la température de + 2 à + 4 °C. Leur entretien est assuré par repiquage toutes les quatre semaines jusqu'à leur identification.

3. Identification

a) Bactéries gram positives

L'identification des staphylocoques a été réalisée selon la classification de BAIRD-PARKER (1963), de SCHLEIFER et KLOSS, 1975a et 1975b. Pour celle des *Bacillus*, nous retenons les caractères physiologiques et biochimiques distinctifs proposés par KNIGHT et PROOM (1950), GORDON *et al.* (1973) et NORRIS *et al.* (1980).

b) Bactéries gram négatives

Leur identification fait appel à quelques tests particuliers :

— Oxydation ou fermentation du glucose en milieu de HUGH et LEIFSON (1953).

— Recherche de l'oxydase selon la technique de KOVACS (1956).

— Etude de la mobilité entre lame et lamelle et de la pigmentation sur gélose au lait, incubée à 30 °C pendant 3 jours.

— Hydrolyse de la gélatine selon la technique de FRAZIER (1926) et de l'arginine selon celle de THORNLEY (1960).

Elle a été complétée par ensemencement de galeries API 20E (API Système, France).

Pour l'identification des bactéries à Gram négatif, autres que les entérobactéries, nous avons utilisé conjointement la classification de la 8^e édition du Manuel de BERGEY (1974) et les données taxonomiques proposées par LEE *et al.* (1979) pour les *Aeromonas* et par HENRIKSEN (1973) pour les *Acinetobacter - Moraxella*.

4. Etude de l'activité lipolytique

a) Sur milieu gélosé

L'activité lipolytique est observée sur milieu à la tributyrine, sur milieu M.G.B.B.V. et sur les milieux aux tweens (40, 60, 80 et 85).

b) Par la galerie API estérase (API Système, France)

La galerie API estérase comprend 10 substrats synthétiques qui sont des esters du 2 naphthol et d'acides gras de C₄ à C₁₈. L'activité estérasique, après incubation à 37 °C pendant 4 h, est mise en évidence après addition des réactifs ZYM A et ZYM B. La lecture des résultats est effectuée selon les indications du fabricant.

II. Résultats

A. Etude du smen au cours de son élaboration

1. Dénombrements bactériens

Les résultats des dénombrements des flores lipolytique et caséolytique sont mentionnés dans la figure 1.

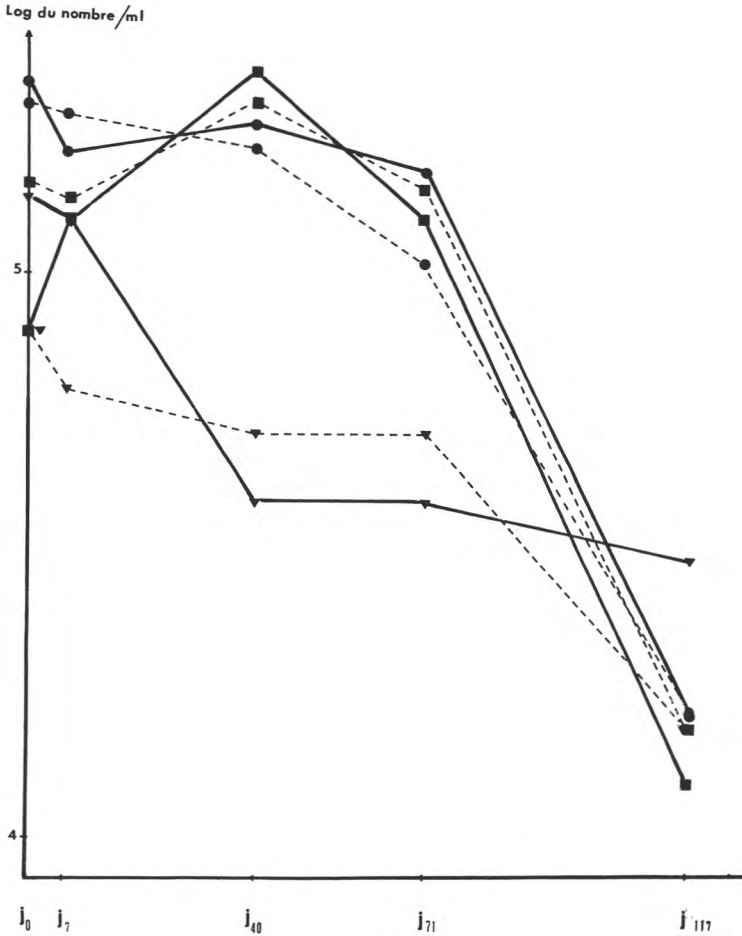


Fig. 1

Evolution quantitative des flores lipolytique et caséolytique du smen au cours de son élaboration.

