



CoRFiLaC  
Consorzio  
Ricerca  
Filiere  
Lattiero  
Casearia  
"Ragusa"



Ministero degli Affari Esteri  
Ministero dello Sviluppo Economico

APQ

ACCORDO DI PROGRAMMA QUADRO  
PROGRAMMA DI SOSTEGNO ALLA COOPERAZIONE REGIONALE

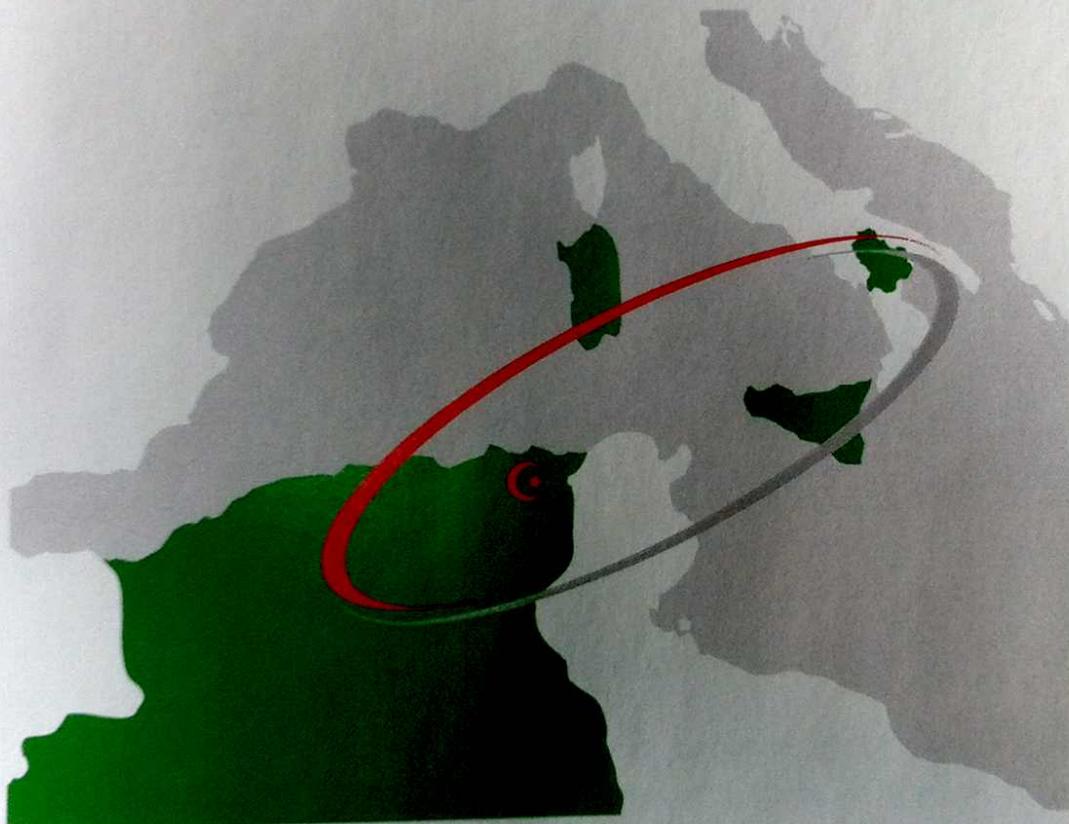


Regione Siciliana



REGIONE AUTONOMA  
DELLA SARDEGNA

## Développement de la Filière Laitière et Fromagère en Algérie



Projet cofinancié par les fonds FAS - Ministère des Affaires Etrangères, dans le cadre du

*Programma di Sostegno alla Cooperazione Regionale  
APQ Paesi della Sponda Sud del Mediterraneo*

"Programma di Sostegno alla Cooperazione Regionale"  
APQ Paesi della Sponda Sud del Mediterraneo

**PROGETTO**  
**SVILUPPO DELLA FILIERA LATTIERO-CASEARIA IN ALGERIA**

*Responsabili attuazione e coordinamento progetto*

**Prof. G. Licitra, Ph.D**

DISPA, Università di Catania, Catania, Italia

**S. Carpino, Ph.D**

Dirigente di Ricerca, CoRFiLaC, Ragusa, Regione Siciliana

*Supporto tecnico e logistico al Progetto*

G. Belvedere, R. Ben Younes, M. Caccamo, P. Campo, C. Conte,  
L. Corallo, A. Difalco, G. Farina, N. Fucà, S. La Terra, G. Leto,  
M. Manenti, M. Marchese, G. Marino, V. M. Marino, L. Migliorisi,  
S. Mirabella, C. Pasta, C. Pediliggieri, A. Piritore, G. Portelli,  
T. Rapisarda, G. Schembari, L. Tuminello, G. Tumino

