



**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche**  
**scientifique**

Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen  
Faculté des sciences de la nature et de la vie,  
et des sciences de la terre et de l'univers  
Département de Biologie  
Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agro-alimentaire,  
au Biomédical et à l'Environnement



## **Mémoire**

Présenté par

**M<sup>lle</sup> RECHIDI Karima**

En vue de l'obtention du diplôme de Master académique

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Microbiologie et Contrôle de Qualité

## **Thème**

**Comparaison des procédés d'extraction des activités  
antimicrobiennes produites par une souche poly-  
extrêmophile du genre *Bacillus* isolée de la grande sebkha  
d'Oran.**

Soutenu le **30/06/ 2025**

Devant le jury composé de :

<b>Présidente</b>	Dr. ZERHOUNI KHADIDJA	M.C.B à l'Université de Tlemcen-Algérie
<b>Encadrante</b>	Dr. NAS Fatima ep. RABEHI	M.C.B. Université de Tlemcen-Algérie
<b>Examinatrice</b>	Dr. MEBKHOUTI Samira	M.C.B à l' Université de Tlemcen-Algérie
<b>Examinatrice</b>	Dr. ZENATI Fatima	M.C.B à l' Université de Tlemcen-Algérie

**Année universitaire 2024-2025**

# Remerciement

Avant tout je remercie ALLAH, le miséricordieux, le tout puissant et le plus clément qui nous aide et nous donne le courage de tout faire.

Je suis particulièrement reconnaissante aux membres du jury d'avoir accepté de juger ce travail :

- ❖ **Dr. ZERHOUNI KHADIDJA**, Maitre de conférence B. à l'Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen qui a accepté de présider ce jury.
- ❖ **Dr. Dr. MEBKHOUTI Samira et Dr. ZENATI Fatima**, maitres de conférences B. à l'Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen qui ont accepté d'examiner ce travail.

Je suis particulièrement honorée de bénéficier de vos remarques, chères enseignantes, et je tiens à vous assurer de ma grande estime et de ma profonde gratitude.

Je tiens aussi à remercier plus particulièrement ma promotrice **Mme NAS Fatima**, Maitre de Conférences B à l'université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen de m'avoir encadrée, orientée et soutenue tout au long de ce travail. J'ai eu vraiment un grand honneur de travailler sous sa direction.

Un grand merci s'adresse également à tous nos enseignants au département de **Biologie - faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre et de l'univers**. Leurs enseignements et leurs conseils ont été précieux tout au long de notre cursus universitaire.

Mes remerciements s'adressent également à tous les membres du Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, au Biomédical et à l'Environnement (LAMAABE).

Enfin, je tiens à exprimer ma profonde gratitude envers toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail. Leur soutien et leur encouragement ont été essentiels à ma réussite.

# *Dédicace*

Je dédie ce travail à

À la mémoire de mon cher père. Mon papa qui a été mon premier soutien tout au long de ma vie et qui prenait soin des moindres détails de ma vie, n'a jamais hésité à m'apporter son soutien. Il aurait été l'une des personnes les plus heureuses à l'occasion de cet accomplissement. J'ai été et je resterai toujours sa petite fille chérie. Que Dieu lui accorde Sa miséricorde.

À ma mère, mon amie, ma vie, et le pilier sur lequel je m'appuie. Sans elle, je ne serais rien. Ma précieuse perle, elle a été présente et a lutté sans relâche tout au long de ces années, depuis mes premiers pas à l'école. Qu'Allah préserve sa vie et la protège de tout mal. Je serai toujours la fille dont ils seront fiers devant tout le monde.

À ma famille, pour leur présence et leur encouragements, toujours prêts à me soutenir dans les moments de doute.

À mes cousines, d'être toujours à mes côtés, pour leur écoute attentive et leur réconfort dans les moments les plus difficiles.

À mes copines, Fatima, Sara, Ichrak, ma deuxième famille qui n'ont jamais hésité à me soutenir et à être présentes dans les moments les plus difficiles de ma vie. Vous avez été là dans mes moments de tristesse, je suis tellement reconnaissante de vous avoir dans ma vie.

À ma chère copine Lamia, bien que notre amitié soit encore récente, il semble que nous nous connaissions depuis longtemps. Elle a toujours été présente à mes côtés ces derniers temps, m'apportant l'énergie positive. Elle m'a également aidée dans ce travail. Je me considère vraiment chanceuse de l'avoir rencontrée.

À mes merveilleuses Asma et Loubna, je me considère vraiment chanceuse de vous avoir dans ma vie. Vous avez toujours été un soutien pour moi, et vous avez été la source de mes sourires même dans les moments les plus difficiles. Nous avons partagé tant de souvenirs précieux ensemble, et je suis certaine que nous resterons à jamais le trio le plus beau et le plus uni.

Enfin, à Dr. NAS Fatima, mon premier soutien dans ce travail. Elle incarne l'exemple de la femme forte, toujours à la recherche de l'excellence. Elle fait partie des meilleurs professeurs que j'ai eus, avec un cœur d'une grande bonté. Je suis profondément reconnaissante pour son accompagnement et son soutien constant. Que Dieu protège et bénisse sa petite famille.

# Table des matières

ملخص

**Abstract**

**Résumé**

**Liste des Abréviations**

**Liste des figures**

**Liste des tableaux**

**Introduction général..... 1**

**Synthèse bibliographique**

1. Les bactéries du genre *Bacillus* : taxonomie et caractéristiques..... 3

2. Les bactéries extrêmophiles du genre *Bacillus*..... 4

3. Métabolites antimicrobiens produits par *Bacillus*..... 6

3. 1. Peptides ribosomiaux..... 6

3. 2. Peptides non ribosomiaux (NRPS)..... 6

3. 3. Antibiotiques non peptidiques..... 8

3. 4. Autres métabolites antimicrobiens..... 8

4. Applications et perspectives biotechnologiques des *Bacillus* et leurs métabolites..... 8

**Matériel et méthodes**

1. Origine de la souche et conditions de culture..... 11

2. Revivification et vérification de la pureté de la souche LMB3073..... 11

3. Criblage des activités antimicrobiennes de la souche LMB3073..... 11

3. 1. Standardisation des inocula des souches de référence ..... 12

3. 2. Production des antimicrobiens sur milieu gélosé..... 12

3. 3. Production des métabolites antimicrobiens sur milieu liquide ..... 13

4. L'extraction des métabolites antimicrobiens de l'isolat LMB3073..... 14

5. Evaluation du pouvoir antimicrobien des différents extraits obtenus..... 14

**Résultats et Discussions**

1. Résultats..... 15

1. 1. Criblage des activités antimicrobiennes de la souche LMB3073 sur milieu gélosé  
GN à 10% de NaCl à différentes sources nutritionnelles..... 15

1. 2. Criblage des activités antimicrobiennes de la souche LMB3073 sur milieu liquide  
BN à 10% de NaCl à différentes sources nutritionnelles..... 17

1. 3. Comparaison approfondie de l'efficacité et la rentabilité des activités antimicrobiennes produites par la souche LMB3073 en milieu solide (GN) et en milieu liquide (BN) .....	19
1. 4. L'extraction des métabolites antimicrobiens et évaluation de l'activité des extraits.....	20
2. Discussion .....	23
<b>Conclusion et perspectives.....</b>	<b>27</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>28</b>
<b>Annexe.....</b>	<b>36</b>

## ملخص

يتناول هذا البحث دراسة سلالة متعددة المقاومة للظروف البيئية القاسية من نوع *Bacillus LMB3073* المعزولة من السبخة الكبرى بوهران، بهدف تقييم قدرتها على إنتاج أنشطة مضادة للميكروبات ومقارنة كفاءة استخلاص نواتجها الثانوية.