Quantitative change of lipolytic and caseolytic floras of smen during its making.

- : Flore lipolytique sur tween 80. Lipolytic flora on tween 80.
- ▼ : Flore lipolytique sur tributyrine. Lipolytic flora on tributyrin.
- : Flore caséolytique. Caseolytic flora.
- : Lot A.
- - - : Lot B.

Le dénombrement de la flore lipolytique est variable selon les milieux utilisés. Avant salage (J₀), il est, sur milieu à la tributyrine, de $3,3 \cdot 10^5$ bactéries par ml de la phase aqueuse pour l'échantillon A et de $3 \cdot 10^5$ bactéries par ml pour l'échantillon B. Sur milieu tween 80, les niveaux de population sont respectivement de $1,3 \cdot 10^5$ par ml et de $9 \cdot 10^4$ par ml.

Au cours de l'entreposage jusqu'à 117 jours, le nombre des bactéries lipolytiques diminue dans les deux échantillons ; à J_{117} , leur dénombrement, sur milieu à la tributyrine, est le même pour les deux échantillons ($2,1 \cdot 10^4$ et $2,2 \cdot 10^4$). Sur tween 80, le nombre des bactéries à activité estérasique est de $5 \cdot 10^4$ bactéries par ml pour l'échantillon A et $2 \cdot 10^4$ germes par ml pour l'échantillon B.

La flore caséolytique est, à J_0 , de $9 \cdot 10^4$ bactéries par ml pour A et $1,6 \cdot 10^5$ par ml pour B. Cette flore évolue de façon irrégulière ; elle atteint son maximum à J_{40} puis diminue brutalement à J_{117} où elle n'est plus que de $1 \cdot 10^4$ bactéries caséolytiques par ml pour l'échantillon B.

2. Identification des flores bactériennes

L'identification des microorganismes lipolytiques (tabl. 1) montre qu'avant incorporation du sel (J_0), les bactéries à Gram négatif dominant et sont identifiées aux genres ou familles : *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Aeromonas* et *Enterobacteriaceae*. Les bactéries à Gram positif appartiennent aux genres *Staphylococcus*, *Micrococcus* et *Bacillus*.

A J_{71} , le nombre des bactéries gram-négatives diminue de façon significative sauf pour les *Aeromonas*, tandis qu'à l'inverse, le nombre des bactéries gram-positives augmente avec une prédominance marquée du genre *Bacillus*. Cette évolution est identique pour les deux échantillons A et B, aussi bien pour les bactéries isolées sur milieu à la tributyrine que pour celles prélevées sur milieu au tween 80.

Les résultats obtenus pour l'identification et l'évolution des bactéries caséolytiques sont rapportés dans le tableau 1.

Comme pour les bactéries lipolytiques, à J_0 , il y a prédominance des bactéries gram-négatives qui sont représentées par les mêmes groupes microbiens que la flore lipolytique. De J_0 à J_{71} , le nombre des bactéries gram-positives augmente, en particulier, celui relatif au genre *Bacillus*.

Parmi les bactéries caséolytiques, les deux entérobactéries isolées à J_0 s'identifient à l'espèce *Proteus vulgaris*.

B. Etude du smen de commerce

1. Dénombrements microbiens

Les résultats des numérations bactériennes sont présentés dans le tableau 2 où figurent également les valeurs des indices d'acide et de peroxyde.

Les niveaux de contamination en bactéries lipolytiques et caséolytiques sont relativement faibles. Les dénombrements des bactéries lipolytiques se développant sur milieu M.G.B.B.V. varient de $N < 1$ bactérie/ml à $1,8 \cdot 10^5$ bactéries par ml de la phase aqueuse et sur milieu au tween 80, les nombres plus faibles sont compris entre $N < 1$ et seulement $2 \cdot 10^2$ par ml.

Les taux en bactéries caséolytiques sont sensiblement identiques : de $N < 1$ à $2 \cdot 10^4$ bactéries par ml sur gélose au lait et de $N < 1$ à $1,4 \cdot 10^4$ bactéries par ml sur gélose à la caséine de Hammarsten.