**CoRFiLaC**

Consorzio  
Ricerca  
Filiera  
Lattiero  
Casearia  
•Ragusa•



*Impaginazione grafica e foto*  
**Vincenzo Guastella**

*Traduzione testi*  
**Linda Migliorisi e Rim Ben Younes**

La diffusione è gratuita (escluse le spese di spedizione)

Finito di stampare giugno 2011  
dalla Tipografia Società Cooperativa CDB - Ragusa

E' vietata la riproduzione, anche parziale, degli articoli salvo autorizzazione scritta dell'editore

**ISBN 978 - 88 - 87 562 - 14 - 9**

## TABLES DES MATIERES

Préface .....	pag. 1
Informations générales sur le projet .....	pag. 4
Produits Laitiers Traditionnels Algériens et <i>Bouhezza</i> .....	pag. 11
<i>Bouhezza</i> : Racines et curiosité .....	pag. 23
Résultats scientifiques .....	pag. 29
Annexes - Stage .....	pag. 93

# Fromage *Bouhezza*: Caractérisation microbiologique par la méthode culture-dépendante

E. Daga\*, I. Duprè\*, A. Paba\*, S. Schirru\*, M.F. Scintu\*, R. Comunian\*

## Introduction

Le fromage *Bouhezza* est un fromage traditionnel algérien produit avec le lait de chèvre, de brebis ou de vache. Il est également fabriqué avec un mélange de lait de différentes espèces dans des proportions différentes. La production de *Bouhezza* nécessite la préparation d'un récipient naturel *chekoua* et du lait fermenté spontanément, de préférence écrémé et légèrement acide, *Lben*.

La *chekoua* est un sac préparé avec la peau de chèvre ou de brebis, généralement traitée avec du sel et les baies de genièvre, il a également l'importante fonction de séparer le lactosérum de la phase solide. A la fin de la maturation est caractérisée par l'addition du lait entier pour corriger l'acidité et la salinité du fromage. Le traitement est effectué avec l'ajout du *Lben* et du lait cru et est complété, en moyenne, après 70 jours quand il y aura l'ajout du poivre (Pediliggieri et al., 2009).

Le but de ce travail était de caractériser la microflore du fromage *Bouhezza* par la méthode moléculaire culture-dépendante.

## Matériels et méthodes

Les échantillons ont été analysés à partir de 4 travaux artisanal (BF1, BF2, BF3, BF4): le fromage a été fabriqué avec du lait de vache et a eu une période de maturité maximal de 45 jours.

Les échantillons ont étéensemencées dans M17 incubée en aérobiose à 37°C et 30°C et dans MRS acidifiée à un pH de 5,4 incubée en anaérobiose à 30°C, 37°C et 42°C. Des plaques des différents milieux ont été isolés, un total de 105 colonies.

Les isolats ont été purifiés avec 3 frottis sur le milieu d'isolement, observé sous un microscope et congelé à -80°C dans un milieu cryoprotecteur constitué de 50% du glycérol et 50% du bouillon M17 pour les coques et du bouillon

---

\* Agris Sardegna-Dipartimento per la Ricerca Prodotti di Origine Animale. Loc.Bonassai, SS 291 km 18,6, 07040 Olmedo.

MRS pour les bacilles.

La caractérisation moléculaire des isolats.

La caractérisation, en termes d'espèce et souche des isolats a été réalisée en intégrant les résultats obtenus avec les techniques moléculaires REP-PCR, le séquençage des gènes 16S rRNA et PCR spécifique à l'espèce.