تمت زراعة السلالة على أوساط صلبة وسائلة تحتوي على 10% من كلوريد الصوديوم (NaCl)، ومدعمة بمصادر مختلفة من الكربون (الغلوكوز، الغليسول، 80 neewT)، والنيتروجين (مستخلص الخميرة، حمض الجلوتاميك)، والفوسفور ( $KH_2PO_4$ ). تم اختبار الأنشطة المضادة للميكروبات ضد تسعة كائنات مرجعية، شملت بكتيريا موجبة وسالبة الغرام بالإضافة إلى الخمائر، باستخدام تقنيتي الأسطوانات على الآغار والآبار. أجريت عملية استخلاص النواتج الأيضية باستخدام الماء المقطر، الإيثانول، وأسيتيت الإيثيل.

وقد أظهرت النتائج أن أسيتيت الإيثيل كان الأكثر فعالية في استخلاص المركبات النشطة، حيث وفر مناطق تثبيط كبيرة ضد *Bacillus subtilis*، *Staphylococcus aureus*، و *Micrococcus luteus*. بينما أظهر الإيثانول فعالية متوسطة، ولم يُظهر الماء المقطر أي نشاط يُذكر. كما تبين أن الوسط الصلب المدعم بـ 0.5% من Tween 80 ساهم في تعزيز إنتاج أنشطة مضادة للميكروبات قوية. وقد تركزت هذه الأنشطة بشكل رئيسي ضد البكتيريا موجبة الغرام، مع فعالية ضعيفة تجاه البكتيريا سالبة الغرام والخمائر.

تؤكد هذه النتائج الإمكانات البيوتكنولوجية للسلالة LMB3073، وتبرز أهمية ظروف الزراعة واختيار المذيب المناسب من أجل تحسين إنتاج واستخلاص المركبات المضادة للميكروبات.

**الكلمات المفتاحية:** *Bacillus*، الأنشطة المضادة للميكروبات، الاستخلاص، المذيبات، المصادر الغذائية.

## Abstract

This work focuses on the study of the poly-extremophilic strain *Bacillus* LMB3073, isolated from the Great Sebkha of Oran, with the aim of evaluating its production of antimicrobial activities and comparing the efficiency of metabolite extraction methods.

The strain was cultivated on solid and liquid media containing 10% NaCl, supplemented with various carbon sources (glucose, glycerol, Tween 80), nitrogen sources (yeast extract, glutamic acid), and a phosphorus source (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). Antimicrobial activities were assessed against nine reference microorganisms, including Gram-positive and Gram-negative bacteria, as well as yeasts, using agar plug and well diffusion techniques. Metabolites were extracted using distilled water, ethanol, and ethyl acetate.

The results showed that ethyl acetate provided the most effective extraction, yielding significant inhibition zones against *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, and *Micrococcus luteus*. Ethanol showed moderate effectiveness, whereas distilled water showed no activity. Solid medium enriched with 0.5% Tween 80 enhanced the production of strong antimicrobial activities. The observed activities were primarily directed against Gram-positive bacteria, with limited action against Gram-negative bacteria and yeasts.

These results confirm the biotechnological potential of strain LMB3073 and underscore the importance of culture conditions and solvent choice for optimizing the production and extraction of antimicrobial metabolites.

**Keywords:** *Bacillus*, antimicrobial activities, extraction, solvents, nutritional sources.

## Résumé

Ce mémoire porte sur l'étude d'une souche poly-extrêmophile *Bacillus* LMB3073 isolée de la grande Sebkhah d'Oran, pour objectif d'évaluer sa production d'activités antimicrobiennes et de comparer l'efficacité d'extraction de ses métabolites.

La souche a été cultivée sur milieux solides et liquides contenant 10% de NaCl, supplémentés en différentes sources de carbone (glucose, glycérol, Tween 80), d'azote (extrait de levure, acide glutamique) et de phosphore ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ). Les activités antimicrobiennes ont été testées contre neuf germes de référence, incluant des bactéries à Gram positif et Gram négatif ainsi que des levures, par les techniques des cylindres d'agar et des puits. L'extraction des métabolites a été réalisée avec l'eau distillée, l'éthanol et l'acétate d'éthyle.

Les résultats obtenus ont révélé que l'acétate d'éthyle a permis une extraction plus efficace des composés actifs, donnant des zones d'inhibition importantes contre *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* et *Micrococcus luteus*. L'éthanol a montré une efficacité intermédiaire, tandis que l'eau distillée n'a révélé aucune activité. Le milieu solide enrichi en Tween 80 à 0.5% a favorisé la production d'activités antimicrobiennes puissantes. Les activités observées étaient principalement dirigées contre les bactéries à Gram positif, avec une faible action contre les Gram négatif et les levures.

Ces résultats confirment le potentiel biotechnologique de la souche LMB3073 et soulignent l'importance des conditions de culture et du choix du solvant pour optimiser la production et l'extraction de métabolites antimicrobiens.

**Mots clés :** *Bacillus*, activités antimicrobiens, extraction, solvants, sources nutritives

## Liste des abréviations

<b>ATCC</b>	:	American type culture collection
<b>BN</b>	:	Bouillon Nutritif
<b>CLSI</b>	:	Clinical and Laboratory Standards Institute
<b>DO</b>	:	Densité optique
<b>GN</b>	:	Gélose nutritive
<b>IP</b>	:	Institut Pasteur
<b>M</b>	:	Molaire
<b>NRPS</b>	:	Non Ribosomal Peptides Synthétases
<b>OMS</b>	:	Organisation mondiale de la santé
<b>p/v</b>	:	Poid/volume
<b>PGPR</b>	:	Plant growth promoting Rhizobacteria
<b>rpm</b>	:	Rotation par minute
<b>SARM</b>	:	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méthicilline
<b>UFC</b>	:	Unité formant colonies
<b>v/v</b>	:	Volume /volume

## **Liste des figures**

- Figure N° 1** : Structures chimiques des peptides antimicrobiens :iturine ,  
Surfactine ,Fengycine . **07**
- Figure N° 2** : histogramme présentant les résultats des activités  
antimicrobiennes de la souche LMB3073 obtenus par  
fermentation sur milieu gélosé GN à10 de NaCl à différentes  
sources nutritives **16**
- Figure N° 3** : histogramme présentant les résultats des activités  
antimicrobiennes de la souche LMB3073 obtenus par  
fermentation sur milieu liquide BN à 10% NaCl à différentes  
sources nutritives **18**
- Figure N° 4** : photos des résultats de l'activité antimicrobienne, vis-à-vis  
quelques germes test, des extraits obtenus à partir de milieu  
solide (puits de 1 à 15) et à partir du milieu liquide (puits  
de 16 à 18) **21**