TABLEAU 1
Etude qualitative des flores bactériennes au cours de la fabrication du smen
Qualitative study of bacterial floras during smen processing

	Bactéries lipolytiques														Bactéries caséolytiques									
	sur tributyrine								sur tween 80						sur gélose au lait									
	J ₀		J ₇		J ₄₀		J ₇₁		J ₀		J ₇		J ₄₀		J ₇₁		J ₀		J ₇		J ₄₀		J ₇₁	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
<i>Staphylococcus</i>	2 *	1	11	8	12	9	2	3	1	1	2	3	1	3	1	3	1		2	4	7	4	3	4
<i>Micrococcus</i>	2																		1	1				
<i>Bacillus</i>			1		6	4	10	11	1		2		2	2	4	4	1		1	1	7	6	6	9
<i>Flavobacterium</i>	1	1	1		1				1								1	1	1		1			
<i>Acinetobacter</i>	1								1								1	2		1				
<i>Pseudomonas</i>	2	1								1							1							
<i>Aeromonas</i>			1	1	2	1	1		1		5	2	2	1	1	1		2	1	1	1	1	1	1
<i>Enterobacteriaceae</i>	1	2							1	1							1	1						
<i>Nombre total (Nt)</i>	9	5	14	9	21	14	13	14	6		9	5	5	6	6	8	5	7	6	8	16	11	10	14

* Nombre de souches identifiées sur nombre de souches étudiées (Nt).

* Number of identified strains over total number of studied (Nt).

TABLEAU 2

Dénombrement de la flore lipolytique et de la flore caséolytique du smen.
(Nombre/ml de la phase aqueuse)

Count of lipolytic and caseolytic flora of smen. (Number/ml of aqueous phase)

	Flore lipolytique		Flore caséolytique		Indice d'acide	Indice de peroxyde
	Milieu M.G.B.B.V.	Milieu au tween 80	Gélose au lait	Gélose à la caséine Hammarsten		
B ₁	2 · 10 ²	< 1	3 · 10 ²	2 · 10 ²	33,5	1,6
B ₂	2 · 10 ²	< 1	4 · 10 ²	1 · 10 ²	34,5	2,2
B ₃	4 · 10 ²	< 1	3 · 10 ²	1 · 10 ²	46	1,7
B ₄	4 · 10 ²	9 · 10 ¹	4 · 10 ²	1 · 10 ²	44	1,8
B ₅	1 · 10 ²	10	5 · 10 ²	4 · 10 ²	48,2	2,6
B ₆	5 · 10 ²	< 1	2 · 10 ⁴	1,4 · 10 ⁴	41,2	1,9
B ₇	4 · 10 ²	7 · 10 ¹	7 · 10 ²	3 · 10 ²	38,2	6
B ₈	3 · 10 ²	< 1	2 · 10 ²	3 · 10 ²	10,4	1,8
B ₉	2,5 · 10 ³	1 · 10 ²	1 · 10 ²	3 · 10 ²	35,2	0,8
B ₁₀	2 · 10 ²	< 1	1 · 10 ²	4 · 10 ²	29,9	4,2
B ₁₁	2 · 10 ²	3 · 10 ¹	5 · 10 ²	3 · 10 ²	30,3	1,5
B ₁₂	2 · 10 ²	1 · 10 ²	4 · 10 ¹	2 · 10 ²	33,6	2,3
B ₁₃	4 · 10 ²	3 · 10 ¹	8 · 10 ²	3 · 10 ²	30	1,7
B ₁₄	1,8 · 10 ⁵	< 1	5 · 10 ²	4 · 10 ²	52,7	1,7
B ₁₅	2,4 · 10 ⁵	3 · 10 ¹	8 · 10 ²	1 · 10 ³	51,3	1,52
B ₁₆	2 · 10 ³	2 · 10 ²	3 · 10 ²	2 · 10 ²	45,1	1,6
B ₁₇	4 · 10 ²	< 1	5 · 10 ²	1 · 10 ²	52,1	2,4
B ₁₈	1 · 10 ²	< 1	3 · 10 ²	< 1	68,4	1,5
B ₁₉	6 · 10 ²	3 · 10 ¹	1 · 10 ²	< 1	84,1	1,7
B ₂₀	1 · 10 ²	1 · 10 ¹	1 · 10 ¹	< 1	82,4	2
B ₂₁	1 · 10 ²	< 1	< 1	< 1	14,5	3,6
B ₂₂	< 1	< 1	< 1	< 1	15,7	3,7
B ₂₃ ⁽¹⁾	1 · 10 ²	< 1	< 1	1 · 10 ²	10,1	1,2
B ₂₄ ⁽²⁾	1 · 10 ⁴	< 1	9,5 · 10 ³	2 · 10 ²	5	4

(1) Echantillon de smen d'importation. *Imported smen sample.*

(2) Echantillon de beurre fermier. *Local farm butter sample.*

2. Identification des flores bactériennes

a) La flore lipolytique

60 souches ont fait l'objet d'une identification dont 48 isolées à partir du milieu à la M.G.B.B.V. et 12 du milieu au tween 80.