Pour la technique REP-PCR a été utilisée dans l'amorce (GTG) 5 (Versalovic et al, 1994, Gevers et al, 2001) les isolats ont été soumis à (GTG)5 REP-PCR: L'ADN a été préparé en utilisant la méthode FTA Clone Saver Cards (Whatman international Ltd., UK) selon les indications indiquées par le producteur: 5l de la culture cultivées overnight est repérée sur les cartes de cellulose, après séchage à la température ambiante, un disque de papier de 2 mm est prélevé avec un instrument spéciale et placé dans l'éprouvette du PCR, puis lavé avec FTA purification Réactif (2 lavages) et TE-1 (10mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 8) (2 lavages). La disquette ainsi traitée est utilisée directement dans la réaction du PCR réalisée dans un volume total de 25 l (24 l MegaMix Labogen, 1 l di primer (GTG)5 50 M) avec les suivantes conditions d'amplification:

dénaturation initiale à 95°C pendant 7 min suivie de 30 cycles de dénatura-tion à 90°C pendant 30 secondes, appariement à 40°C pendant 1 min, l'extension à 65°C pendant 8 min, extension finale à 65°C pendant 16 min. Une quantité de 9 l concentré additionné à 1l di Loading Buffer a été soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose 1,8% (W/v) dans une solution tampon Tris-acétate à 90 volts (Volthour 222) (électrophorèse cellulaire modèle HU13 SCIE-PLAS, l'alimentation EPS 500/400 connecté à volthour intégra-teurs VH1, Pharmacia) en utilisant le marqueur 1Kb Plus (Invitrogen).

Le gel a été coloré avec une solution de bromure d'éthidium (0,5 g / ml) et pho-tographié sous lumière UV avec un appareil photo digital Kodak DC 120 avec un logiciel Kodak Digital Science 1D LE3.0.

Les profils (GTG)5 obtenus ont été soumis à l'analyse cluster avec le logiciel BioNumerics V 4.5 (Applied Maths, Ghent, Belgique). La similarité entre les profils a été calculée en utilisant le coefficient de corrélation de Pearson et dendrogrammes ont été obtenus avec la méthode UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean) (Vauterin e Vautein, 1992).

En ce qui concerne les groupements dérivés de l'analyse cluster des profils (GTG)5, les isolats ont été soumis à la PCR spécifique pour l'espèce *Lb. plantarum* (Torriani et al., 2001) et *Lb. paracasei* (Ward et Timmins, 1999), suivie par l'électrophorèse sur gel d'agarose lorsque les profils pourraient être attribués à ces espèces, ou l'amplification du gène 16S rRNA avec des amor-ces P0 et P6, *Escherichia coli* position 27f et 1495r (Grifoni et al., 1995), suivi par le séquençage dans une seul direction avec un amorce P0 pris à un ser-vice externe (BMR-Génomique, Padova, Italie). Les séquences partielles du 16S rDNA, traitées avec Chromas V1.43 (Griffith University, Brisbane, Qld.,

Australia), ont été alignés dans GenBank avec le programme BLAST Altschul et al., 1997) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Les isolats ont été identifiés sur la base maximale Identity Score.

La diversité génétique des isolats de la même espèce a été exprimée en pourcentage en utilisant l'indice de diversité génétique des Simpson (D) tel que décrit par Hunter et Gaston (1988).

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^S n_j(n_j-1)$$

où N est le nombre total d'isolats par espèces, S est le nombre total de biotypes trouvés ((GTG)5-rep-Type) et  $n_j$  le nombre d'isolats appartenant à jth biotype (De Cesare et al 2001; Landgren et al., 2005).

## Resultats et discussion

La plupart des isolats ont montré des morphologies bacillaires par l'observation microscopique: 100 isolats sur un total de 105 (tableau 1). Les coques ont été isolés d'une manière sporadique dans 3 échantillons BF1 (n° 1), BF3 (n° 1), BF4 (n° 3) soit du terrain MRS que M17.

Tableau 1. Source pour les milieux et les échantillons des isolats.

	Echantillons				Totale
	BF1	BF2	BF3	BF4	
Isolation du milieu	n° isolats				
MRS 30°C anaérobiose	-	16	13	17 (2C*)	46
MRS 37°C anaérobiose	17	-	-	-	17
MRS 42°C anaérobiose	-	3	-	-	3
M17 30°C aérobiose	-	14	-	-	14
M17 37°C aérobiose	-	-	16 (1C*)	9 (1C*)	25
<b>Total</b>	<b>17 (1C*)</b>	<b>33</b>	<b>29 (1C*)</b>	<b>26 (3C*)</b>	<b>105 (5C*)</b>

\*C: Coques

L'analyse moléculaire a permis l'identification de tous les isolats sauf 1 par MRS à 30°C. La microflore a montré qu'elle est composée principalement de Lactobacilles hétérofermentaires obligés (*Lb. kefir*, *Lb. otakiensis*, *Lb. parabuchneri*, *Lb. fermentum*, *Lb. diolivorans*, *Lb. hilgardii*) et facultatives (*Lb. paracasei*, *Lb. plantarum*), tous les mésophiles sauf *Lb. fermentum* (Thermophiles) (Tableau 2); les espèces mésophiles hétérofermentaires obligés appartiennent au groupe buchneri.