## Liste des tableaux

<b>Tableau N° 1</b>	: les germes tests utilisés	<b>12</b>
<b>Tableau N° 2</b>	: Diamètres des zones d'inhibition en millimètre (mm) obtenus par la technique des cylindres d'agar.	<b>15</b>
<b>Tableau N°3</b>	: Diamètres des zones d'inhibition en millimètre (mm) obtenus par la technique des puits.	<b>18</b>
<b>Tableau N° 4</b>	: Comparaison des Conditions Expérimentales	<b>19</b>
<b>Tableau N° 5</b>	: Diamètres des zones d'inhibition des différents extraits obtenus à partir du milieu solide et liquide.	<b>22</b>

# *Introduction générale*

## ***Introduction générale***

Les agents antimicrobiens représentent l'une des avancées thérapeutiques majeures du XXe siècle, ayant joué un rôle essentiel dans la réduction de la morbidité et de la mortalité liées aux maladies infectieuses, et contribué ainsi à l'amélioration de l'espérance de vie. Toutefois, leur usage intensif, voire abusif, a eu pour conséquence l'émergence de mécanismes de résistance chez de nombreux microorganismes pathogènes. Cette situation a conduit à une augmentation alarmante des cas de multirésistance, à la réémergence de maladies infectieuses que l'on croyait parfaitement maîtrisées, ainsi qu'à l'apparition de nouveaux agents pathogènes.

Dans ce contexte critique, la recherche de nouvelles molécules antimicrobiennes s'impose comme une priorité. Les microorganismes demeurent des sources prometteuses, durables et renouvelables de métabolites bioactifs pouvant offrir des alternatives efficaces aux antibiotiques conventionnels.

Parmi les pistes prometteuses explorées au cours des dernières décennies, les microorganismes extrémophiles occupent une place centrale en raison de leur aptitude à produire des métabolites secondaires originaux et exceptionnels, avec des applications potentielles dans de nombreux domaines, allant de la santé humaine à la protection de l'environnement (**Klouche Khelil *et al.*, 2013 ; Arab *et al.*, 2019 ; Aissaoui *et al.*, 2018, Nas *et al.*, 2021 ; Saibi *et al.*, 2022 ; Karnwal *et al.*, 2023**)

Les milieux salins et hypersalins constituent des écosystèmes extrêmes particuliers capables d'abriter une grande variété de microorganismes halophiles et halotolérants, dotés de remarquables aptitudes d'adaptation. Ces environnements extrêmes représentent également une source prometteuse de métabolites originaux et potentiellement valorisables (**Edbeib *et al.*, 2016**).

Parmi les microorganismes isolés de ces habitats figurent les bactéries du genre *Bacillus*, reconnues pour leur capacité à former des endospores résistantes, ce qui leur confère une tolérance à des conditions extrêmes, notamment à la salinité (**Horikoshi, 2008**). De plus, plusieurs espèces de ce genre *Bacillus* sont réputées pour leurs vastes applications en biotechnologie (**Mondol *et al.*, 2013**). Elles sont capables de produire des enzymes fonctionnant dans des environnements extrêmes (**Nabti *et al.*, 2013**), ainsi que divers composés bioactifs tels que des antimicrobiens, des agents anticancéreux et des biosurfactants (**Kumar *et al.*, 2020**).

La Grande Sebkhha d'Oran, située dans le nord-ouest de l'Algérie, représente un écosystème extrême particulièrement propice à l'isolement de microorganismes extrémophiles particuliers. Cet écosystème se distingue par une salinité élevée, atteignant 35g/L (**Nas *et al.*, 2021**).

## *Introduction générale*

L'isolat LMB3073 qui fait l'objet de cette étude, a été isolé à partir de cet écosystème. Son identification par séquençage de l'ARNr 16S a révélé son affiliation au genre *Bacillus*. Il s'agit d'une souche poly-extrêmophile capable de croître dans une large gamme de température comprise entre 15 et 60°C, des valeurs de pH allant de 5 à 11, ainsi qu'une concentration en NaCl variant de 0 à 20%. Son pouvoir antimicrobien a été étudié par Dr. NAS F. mettant en évidence un potentiel antimicrobien significatif (Nas *et al.*, 2021), justifiant ainsi son choix pour cette étude.

Au-delà de la simple production, l'efficacité de la récupération des composés bioactifs dépend étroitement des conditions d'extraction. En effet, le choix du support de culture ainsi que la nature du solvant influencent de manière significative la composition, la concentration et l'activité biologique des métabolites extraits. C'est dans ce contexte que s'inscrit notre étude, dont l'objectif principale est de comparer l'efficacité de différents procédés d'extraction des métabolites antimicrobiens produits par la souche LMB3073. Pour ce faire, des cultures seront réalisées sur des milieux solides et liquides enrichis en NaCl, puis soumises à diverses méthodes d'extraction combinant différents type de milieu de culture et de solvants d'extraction afin de maximiser le rendement et l'activité des extraits antimicrobiens obtenus.

# *Synthèse Bibliographique*

## **1. Les bactéries du genre *Bacillus* : taxonomie et caractéristiques**

Le genre *Bacillus* appartient au Phylum des *Firmicutes*, Classe des *Bacilli*, Ordre des *Bacillales*, famille des *Bacillaceae* (Maughan *et al.*, 2011). Il a été défini pour la première fois par Cohn en 187 avec *Bacillus subtilis* comme espèce-type. Il regroupe un ensemble hétérogène de bactéries qui se présentent sous forme de bâtonnets à Gram positif isolés, en paires, ou en chaînettes, immobiles ou mobiles par des flagelles péritriches aérobies, et capables de former des endospores et de produire la catalase. Certaines espèces sont capsulées comme : *B. anthracis*, *B. licheniformis*, *B. megaterium* et *B. subtilis* (Ash *et al.*, 1991 ; De Vos *et al.*, 2009).

Les espèces du genre *Bacillus* poussent sur des milieux ordinaires tels que la gélose nutritive et la gélose au sang (Maughan *et al.*, 2011).

Phénotypiquement, elles sont très hétérogènes, la morphologie de leurs colonies est très variable entre et au sein des espèces dont la composition du milieu de culture et les conditions d'incubation influent sur cette morphologie. (De Vos *et al.*, 2009).

Ils sont chimiotrophes, adoptant un métabolisme chimioorganotrophe ou chimiolithotrophe, avec des besoins nutritionnels variés ; certaines espèces sont prototrophes tandis que d'autres sont auxotrophes (De Vos *et al.*, 2009).