Parmi les souches lipolytiques actives sur la matière grasse butyrique, nous identifions trois groupes microbiens : les *Bacillus* (17 souches), les staphylocoques (20) et les bâtonnets à Gram négatif (11).

Les 17 espèces qui appartiennent au genre *Bacillus* sont : *B. cereus* (9 souches), *B. firmus* (3), *B. alvei* (2), *B. coagulans* (2) et *B. brevis* (1).

Tous les staphylocoques appartiennent au sous-groupe VI de BAIRD-PARKER (1963).

Sur 11 souches retenues parmi les bactéries gram-négatives, 6 sont identifiées à l'espèce *Aeromas hydrophila*, 3 à *Acinetobacter* dont une à *A. calcoaceticus var. anitratus*, et 2 à *Moraxella*.

Parmi les isolats du milieu au tween 80, 11 appartiennent au genre *Bacillus* (9 *B. cereus* et 2 *B. brevis*) et un à l'espèce *Aeromonas hydrophila*.

b) La flore caséolytique

95 clones, dont 46 isolés des cultures sur caséinate de chaux et 49 de la gélose au lait, ont été identifiés.

Le genre *Bacillus* (88 souches) domine, il est représenté, par ordre décroissant, par les espèces *B. cereus* (37), *B. brevis* (20), *B. firmus* (19) et *B. alvei* (12).

7 clones gram-négatifs sont identifiés aux genres *Moraxella* (1), *Aeromonas* (2), *Acinetobacter* (2) ; 2 n'ont pu être identifiés.

C. Etude des bactéries lipolytiques isolées du smen au cours de son élaboration

73 clones prélevés à partir des milieux d'isolements (gélose à la tributyrine et gélose au tween 80) et à différents stades de la préparation et du stockage du smen (J₀, J₇, J₄₀ et J₇₁) font l'objet d'une identification jusqu'à l'espèce et d'une étude enzymatique.

Parmi les 52 clones à Gram positif, 8 souches de staphylocoques sont identifiées aux sous-groupes IV, V et VI de BAIRD-PARKER (1963) ou aux

TABLEAU 3
Identification des staphylocoques lipolytiques
Identification of lipolytic staphylococci

Références des souches	Espèce de SCHLEIFER et KLOOS	Sous-groupe de BAIRD-PARKER
3	<i>S. cohnii</i>	VI
4	<i>S. cohnii</i>	VI
9 b	<i>S. cohnii</i>	IV
13	<i>S. cohnii</i>	VI
16	<i>S. cohnii</i>	VI
33 c	<i>S. cohnii</i>	VI
14	<i>S. haemolyticus</i> type II	V
24 a	<i>S. haemolyticus</i> type I	IV

TABLEAU 4
 Activité lipolytique des staphylocoques
 Staphylococcal lipolytic activity

Espèces	Références des souches	Hydrolyse de la tributyrine	Hydrolyse des tweens				Hydrolyse du beurre	Hydrolyse de la lécithine	Api-estérase *			
			40	60	80	85			2 - naphthyl butyrate (C ₄)	2 - naphthyl valérate (C ₅)	2 - naphthyl-caproate (C ₆)	2 - naphthyl-caprylate (C ₈)
<i>Staphylococcus cohnii</i>	3	+	+	+	+	+	+	+	3	2	1	0
<i>Staphylococcus cohnii</i>	4	+	+	+	+	+	+	+	3	3	1	0
<i>Staphylococcus cohnii</i>	9 b	+	+	+	+	+	+	+	3	2	1	0
<i>Staphylococcus cohnii</i>	13	+	+	+	+	+	+	+	4	4	3	1
<i>Staphylococcus cohnii</i>	16	+	+	+	+	-	-	-	4	4	4	1
<i>Staphylococcus cohnii</i>	33 c	+	+	+	+	-	+	+	4	3	2	0
<i>S. haemolyticus</i> type II	14	+	+	+	-	-	+	-	3	3	2	2
<i>S. haemolyticus</i> type I	24 a	+	+	+	+	-	+	-	4	4	3	2

* Les nombres : 0,1, 2... 5 indiquent l'intensité des activités enzymatiques selon la codification Api-System.