Il convient de noter que l'espèce *Lb. otakiensis*, reconnue en 2009 comme une nouvelle espèce du groupe buchneri et isolé du "Sunki", un cornichon préparé par fermentation spontanée de feuilles et de tiges d'oignon rouge au Japon (Watanabe et al., 2009).

Cette espèce n'a jamais été rapportée dans les produits laitiers: sa présence dans le fromage *Bohuezza* pourrait provenir du genièvre utilisé pour traiter la *chekoua*. Il faudrait envisager d'étudier une telle espèce qui constitue la microflore du baie de genièvre pour confirmer cette hypothèse.

Les isolats en forme sphérique «coccica» sont les résultats appartenant au genre *Streptococcus* et à l'espèce *S. epidermidis* (tableau 2), un streptocoque a été identifié comme *St. parasanguinis*, cette espèce a été associée au mammites subcliniques chez les ovins (Fernandez-Garayzabal et al., 1998).

Tableau 2. Distribution des espèces en relation avec le milieu d'isolement.

	BF1	BF2	BF3	BF4
<b>Espèces</b>	<b>Dilution des isollements</b>			
<i>Lb. paracasei</i>	-	4/-5/-6	-3/-4	-2/-3
<i>Lb. plantarum</i>	-	4/-5	-	-
<i>Lb. kefiri</i>	-	6	6	4/-5
<i>Lb. parabuchneri</i>	-2/-3	-	-	-
<i>Lb. otakiensis</i>	-2/-3	6	-	-
<i>Lb. diolivorans</i>	-	6	-	-
<i>Lb. hilgardii</i>	-		-	-
<i>Lb. fermentum</i>	-	3/-4	6	-
<i>Streptococcus spp.</i>	-3	-	-	4/-5
<i>St. parasanguinis</i>	-	-	-3	-
<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	-2
ND	-	6	-	

1 anaérobiose

2 aérobiose

3 pas déterminé

En ce qui concerne les Lactobacilles, les espèces les plus fréquentes sont l'espèce *Lb. kefiri* (32%) et l'espèce *Lb. paracasei* (32%) (Fig. 1), ces espèces ont été isolées dans diverses proportions à partir de 3 échantillons sur 4 (Fig.2). L'échantillon de BF2 a présenté la plus grande biodiversité au niveau des espèces: il contient toutes les espèces isolées, sauf *Lb. parabuchneri* (Fig.2). Les échantillons BF1 et BF4 sont les plus pauvres, seulement 2 espèces sont présentes: *Lb. otakiensis* et *Lb. parabuchneri* in BF1, *Lb. paracasei* et *Lb. fermentum* dans BF4. Les espèces *Lb. parabuchneri* et *Lb. plantarum* ont été isolées dans un seul échantillon, respectivement BF1 et BF2 (Fig.2).

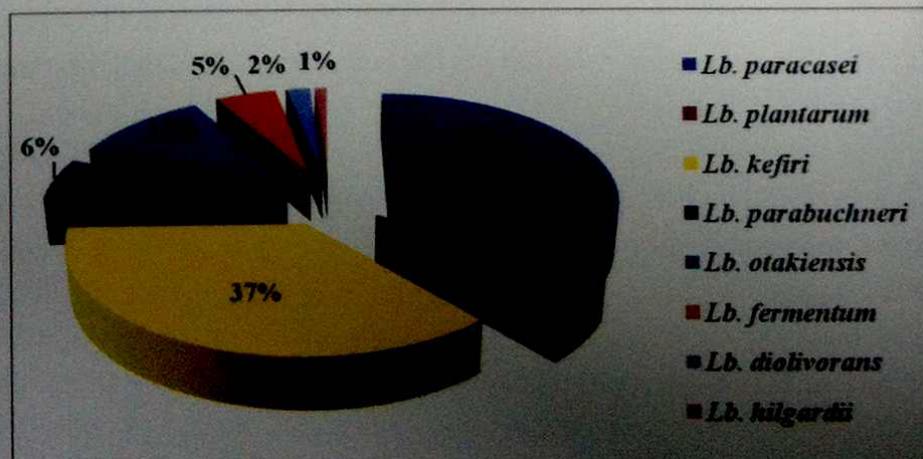


Fig.1. Distribution global des lactobacilles dans les différentes espèces.