Le nombre des espèces du genre *Bacillus* n'a pas cessé de fluctuer et d'augmenter grâce à l'application des méthodes efficaces pour l'enrichissement et l'isolement tenant compte de la diversité physiologique et des besoins nutritionnels et culturelles de ces organismes, et à l'utilisation des techniques moléculaires pour la caractérisation et l'identification en particulier sur le plan génétique telle que l'analyse des séquences des gènes de l'ARNr 16S (Fritze, 2004). En se basant également sur les analyses comparatives des séquences d'ARNr 16S et les analyses chimio taxonomiques, plusieurs espèces initialement décrites comme appartenant au genre *Bacillus* ont été transférées à d'autres genres ou classifiées comme membres de nouveaux genres (Gaur, 2015). A titre d'exemple, *Geobacillus* (Nazina *et al.*, 2001), *Alkalibacillus* (Usami *et al.*, 2007) et *Halalkalibacillus* (Echigo *et al.*, 2007),

Sur le plan appliqué, *B. subtilis* sert de modèle en recherche fondamentale et biotechnologie (production d'enzymes, étude de la sporulation) et est utilisé comme probiotique et biopesticide (De Vos *et al.*, 2009).

## **2. Les bactéries extrêmophiles du genre *Bacillus***

Les microorganismes extrêmophiles désignent des micro-organismes capables de coloniser des habitats caractérisés par des conditions extrêmes, inhospitalières pour les organismes classiques. Le terme « extrêmophile » a été introduit par **MacElroy en 1974** pour qualifier les êtres vivants pouvant se développer dans de telles conditions, tandis que **Wainwright (2003)** a proposé le terme « extrêmodure » pour désigner ceux qui peuvent y survivre sans y proliférer.

Selon les conditions extrêmes auxquelles les microorganismes extrêmophiles sont exposés, ils peuvent être divisés en différents groupes : les halophiles ou halotolérants, qui peuvent survivre dans des conditions de forte salinité ; les thermophiles, qui sont adaptés aux températures élevées ; les psychrophiles, qui sont adaptés aux températures froides ; les alcalophiles, qui vivent dans des environnements alcalins ; les acidophiles, qui préfèrent les environnements acides et les piézophiles, qui supportent des pressions élevées (**Salwan et Sharma, 2020 ; Thakur et al., 2022**).

Certains microorganismes extrêmophiles sont capables de prospérer dans des environnements combinant plusieurs conditions extrêmes, ils sont qualifiés poly-extrêmophiles (**Horikoshi et Bull, 2011**) telle que l'espèce archéenne *Sulfolobus acidocaldarius* qui se développe à 80°C et à un pH égal à 3 (**Satyanarayana et al., 2005**).

Un autre exemple de bactéries poly extrêmophiles est *Natranaerobius thermophilus*, une espèce halophile alcalophile et thermophile isolée d'un sédiment d'un lac alcalin et hypersalin de Wadi An Natrun en Egypt. Cette bactérie croit dans une plage de températures allant de 35°C à 56°C avec un optimum à 53°C. Son intervalle de pH se situe entre 8,3 et 10,6 avec un optimum à 9,5. Aux conditions optimales de température (53 °C) et de pH (9,5) elle tolère des concentrations salines comprises entre 3,1 et 4,9 M, avec un optimum entre 3,3 et 3,9 M (**Mesbah et al., 2009**).

Les bactéries appartenant au genre *Bacillus* sont largement répandues dans la nature. Bien que le sol constitue leur principal habitat, leurs aptitudes physiologiques et métaboliques leur permettent de s'adapter à une grande diversité de milieux y compris les milieux extrêmes tels que les déserts, les régions antarctiques, les sources hydrothermales, les lacs hypersalées ou alcalins, les marais salants, les mines de sel et même les sites exposés à des radiations élevées. Cette diversité écologique illustre la capacité adaptative exceptionnelle de ce genre (**Echigo et al., 2007; Roohi et al., 2014 ; Aissaoui et al., 2018 ; Arab et al., 2018, Nas et al., 2021**).

Les bactéries extrémophiles du genre *Bacillus* possèdent une grande plasticité physiologique et adaptative, fruit de mécanismes cellulaires et moléculaires complexes qui leur permettent de faire face à des stress physiques et chimiques intenses. Certaines espèces sont thermophiles, capables de croître à des températures supérieures à 60 °C, grâce à des membranes cellulaires enrichies en lipides saturés et des protéines thermostables qui maintiennent la fonctionnalité enzymatique à haute température. D'autres espèces sont psychrophiles, s'adaptant à des températures très basses par la production d'enzymes à haute flexibilité moléculaire et par la modification de la fluidité membranaire **(Rampelotto, 2013)**.

Quant aux espèces halophiles et halotolérantes du genre *Bacillus*, elles peuvent survivre dans des milieux à forte concentration saline. Elles maintiennent l'équilibre osmotiques en accumulant des solutés compatibles, tels que des glycine-bétaïne ou des prolines, et possèdent des protéines et enzymes stables en milieu salin **(Echigo et al., 2007)**. La première espèce halophile décrite dans le genre *Bacillus* est l'espèce *Bacillus halophilus* **(Ventosa et al., 1989)**, elle est capable de se développer sur un intervalle de concentration saline allant de 3 jusqu'à 30% (p/v) avec un optimum de croissance à 15% de sel (p/v). Cette espèce a le pouvoir également de produire une nucléase extracellulaire halophile avec des activités RNase et DNase **(Berkeley et al., 2002)**.

Certaines espèces tolèrent des milieux fortement acides (pH < 3) ou fortement alcalins (pH > 9). Elles adaptent leur métabolisme en modifiant la composition de leur membrane, régulant le transport des protons et utilisant des systèmes de tamponnage intracellulaire pour préserver un pH cytoplasmique compatible avec la vie. D'autres espèces prospèrent dans des environnements soumis à de fortes pressions hydrostatiques, telles que les fonds marins profonds. Elles adaptent leur structure membranaire et leurs enzymes pour fonctionner efficacement malgré la pression mécanique élevée **(Bargiela et al., 2023 ; Mucsi et al., 2024)**.

Comme exemple d'espèce poly-extrémophiles du genre *Bacillus* nous citons : l'espèce *Bacillus infernus* appelée aussi «le bacille de l'enfer", a été isolé à partir des profondeurs d'environ 2700m en dessous de la surface de la terre, ce microorganisme est baptisé thermophile (60 ° C), halotolérant (concentrations de sel 0,6 M) et légèrement alcalophiles (pH 7,8) **(Boone et al., 1995)**.

### **3. Métabolites antimicrobiens produits par *Bacillus***

Les espèces du genre *Bacillus* sont rapportées dans la littérature pour leurs potentialités d'applications biotechnologiques très étendues (Mondol *et al.*, 2013). Elles produisent des enzymes actives à des conditions extrêmes (Nabti *et al.*, 2013), des composés antimicrobiens et anticancéreux, et des biosurfactants (Donio *et al.*, 2013; Couto *et al.*, 2015), elles stimulent la croissance végétale par leur caractère PGPR (Plant growth promoting Rhizobacteria) et fertilisent les sols par leur capacité de fixer l'azote et solubiliser le phosphate.

Depuis l'âge d'or de la découverte de ces molécules, le genre *Bacillus* a été connu comme une source importante d'antibiotiques. La plupart des antibiotiques produits par les espèces du genre *Bacillus* sont des composés polypeptidiques de poids moléculaire faible synthétisés soit par voie ribosomale ou par voie enzymatique non ribosomale (Stein, 2005).