* Numbers : 0, 1, 2... 5 indicate the intensity of enzymatic activities according to the Api-System codification.

TABLEAU 5
 Activité lipolytique des *Bacillus* et des bactéries gram - négatif
 Lipolytic activity of *Bacillus* and gram-negative bacteria

Espèces ou genres microbiens		Nombre de souches	Substrats étudiés						
			Tributyryne	Tween 40	Tween 60	Tween 80	Tween 85	Beurre	Lécithine
<i>Bacillus</i>	<i>B. cereus</i>	21	+ (21) *	+ (21)	+ (21)	d *** (16)	d (9)	d (18)	+ (21)
	<i>B. firmus</i>	5	+ (5)	+ (5)	+ (5)	d (3)	d (1)	d (3)	d (2)
	<i>B. licheniformis</i>	4	+ (4)	+ (4)	+ (4)	+ (4)	d (1)	d (2)	—
	<i>B. megaterium</i>	4	+ (4)	+ (4)	+ (4)	d (3)	d (3)	d (2)	—
	<i>B. coagulans</i>	3	+ (3)	+ (3)	+ (3)	d (1)	—	d (1)	—
	<i>B. alvei</i>	3	+ (3)	+ (3)	+ (3)	d (2)	d (2)	+ (3)	+ (3)
	<i>B. pumilus</i>	2	+ (2)	+ (2)	+ (2)	+ (2)	+ (2)	+ (2)	+ (2)
	<i>B. brevis</i>	1	+	+	+	+	—	+	+
	<i>B. subtilis</i>	1	+	+	+	+	+	+	—
Bactéries gram-négatives	<i>Aeromonas hydrophila</i>	7	+ (7)	+ (7)	+ (7)	d (5)	d (3)	d (8)	N.D **
	<i>Aeromonas sp.</i>	4	+ (4)	+ (4)	+ (4)	d (3)	d (2)	+ (4)	N.D
	<i>Pseudomonas</i>	4	+ (4)	+ (4)	+ (4)	d (3)	—	d (3)	N.D
	<i>Moraxella</i>	3	+ (3)	+ (3)	+ (3)	+ (3)	d (1)	+ (3)	N.D
	<i>Acinetobacter</i>	2	+ (2)	+ (2)	+ (2)	+ (2)	+ (2)	+ (2)	N.D
	<i>Vibrio</i>	1	+	+	+	—	—	+	N.D

* Nombre de souches positives. *Number of positive strains.*

** Non déterminé. *Not determined.*

*** Variable. *Variable.*

espèces *Staphylococcus cohnii* et *S. haemolyticus* de SCHLEIFER et KLOSS (1975) (tabl. 3). 44 *Bacillus* sont identifiés, par ordre décroissant, aux espèces *Bacillus cereus* (21 souches), *B. firmus* (5), *B. licheniformis* (4), *B. megaterium* (4), *B. coagulans* (3), *B. alvei* (3), *B. pumilus* (2), *B. brevis* (1) et *B. subtilis* (1).

Parmi les 21 souches lipolytiques à Gram négatif, l'espèce *Aeromonas hydrophila* domine (7 souches) les autres appartenant aux genres : *Aeromonas* (4), *Pseudomonas* (4), *Moraxella* (3), *Acinetobacter* (2) et *Vibrio* (1).

L'étude de l'activité lipolytique montre que toutes les souches (73) dégradent la tributyrine et les tween 40 et 60 alors que sur les autres substrats, les résultats sont variables (tabl. 4 et 5).

L'étude de l'activité estérasique des staphylocoques (méthode API-estérase), révèle que toutes les souches hydrolysent les substrats contenant moins de 8 atomes de carbone. Les résultats obtenus par la méthode de diffusion sur gélose ne sont pas corrélés avec ceux obtenus par la méthode API-estérase (tabl. 4).

III. Discussion

A. Aspect descriptif

Les flores caséolytique et lipolytique du smen du commerce sont constituées essentiellement de bactéries à Gram positif appartenant aux genres *Bacillus* et *Staphylococcus*.