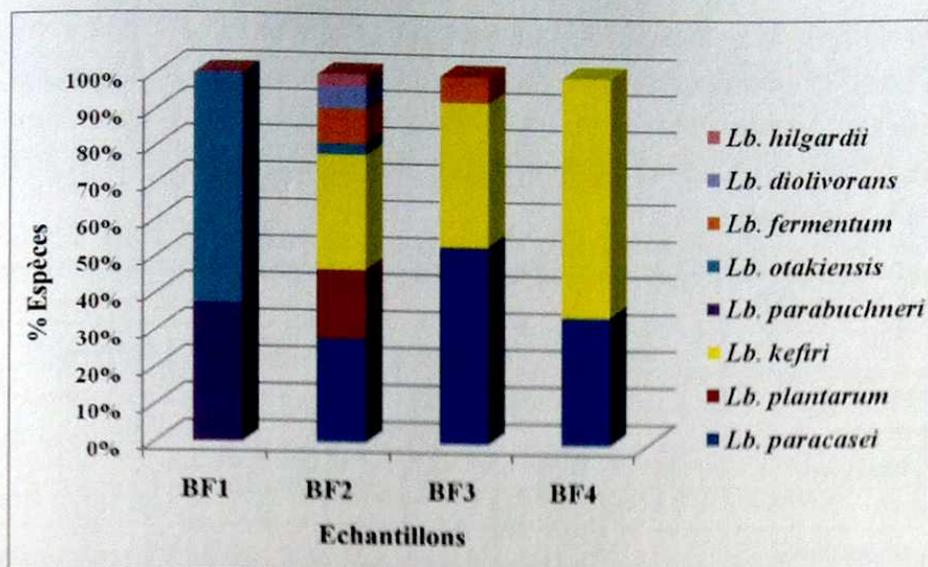


Fig. 2. Distribution des lactobacilles dans les différents espèces par échantillon.

L'échantillon BF1 a été choisi lequel avec la microflore la plus pauvre ainsi qu'un certain nombre d'espèces isolées, également le nombre de micro-organismes: les isolations ont été effectuées à basse dilution (-3) que les autres échantillons (Tab.3).

Dans l'échantillon BF2, le nombre de *Lb. paracasei*, *Lb. kefir*, *Lb. otakiensis*, *Lb. diolivorans* et *Lb. hilgardii* (isolé à une dilution -6) a été répété 100 et 10 fois plus grande de *Lb. fermentum* (isolées à dilution -4) et *Lb. plantarum* (isolé à dilution -5) (Tab. 3). Dans l'échantillon BF3 les espèces hétérofermentaire surtout *Lb. kefir* et *Lb. fermentum* ont été dominants, soit 100 fois plus élevée qu'aux espèces hétérofermentaires facultatives *Lb. paracasei* (Fig. 3). Cette dominance a été également trouvée dans l'échantillon BF4 où *Lb. kefir* a été isolé à une dilution de -5, tandis que i à une dilution de -3 (Tab. 3).

Tableau 3. Dilution des isolations des différents espèces de divers échantillons.

Espèces	MRS <sup>1</sup>			M17 <sup>2</sup>		Totale
	30°C	37°C	42°C	30°C	37°C	
<i>Lb. paracasei</i>	1	-	-	8	23	<b>32</b>
<i>Lb. plantarum</i>	-	-	-	6	-	<b>6</b>
<i>Lb. kefir</i>	36	-	-	-	-	<b>36</b>
<i>Lb. otakiensis</i>	1	10	-	-	-	<b>11</b>
<i>Lb. parabuchneri</i>	-	6	-	-	-	<b>6</b>
<i>Lb. fermentum</i>	2	-	3	-	-	<b>5</b>
<i>Lb. diolivorans</i>	2	-	-	-	-	<b>2</b>
<i>Lb. hilgardii</i>	1	-	-	-	-	<b>1</b>
<i>Streptococcus spp.</i>	2	1	-	-	-	<b>3</b>
<i>St. parasanguinis</i>	-	-	-	-	1	<b>1</b>
<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	-	1	<b>1</b>
N.D. <sup>3</sup>	1	-	-	-	-	<b>1</b>
<b>Total</b>	<b>48</b>	<b>17</b>	<b>3</b>	<b>14</b>	<b>25</b>	<b>105</b>

Comme le montre le Tableau 4, l'analyse des profils de rep-(GTG) 5 a montré une grande diversité génétique des isolats de toutes les espèces sauf de l'espèce *Lb. parabuchneri*. L'éventuelle diversité des isolats appartenant à cette espèce devrait toutefois être testée avec une technique de pouvoir discriminant supérieur.