#### **3. 1. Peptides ribosomaux**

Ces peptides sont synthétisés par voie ribosomale et élaborés durant la phase active de la croissance, ils comprennent les lantibiotiques tels que la nisine et la subtiline (Stein, 2005).

La subtiline, synthétisée par *Bacillus subtilis*, est un lantibiotique reconnu pour son efficacité contre les bactéries Gram-positives telles que *Staphylococcus aureus*. Ce peptide agit principalement en inhibant la synthèse du peptidoglycane, composant essentiel de la paroi bactérienne, entraînant ainsi la lyse cellulaire des micro-organismes sensibles. Cette action ciblée fait de la subtiline un agent bactéricide puissant, particulièrement utile dans la lutte contre les infections dues aux bactéries Gram positives (Ongena et Jacques, 2008).

Un autre peptide ribosomal notable est l'entérocoïne, produite par certaines souches de *Bacillus cereus*. Ce peptide exerce son activité antimicrobienne contre les bactéries Gram-négatives, notamment les entérobactéries pathogènes. Son mécanisme implique une modification de la perméabilité membranaire, ce qui provoque la fuite du contenu intracellulaire et conduit à la mort bactérienne (Meena et Kanwar, 2015).

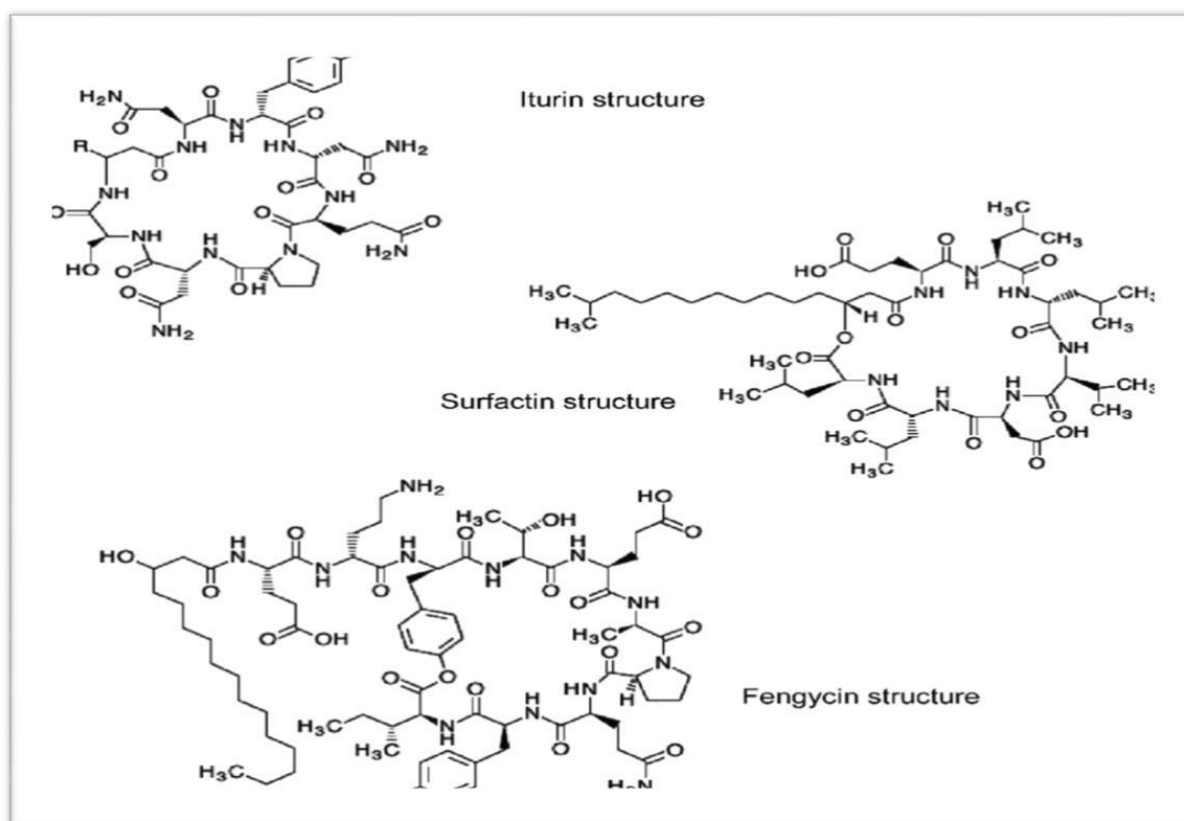
#### **3. 2. Peptides non ribosomaux (NRPS)**

Les peptides non ribosomaux produits via des Non Ribosomal Peptides Synthétases (NRPS) sont synthétisés après la cessation de la croissance bactérienne et durant la sporulation (Stoica *et al.*, 2019) comme exemples les bacillomycines et la mycosubtiline qui possèdent des activités hémolytique et antifongique (Stein, 2005).

Ces molécules se distinguent par leur structure cyclique souvent liée à une chaîne lipidique, conférant à ces lipopeptides une large activité antimicrobienne. *Bacillus subtilis* et *Bacillus amyloliquefaciens* sont connus pour produire l'iturine, un lipopeptide dont l'activité

antifongique est particulièrement prononcée contre des champignons phytopathogènes tels que *Fusarium spp.* et *Botrytis cinerea*. L'iturine agit en perturbant la perméabilité membranaire des cellules fongiques, provoquant une lyse rapide (Awais *et al.*, 2007). La fengycine, également synthétisée par *Bacillus subtilis*, cible principalement les champignons pathogènes, notamment *Candida albicans*. Son mode d'action repose sur la déstabilisation de la membrane cellulaire fongique, induisant ainsi une rupture de l'intégrité membranaire et la mort cellulaire (Meena & Kanwar, 2015). La surfactine, produite par plusieurs souches telles que *Bacillus subtilis* et *Bacillus pumilus*, est un lipopeptide biosurfactant possédant une activité antimicrobienne étendue, incluant des bactéries Gram-positives et Gram-négatives. Sa capacité à perturber les membranes cellulaires lui confère également des propriétés antivirales et antibiofilms, faisant de la surfactine un métabolite multifonctionnel d'intérêt biotechnologique majeur (Awais *et al.*, 2007).

La figure N° 1 ci-dessous illustre les structures chimiques spécifiques des lipopeptides iturine, surfactine et fengycine, mettant en évidence leur structure cyclique et leur chaîne lipidique caractéristique.



**Figure N° 1 :** Structures chimiques des peptides antimicrobiens :iturine , Surfactine ,Fengycine (Mongkolthanaruk, 2012).

### 3. 3. Antibiotiques non peptidiques

Outre les peptides, *Bacillus subtilis* produit la difficidine, un polykétide antibiotique à large spectre. Ce composé exerce une activité antibactérienne notable contre diverses bactéries Gram-positives et Gram-négatives, agissant principalement en inhibant la synthèse protéique bactérienne, ce qui conduit à l'arrêt de la croissance microbienne et à la mort cellulaire (Syed *et al.*, 2009).