La répartition, en espèces, des *Bacillus* de la flore caséolytique est comparable à celle de la flore lipolytique. Les *Bacillus* des deux flores appartiennent au spectre *cereus* - *brevis* - *firmus* - *alvei* avec une nette prédominance de l'espèce *B. cereus*. Cette similitude dans la répartition s'explique par le fait que la majorité des espèces des deux flores sont à la fois caséolytiques et lipolytiques : 69 des 95 souches caséolytiques sont actives sur le tween 80 et/ou sur M.G.B.B.V. et 34 des 59 souches lipolytiques sont caséolytiques.

Les espèces, qui constituent les flores caséolytique et lipolytique du smen jugé suffisamment mûré pour être vendu dans le commerce, diffèrent de celles présentes au début du stockage. En effet, au niveau du beurre à J_0 (tabl. 1), il y a prédominance des bactéries à Gram négatif aussi bien parmi la flore caséolytique que lipolytique. Les genres et familles identifiées, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Vibrionaceae* et *Flavobacterium*, sont connus pour leur comportement psychrotrophe (STEWART *et al.*, 1975 ; MUIR *et al.*, 1979 ; LAW *et al.*, 1976). Leur présence dominante à J_0 s'explique par le fait que le beurre matière première du smen, est fabriqué à partir de lait cru réfrigéré.

Dès le 7^e jour, la flore lipolytique est modifiée par une diminution des bactéries à Gram négatif, sauf pour les *Vibrionaceae*, et par une augmentation des bactéries à Gram positif, en particulier les staphylocoques et, à un moindre degré, les *Bacillus*. Ces bactéries peuvent être apportées par le sel. A J_{40} et J_{71} , les *Bacillus* prédominent car les conditions hostiles du substrat ne les affectent pas. Les acides gras libres sont, en effet, peu inhibiteurs vis-à-vis des

Bacillus et peuvent même servir de facteurs de croissance pour certaines espèces (NIEMAN, 1954). Au sein de ce genre, *B. cereus* domine ; cette espèce peut se développer dans une crème pasteurisée lorsqu'elle subit une conservation prolongée (POINTURIER et ADDA, 1969). Parmi les *staphylocoques*, *S. cohnii* est le plus représenté alors que dans la famille des *Vibrionaceae*, l'espèce *Aeromonas hydrophila* est la plus abondante. Ces trois espèces présentent la propriété commune de cultiver en anaérobiose et en présence d'une teneur en chlorure de sodium égale à 7 %. Tout ceci s'accorde bien avec le mode de préparation du smen, fondé, essentiellement, sur le salage qui permet d'atteindre des valeurs moyennes de 8 % dans le non gras (EL MARRAKCHI *et al.*, 1986) et sur un stockage à l'abri de l'oxygène.

L'évolution des bactéries caséolytiques est similaire à celle des lipolytiques. En fin de maturation le genre *Bacillus* prédomine ; viennent ensuite les staphylocoques et l'espèce *Aeromonas hydrophila*. Cette similitude dans la composition des deux flores provient de la sélection, au cours de la conservation, de microorganismes à la fois lipolytiques et caséolytiques. En effet, *B. cereus* et *A. hydrophila* qui forment la majeure partie de la population à la fin de la maturation du smen, possèdent ces deux activités.

Certaines espèces microbiennes isolées parmi les bactéries lipolytiques, aussi bien au niveau du smen du commerce qu'au niveau du produit en cours d'élaboration, sont connues pour leur pouvoir enzymatique important.

Parmi les staphylocoques, ceux du groupe III et IV ont été étudiés, de ce point de vue, par BAIRD-PARKER (1963). *S. cohnii*, lui, reste inexploré. L'activité lipolytique des *Bacillus* est également bien établie mais tous les représentants de ce genre n'ont pas été étudiés en raison, probablement, du peu d'intérêt qu'on accorde à ce groupe microbien en microbiologie alimentaire. Cependant, DE BARJAC et COSMAO-DUMANOIR (1975) ont exploité le pouvoir enzymatique des *Bacillus* sur les corps gras dans un but taxonomique. Parmi nos souches, seules *B. cereus* et *B. coagulans* sont capables de dégrader la matière grasse. Parmi les microorganismes à Gram négatif, le genre *Acinetobacter* (BREUIL et KUSHNER, 1975 ; MOUREY, 1978), plus particulièrement l'espèce *Acinetobacter calcoaceticus* (BOURS et MOSSEL, 1973) et l'espèce *Aeromonas hydrophila* (ALIFAX, 1975) ont également un pouvoir enzymatique bien établi.