**Tableau 4.** Diversité génétique des isolats appartenant à différentes espèces de lactobacilles mesurée avec la technique (GTG)5-rep-PCR.

	Isolats	Biotypes	diversité génétique
Espèces	n°	n°	%D
<i>Lb. paracasei</i>	32	29	99,4
<i>Lb. plantarum</i>	6	6	100
<i>Lb. kefir</i>	36	16	89
<i>Lb. parabuchneri</i>	6	1	0
<i>Lb. otakiensis</i>	11	9	94,5
<i>Lb. diolivorans</i>	2	2	100
<i>Lb. hilgardii</i>	1	1	NC *
<i>Lb. fermentum</i>	5	4	90

\* Non calculé

### Conclusion

La microflore du fromage *Bouhezza* analysée a été dominée par des *Lactobacillus* hétérofermentaires forcément appartenant principalement au groupe *buchneri*, même si ont été trouvées des différences dans le nombre de microorganismes et les espèces isolées dans les échantillons de différents producteurs. Il serait opportun de compléter l'étude analysant les caractéristiques phénotypiques de ces organismes pour comprendre leur rôle dans la maturation du fromage *Bouhezza*.

### References

- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.* 25, 3389-3402.
- De Cesare, A., Manfreda, G., Dambaugh, T. R., Guerzoni, M. E., Franchini, A. 2001. Automated ribotyping and random amplified polymorphic DNA analysis for molecular typing of *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium* strains isolated in Italy. *J. Appl. Microbiol.* 91, 780-785.
- Fernandez-Garayzabal, J.F., Fernandez, E., Las Heras, A., Pascual, C., Collins, M.D., Dominguez, L. 1998. *Streptococcus parasanguinis*: new pathogen associated with asymptomatic mastitis in Sheep. *Emerg. Infect. Diseases* 4.
- Gevers, D., Huys, G., Swings, J. 2001. Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiol. Lett.* 205, 31-36.
- Grifoni, A., Bazzicalupo, M., Di Serio, C., Fancelli, S., Fani, R. 1995. Identification of *Azospirillum* strains by restriction fragment length polymorphism of 16S rDNA and of histidine operon. *FEMS Microbiol. Lett.* 127, 85-91.
- Hunter, P. R. e Gaston, M. A. 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.* 26, 2465-2466.

Landgren, M., Odén, H., Kühn, I., Österlund, A., Kahlmeter, G. 2005. Diversity among 2481 *Escherichia coli* from women with community-acquired lower urinary tract infections in 17 countries. *J. Antimicrob. Chemother.* 55, 928-937.

Pediliggieri, C., Carpino S., Licitra, G. 2009. Molecular characterization of Algerian cheese Bouhezza by PCR-TTGE. *J. Anim. Sci.* Vol. 87, E-Suppl. 2 / *J. Dairy Sci.* Vol. 92, E-Suppl. 1.

Torriani, S., Felis, G. E., Dellaglio, F. 2001. Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by *recA* Gene Sequence Analysis and Multiplex PCR Assay with *recA* Gene-Derived Primers. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 3450-3454.

Vauterin, L. e Vauterin, P. 1992. Computer-aided objective comparison of electrophoretic patterns for grouping and identification of microorganisms. *Eur. Microbiol.* 1, 37-41.

Versalovic, J., Schneider, M., De Bruijn, F. J., Lupski, J. R. 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods Mol. Cell. Biol.* 5, 25-40.

Ward, L.J.H. e Timmins, M.J. 1999. Differentiation of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* by polymerase chain reaction. *Lett. Appl. Microbiol.* 29, 90-92.

Watansbe, K., Fujimoto, J., Tomii, Y., Sasamoto, M., Makino, H., Kudo, Y., Okada, S. 2009. *Lactobacillus kisonensis* sp. nov., *Lactobacillus otakiensis* sp. nov., *Lactobacillus rapi* sp. nov. and *Lactobacillus sunkii* sp. nov., heterofermentative species isolated from sunki, a traditional Japanese pickle. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 754-760.