Certaines souches de *Bacillus subtilis* émettent des composés organiques volatils (COV), incluant alcools, cétones et esters, capables d'inhiber à distance la croissance de champignons phytopathogènes tels que *Alternaria alternata*. Ces composés volatils représentent une stratégie antimicrobienne innovante, permettant une action sans contact direct, utile notamment dans la protection des cultures agricoles (Ajilogba et Babalola, 2019).

### 3. 4. Autres métabolites antimicrobiens

La bacitracine, l'un des métabolites antimicrobiens majeurs du genre *Bacillus*, est principalement synthétisée par *Bacillus subtilis*, cette molécule polypeptidique agit en inhibant la synthèse des peptidoglycanes, composants essentiels de la paroi bactérienne. Efficace contre un large spectre de bactéries Gram-positives, la bacitracine est largement utilisée dans les secteurs vétérinaire et industriel pour ses propriétés antimicrobiennes (Elshikh *et al.*, 2020).

En parallèle, certaines espèces de *Bacillus* sécrètent des enzymes antimicrobiennes telles que les lysozymes, qui clivent les liaisons glycosidiques de la paroi bactérienne, ainsi que des protéases capables de dégrader les protéines structurales ou toxines des agents pathogènes. Ces enzymes contribuent de manière directe ou indirecte à l'effet antimicrobien et participent également à la modulation des communautés microbiennes (Sarafin *et al.*, 2014). Outre les peptides et les enzymes, les *Bacillus* produisent également une diversité de métabolites secondaires, incluant des composés volatils organiques, des polykétides et d'autres molécules aux structures chimiques complexes. Ces métabolites sont associés à des activités antimicrobiennes, antitumorales et immunomodulatrices, ce qui élargit considérablement le spectre fonctionnel des produits issus de ce genre bactérien (Chen *et al.*, 2010).

## 4. Applications et perspectives biotechnologiques des *Bacillus* et leurs métabolites

Les espèces du genre *Bacillus* et leurs métabolites (extraits) sont utilisés dans divers domaines :

- Inhibiteur de la croissance des bactéries pathogènes, notamment des souches résistantes aux antibiotiques classiques (ex *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline SARM) (Varsha *et al.*, 2015).

- Immunomodulateur : qui stimulent la réponse immunitaire en activant les macrophages et en augmentant la production de cytokines, renforçant ainsi la défense de l'hôte contre infections. Ils sont utilisés dans le développement de probiotiques thérapeutiques pour améliorer la santé immunitaire (**Buenger et Driller, 2004**).
- Probiotiques : dont ils sont incorporés dans des formulations probiotiques pour restaurer l'équilibre du microbiote intestinal, réduire les troubles gastrointestinaux et améliorer la digestion (**Zhang et al., 2009**).
- Agents anticancéreux potentiels : Certains métabolites extraits de *Bacillus* ont montré une activité cytotoxique contre des cellules tumorales, ouvrant la voie à leur utilisation dans la recherche pharmaceutique anticancéreux (**Varsha et al., 2015**).
- Détoxification et bioremédiation : les extraits de *Bacillus* sont utilisés dans la détoxification des toxines environnementales, contribuant ainsi à limiter l'exposition humaine à des polluants nocifs (**Sharma et al., 2022**).
- Bioconversion et fermentation alimentaire : Les enzymes extraites de *Bacillus* (protéases, amylases, lipases) sont employées dans la transformation des matières premières pour améliorer la texture, la saveur et la digestibilité des aliments fermentés (**Aljohny, 2015**).
- Production de probiotiques pour la santé intestinale : Certains extraits de *Bacillus* sont incorporés dans des compléments alimentaires probiotiques visant à améliorer la flore intestinale et à renforcer la santé digestive (**Pinchuk et al., 2021**). Leur résistance aux conditions gastriques permet une meilleure survie dans le tractus digestif.
- Amélioration de la sécurité alimentaire par dégradation des mycotoxines dans les céréales et autres matières premières alimentaires, réduisant ainsi les risques pour la santé (**Singh et Jha, 2016**).
- **Agents de biocontrôle dans l'agriculture alimentaire** : Les extraits antimicrobiens de *Bacillus* sont utilisés comme bio-pesticides pour contrôler les pathogènes agricoles, réduisant ainsi la contamination des aliments dès la production primaire (**Chen et al., 2010**).
- **Dégradation des déchets industriels** : Certains extraits de *Bacillus* sont employés dans le traitement biologique des déchets industriels (agroalimentaires, textiles, chimiques), facilitant la dégradation des composés toxiques et la réduction des impacts environnementaux (**Patel and Gupta, 2020**).

## *Synthèse bibliographique*

- Production de biofertilisants et promotion de la croissance végétale : Les métabolites issus du *Bacillus* jouent un rôle crucial dans l'agriculture durable en favorisant la disponibilité des nutriments, notamment grâce à la solubilisation des phosphates et à la production d'hormones végétales, tout en renforçant la résistance des plantes aux stress abiotiques (**Singh et Jha, 2016**).

# *Matériel et Méthodes*

L'ensemble de ce travail a été réalisé au niveau du Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, au Biomédical et à l'Environnement (**L.A.M.A.A.B.E.**) de l'université Abou Bekr Belkaid (Tlemcen). Il porte sur **la comparaison de procédés d'extraction des activités antimicrobiennes produites par une souche poly-extrêmophile du genre *Bacillus* nommée LMB3073 et issue de la grande sebkhah d'Oran**. Ce travail s'inscrit dans la continuité de l'étude de Master portant sur l'optimisation de la production d'agents antimicrobiens par la souche LMB3073 réalisé par les étudiantes **Latati Hadil Aya et Mahmoudi Djihane (Latati et Mahmoudi, 2025)**.

### **1. Origine de la souche et conditions de culture**

La souche étudiée LMB3073 a été isolée en 2014 par Dr. NAS. Son isolement a été effectué sur Gélose Nutritive à 10% de NaCl à une température d'incubation de 37°C.

Sa conservation a été effectuée à -20°C sur Bouillon Nutritif à 10% de NaCl (p/v) additionné de 25 % de glycérol (v/v). Le séquençage du gène ARNr 16S a confirmé son affiliation au genre *Bacillus* (**Nas et al., 2021**).

### **2. Revivification et vérification de la pureté de la souche LMB3073**

Afin de réaliser nos expériences, la souche LMB3073 a été préalablement revivifiée sur Gélose Nutritive contenant 10 % de NaCl jusqu'à l'apparition d'un trouble. Sa pureté a été vérifiée par des repiquages successifs sur le même milieu.

La souche pure a été conservée à nouveau 4°C sur Gélose Nutritive inclinée supplémentée de 10 % de NaCl (p/v), et à -20°C sur Bouillon Nutritif contenant 10% de NaCl (p/v) et 25% (v/v) de glycérol.

### **3. Criblage des activités antimicrobiennes de la souche LMB3073**

La production des activités antimicrobiennes a été étudiée à la fois sur milieu gélosé (Solid State Fermentation SSF) et sur milieu liquide (Submerged fermentation SmF) vis-à-vis neuf germes de référence (**Tableau N° 1**).