B. Etude des propriétés enzymatiques des bactéries lipolytiques

La totalité des bactéries lipolytiques étudiées, soit 73 souches, sont toutes actives sur la tributyrine mais seulement 58 d'entre elles le sont sur la matière grasse du beurre. Cette observation est en accord avec MUIR *et al.* (1979) qui remarquent, en étudiant l'activité lipolytique des bactéries psychrotrophes, qu'un nombre élevé possède cette différence de spécificité de substrat. Il faut ajouter que nos essais sur la matière grasse butyrique ont été réalisés sur milieu au bleu Victoria avec incubation des boîtes ne dépassant pas 3 jours. Une prolongation à 7 jours aurait peut-être permis d'augmenter le nombre de bactéries hydrolysant le beurre, comme le mentionnent FRYER *et al.* (1967).

Toutes les souches sont actives sur le tween 40 et 60, mais seulement 54 d'entre elles le sont sur tween 80 et 31 sur tween 85, en accord avec le fait

que lorsque la molécule de tween devient plus complexe, l'activité enzymatique estérasique diminue (RUTECKA-BONIN, 1975). Ce résultat permet de comprendre pourquoi la population dénombrée est presque toujours plus élevée sur milieu à la tributyrine que sur tween 80 (tabl. 2) et ceci confirme les résultats de STEWART *et al.* (1975) qui montrent, en comparant quatre milieux différents, que la gélose à la tributyrine est la plus sensible pour la détection des microorganismes lipolytiques ; viennent ensuite le milieu à la matière grasse butyrique selon la technique de BERRY (1933), le milieu au tween 80 et enfin le milieu au bleu Victoria qui est le moins sensible. Cette différence provient du fait que la majorité des microorganismes hydrolysent préférentiellement les liaisons esters d'acides gras à courte chaîne. Le milieu au tween 80, qui est un monoester de l'acide oléique, ne peut permettre que le dénombrement des seuls microorganismes capables de libérer cet acide.

Les résultats obtenus par culture sur les tweens ne sont pas concordants avec ceux donnés par la méthode API-estérase. En effet, selon la technique de SIERRA (1957), toutes les souches de microorganismes lipolytiques sont actives sur les tweens 40 et 60 c'est-à-dire capables de libérer les acides palmitique et stéarique, alors que sur galeries API, les esters de ces acides ne sont pas dégradés. Cette discordance dans les résultats peut être attribuée à plusieurs facteurs. Tout d'abord, dans la méthode de SIERRA, les microorganismes cultivent en présence du substrat pendant une durée suffisamment longue (3 jours), alors que la méthode API, le contact des cellules avec le substrat est de courte durée (quelques heures). En outre, le substrat n'est pas le même. Avec les tweens, le radical alcool est constitué par le polyoxyéthylène sorbitanne, alors que dans la méthode API, c'est un naphthol. Or, d'après BROCKEROFF et JENSEN (1974), le radical alcool exerce une influence sur l'hydrolyse par les lipases.

Reçu le 9 février 1987.

Accepté pour publication le 15 janvier 1988.

Références bibliographiques

- ALIFAX R., 1975. Activité lipolytique de quelques bactéries isolées de denrées alimentaires variées. *Aliment. Vie*, 33, 221-229.
- BAIRD-PARKER A.C., 1963. A classification of *Micrococci* and *Staphylococci* based on physiological and biochemical tests. *J. Gen. Microbiol.*, 30, 409-427.
- DE BARIAC H., COSMAO-DUMANOIR J., 1975. Intérêt de certains critères supplémentaires pour la classification de souches de *Bacillus*. *Ann. Microbiol. Inst. Pasteur*, 126, A, 83-85.
- BERRY J.A., 1933. Detection of microbial lipase by copper soap formation. *J. Bacteriol.*, 25, 433-434.
- BOURS J., MOSSEL D.A.A., 1973. A comparison of methods for the determination of lipolytic properties of yeasts mainly isolated from margarine, moulds and bacteria. *Arch. Lebensm. Hyg.*, 9, 197-203.
- BREUIL C., KUSHNER D.J., 1975. Lipase and esterase formation by psychrophilic and mesophilic *Acinetobacter* species. *Can. J. Microbiol.*, 21, 423-433.
- BROCKEROFF H., JENSEN R.G., 1974. *Lipolytic enzymes*. Academic Press, New York.
- BUCHANAN R.E., GIBBONS N.E., 1974. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 8^e édition. The Williams and Wilkins Company, Baltimore.