**Tableau N° 1 : les germes tests utilisés**

<b>Espèces</b>	<b>Référence</b>	
<b>Bactéries à Gram positif</b>	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 11778
	<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633
	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
	<i>Micrococcus luteus</i>	ATCC 15307
<b>Bactéries à Gram négatif</b>	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
	<i>Klebsiella pneumonia</i>	ATCC 70603
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853
<b>Levures</b>	<i>Candida albicans</i>	IP444
	<i>Candida albicans</i>	ATCC 26790

### **3. 1. Standardisation des inocula des souches de référence**

Les suspensions microbiennes des germes test ont été standardisées conformément aux recommandations du CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute).

Pour les bactéries, les suspensions mères ont été préparées dans de l'eau physiologique stérilisée, à partir des cultures de 24 heures à 37 °C sur gélose Müller-Hinton. La densité optique de chaque suspension a été ajustée entre 0,08 et 0,1 à la longueur d'onde  $\lambda = 600$  nm (l'équivalent de 0.5 McFarland standard ou de  $1 \times 10^8$  à  $2 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>) (CLSI M02-A12, 2015).

La préparation des inocula levuriens a été réalisée à partir des cultures de 24 heures à 35 °C sur milieu Sabouraud en suivant les recommandations du document CLSI M44-A2 (2009). La densité optique de chaque inoculum a été ajustée entre 0,11 et 0,14 à la longueur d'onde  $\lambda = 530$  nm (l'équivalent de 0.5 McFarland standard ou  $1 \times 10^6$  à  $5 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>) (Rodríguez-Tudela *et al.*, 2001).

### **3. 2. Production des antimicrobiens sur milieu gélosé**

L'évaluation de la production des activités antimicrobiennes sur milieu gélosé a été réalisée par la technique des cylindres d'agar (Balouiri *et al.*, 2016). Cette méthode consiste à ensemencher notre isolat en stries serrées, de façon à obtenir un tapis, sur Gélose Nutritive additionnée de 10 % de NaCl et enrichi indépendamment avec les différents composés :

- Sources de carbone : **glucose à 1%, glycérol à 1%, Tween 80 à 0,5%.**
- Sources d'azote : **acide glutamique à 0.1%, extrait de levure à 0,2%.**
- Source de phosphore : **KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> à 0,2%.**

**Remarque :** Ces sources et leurs concentrations ont été sélectionnées sur la base des résultats obtenus de l'optimisation de la production sur milieu **gélifié**, dans le travail de **Latati et Mahmoudi (Latati et Mahmoudi, 2025)**.

Après 5 jours d'incubation à 37°C, des cylindres d'agar d'environ de 6 mm de diamètre ont été prélevés et déposés sur des boîtes de pétri contenant la gélosés Muller-Hinton préalablementensemencés par les suspensions des germes test, en utilisant la technique d'écouvillonnage.

Des cylindres d'agar prélevés à partir de la Gélose Nutritive à 10 % de NaCl nonensemencée ont été utilisés comme témoins.

Les boîtes de pétri ont été placées pendant deux heures à 4°C pour permettre la diffusion des substances antimicrobiennes. Les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés après 24 heures d'incubation à 37°C.

### **3. 3. Production des métabolites antimicrobiens sur milieu liquide**

Pour cette étude, deux à trois colonies de 24 heures à 37°C sur Gélose Nutritive supplémentée de 10% de NaCl, ont été inoculées dans 5 mL de Bouillon Nutritif à 10% de NaCl. Après 24 heures d'incubation à 37°C sous agitation (180 rpm), ces pré-cultures ont été introduites stérilement dans des flacons de 250 mL contenant 100 mL de Bouillon Nutritif à 10% de NaCl enrichi avec les mêmes composés cités ci-dessus.

- Sources de carbone : **glucose à 10%, glycérol à 10%, Tween 80 à 0,5%.**
- Sources d'azote : **extrait de levure à 0,2%.**
- Source de phosphore : **KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> à 2%.**

**Remarque :** Ces sources et leurs concentrations ont été sélectionnées sur la base des résultats obtenus de l'optimisation de la production sur milieu **liquide**, dans le travail de **Latati et Mahmoudi (Latati et Mahmoudi, 2025)**.

Après 5 jours d'incubation à 37°C sous agitation (180 rpm), chaque culture a été centrifugée à 10000 t/min pendant 30 minutes et les surnageants ont été récupérés et testés pour leur pouvoir antimicrobien par la technique des puits (**Balouiri et al., 2016**).

Sur la gélose Muller-Hinton préalablementensemencée par les germes tests, des puits de 6 mm de diamètre ont été perforés aseptiquement en utilisant l'extrémité plate des pipettes pasteur stériles, ensuite, un volume de 50 µL de surnageant y a été introduit. Des puits contrôles, ont reçues 50 µL de Bouillon Nutritif à 10 % de NaCl.

Les boîtes de pétri sont placées pendant deux heures à 4°C, puis incubées à 37°C. Les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés après 24 heures d'incubation.

#### **4. L'extraction des métabolites antimicrobiens de l'isolat LMB3073**

L'extraction a été effectuée à partir des surnageants et des cultures sur milieu gélosé préparés précédemment. Trois solvants de polarité différentes ont été utilisés ; l'eau distillée, le méthanol et l'acétate d'éthyle.

L'extraction à partir du milieu gélosé a été effectuée selon le protocole de **Kim et al. (2016)**. Les cultures ont été soigneusement raclées, puis les géloses ont été découpées et placées dans les différents solvants, à raison de deux boîtes pour 50 mL de chaque solvant.

Les mélanges gélose-solvant ont subi une agitation pendant deux heures à 45°C, puis une filtration en utilisant le papier filtre. Les phases organiques ont été ensuite évaporées à 45 °C. Les résidus secs ont été récupérés dans 1 mL du même solvant de l'extraction et utilisé pour les tests d'activité antimicrobienne.

L'extraction à partir des surnageants a été réalisée selon le protocole de **Rahman et al. (2017)**. Chaque solvant a été utilisé dans un rapport volumique de 1:1 (v/v) avec les surnageants. Les mélanges ont été soumis à une agitation pendant 2 heures à 45°C, puis laissés décanter dans une burette jusqu'à une séparation complète des phases aqueuse et organique.

Les phases organiques ont été soigneusement récupérées puis évaporées à 45 °C. Les résidus secs ont été solubilisés dans 1 mL du même solvant d'extraction.

#### **5. Evaluation du pouvoir antimicrobien des différents extraits obtenus**

Les extraits obtenus avec les solvants organiques ont été testés pour leur activité antimicrobienne par la méthode des puits vis-à-vis les mêmes germes testés précédemment.

Des puits de 6 mm ont été creusés sur des boîtes contenant la gélose Muller-Hinton, puis 50 µL de chaque extrait ont été introduits. Des puits contenant des solvants purs ont été utilisés comme contrôles négatifs.

Les boîtes ont été placées à 4 °C pendant 2 heures, puis incubées à 37 °C pendant 24 heures. L'efficacité antimicrobienne a été déterminée par mesure du diamètre des zones d'inhibition autour des puits.