- EL MARRAKCHI A., BERRADA M., CHAHBOUN M., BENBOUHOU M., 1986. Etude chimique du smen marocain. *Lait*, 66 (2), 117-133.
- EL MARRAKCHI A., TANTAOUI-ELARAKI A., EL MANE A., TIFRIT L., 1988. La flore microbienne du smen marocain. I. Flore naturelle et flore d'intérêt hygiénique. *Lait*, 68 (2), 205-218.
- FRAZIER W.C., 1926. A method for detecting changes in gelatin due to bacteria. *J. Infect. Dis.*, 39, 302-309.
- FRYER T.E., LAWRENCE R.C., REITER B., 1967. Methods for isolation and enumeration of lipolytic organisms. *J. Dairy. Sci.*, 50, 477-584.
- GORDON R.E., HAYNES W.C., HOR-NAY-PANG C., 1973. The genus *Bacillus*. Agriculture Handbook, n° 427. Agriculture Research Service. United States Department of Agriculture.
- HENRIKSEN S.D., 1973. *Moraxella*, *Acinetobacter* and the *Mimeae*. *Bacteriol. Rev.*, 37, 522-561.
- HUGH R., LEIFSON E., 1953. The taxonomic significance of fermentation versus oxidative metabolism of carbohydrates by various negative bacteria. *J. Bacteriol.*, 66, 24-26.
- KNIGHT B.C.J.G., PROOM H., 1950. A comparative survey of the nutrition and physiology of mesophilic species in the genus *Bacillus*. *J. Gen. Microbiol.*, 4, 508-538.
- KOVACS N., 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxydase reaction. *Nature London*, 178, 703.
- LAW B.A., SHARPE M.E., CHAPMAN H.R., 1976. The effect of lipolytic Gram negative psychrotrophs in stored milk on the development of rancidity in cheese. *J. Dairy. Res.*, 43, 549-568.
- LEE J.V., HENRIE M.S., SHEWAN J.M., 1979. Identification of *Aeromonas*, *Vibrio* and related organisms. In : *Identification methods for microbiology*. Ed. Skinner F.A. and Lovelock D.W., Academic Press, London, 151-166.
- MOUREY A., 1978. Données sur la quantité et la qualité des bactéries lipolytiques dans les produits à base de viande. *Ann. Nutr. Aliment.*, 32, 843-856.
- MUIR D.D., PHILIPS J.D., DALGLEISH D.G., 1979. The lipolytic and proteolytic activity of bacteria isolated from blended raw milk. *J. Soc. Dairy Technol.*, 32, 19-23.
- NIEMAN C., 1954. Influence of trace amounts of fatty acids on the growth of microorganisms. *Bacteriol. Rev.*, 18, 147-163.
- NORRIS J.R., BERKELEY R.C.W., LOGAN N.A., O'DONNELL A.G., 1980. The genus *Bacillus*. In : *The prokaryotes. A handbook on habitats, Isolation and Identification*. Ed. Mortimer, New York, 1713-1714.
- POINTURIER H., ADDA J., 1969. *Beurrerie industrielle*. La Maison rustique, Paris.
- RUTECKA-BONIN I., 1975. Lipolytic activity of *Staphylococci* and *Micrococci*. *J. Bacteriol.*, 96, 1006-1010.
- SCHLEIFER K., KLOOS W.E., 1975a. A simple test system for the separation of *Staphylococci* from *Micrococci*. *J. Clin. Microbiol.*, 1, 337-338.
- SCHLEIFER K., KLOOS W.E., 1975b. Amended description of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus* and descriptions of three new-species : *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus xylosus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 25, 50-61.
- SERRES L., AMARIGLIO S., PETRANSXIENE D., 1973. *Contrôle de la qualité des produits laitiers. Tome II. Analyse microbiologique*. Direction des Services Vétérinaires, France.
- SIERRA G., 1957. A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonie van Leeuwenhoek, J. Microbiol. Serol.*, 23, 15-22.
- STEWART D.B., MURRAY J.G., NEILL S.D., 1975. Lipolytic activity of organisms isolated from refrigerated bulk milk. *Fed. Int. Lait. Bull. Annu.*, 86, 38-50.
- THORNLEY M.J., 1960. The differentiation of *Pseudomonas* from other gram negative bacteria on the basis of arginine metabolism. *J. Appl. Bacteriol.*, 23, 37-52.