# *Résultats et Discussion*

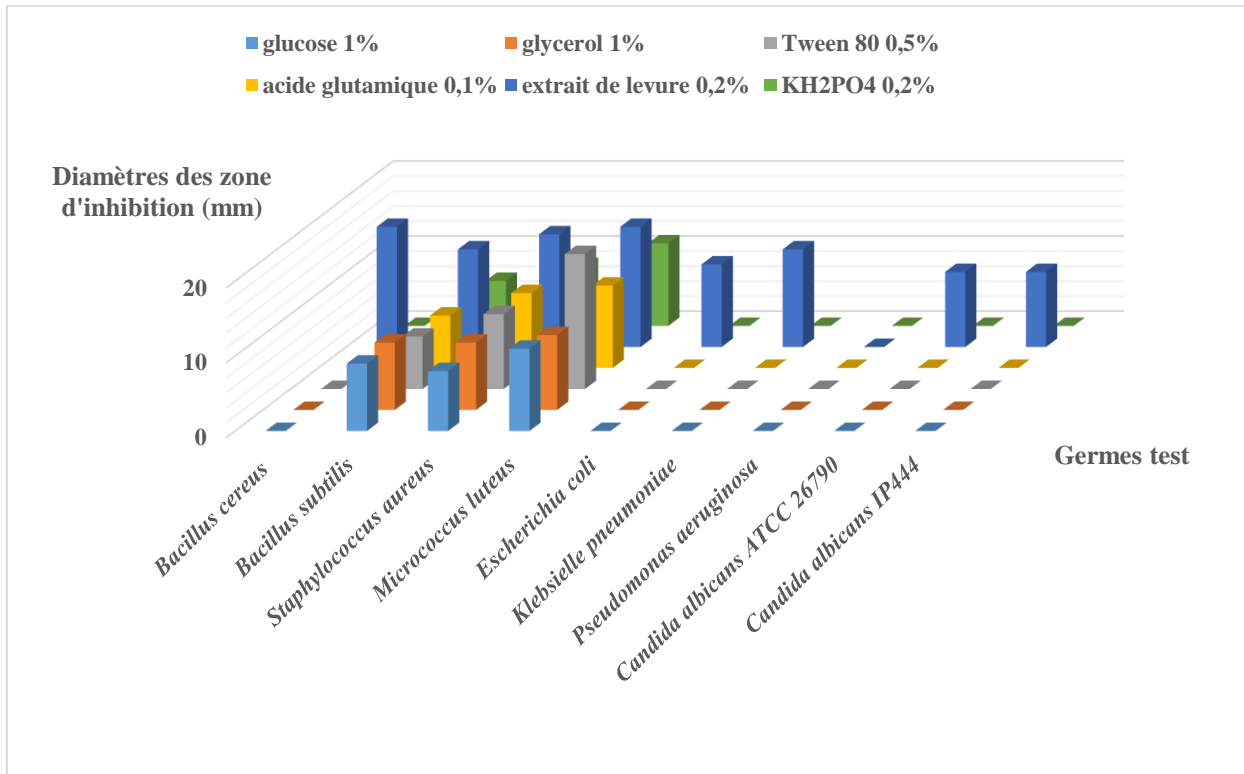
**1. Résultats**

**1. 1. Criblage des activités antimicrobiennes de la souche LMB3073 sur milieu gélosé GN à 10% de NaCl à différentes sources nutritionnelles**

Après la revivification et la vérification de la pureté de l'isolat LMB3073, son potentiel de production d'activités antimicrobiennes a été évalué à l'encontre de neuf germes de référence. Cette évaluation a été réalisée en utilisant la technique des cylindres d'agar, après cinq jours d'incubation à 37°C. La culture de la souche a été effectuée sur Gélose Nutritive à 10% de NaCl (p/v) supplémentée avec différentes sources nutritives : le glucose à 1%, le glycérol à 1% et le Tween 80 à 0,5% comme sources de carbone, l'acide glutamique à 0.1% et l'extrait de levure à 0,2%, comme sources d'azote, et le KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> à 0,2% comme source de phosphore. Les résultats obtenus sont montrés dans le **tableau N°2** et la **figure N° 2**:

**Tableau N° 2:** Diamètres des zones d'inhibition en millimètre (mm) obtenus par la technique des cylindres d'agar.

Sources nutritives	Source de carbone			Source d'azote		Source de phosphore
	glucose à 1%	glycérol à 1%	Tween 80 à 0,5%	l'acide glutamique à 0.1%	l'extrait de levure à 0,2%,	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> à 0,2%
<b>Les germes tests</b>						
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-	16	-
<i>Bacillus subtilis</i>	9	9	7	10	13	6
<i>Staphylococcus aureus</i>	8	9	10	7	15	8
<i>Micrococcus luteus</i>	11	10	18	11	16	11
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	11	-
<i>Klebsielle pneumoniae</i>	-	-	-	-	13	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Candida albicans ATCC 26790</i>	-	-	-	-	10	-
<i>Candida albicans IP444</i>	-	-	-	-	10	-



**Figure N° 2:** histogramme présentant les résultats des activités antimicrobiennes de la souche LMB3073 obtenus par fermentation sur milieu gélosé GN à 10 de NaCl à différentes sources nutritives.

D'après le **tableau N° 2** et la **figure N° 2** il ressort que :

- L'expression de l'activité antimicrobienne de cette souche est influencée par la nature des sources de carbone, d'azote et de phosphore incorporées au milieu de culture.
- La souche LMB3073 présente un spectre d'action principalement dirigé contre les bactéries à Gram positif (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* et *Micrococcus luteus*) avec une variabilité des activités liée à la nature des substrats disponibles.
- L'utilisation de différentes sources de carbone (glucose, glycérol, Tween 80) montre une production d'activité modeste à modérée contre *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus*, avec des diamètres de zones d'inhibition variant de 7 à 10 mm. une activité notable a été exprimée contre *Micrococcus luteus* (zones de 10 à 18 mm). Aucune activité à l'encontre de bactéries à Gram négatif ou antifongique n'a été enregistrée.
- L'ajout de l'extrait de levure comme sources d'azote a amélioré considérablement les activités antimicrobiennes, notamment contre *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* et *Micrococcus luteus*, avec des zones d'inhibition atteignant jusqu'à 16 mm. Il a stimulé

également les activités inhibitrices de *Bacillus cereus*, *Eschirechia coli* et *Klebsielle pneumonia* et les activités antifongique à l'encontre des deux levures utilisées

- L'ajout de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  à 0,2% en tant que source de phosphore révèle une activité modérée contre la plupart des germes à Gram positif testés, tandis que l'activité contre les bacilles à Gram négatif et les levures reste toujours absente.
- Aucune activité inhibitrice n'a été enregistrée contre *Pseudomonas aeruginosa*

L'analyse comparative des diamètres des zones d'inhibition indique que l'extrait de levure constitue la meilleure source nutritive qui favorise la production d'activités antimicrobiennes accrues.

### **1. 2. Criblage des activités antimicrobiennes de la souche LMB3073 sur milieu liquide BN à 10% de NaCl à différentes sources nutritionnelles**

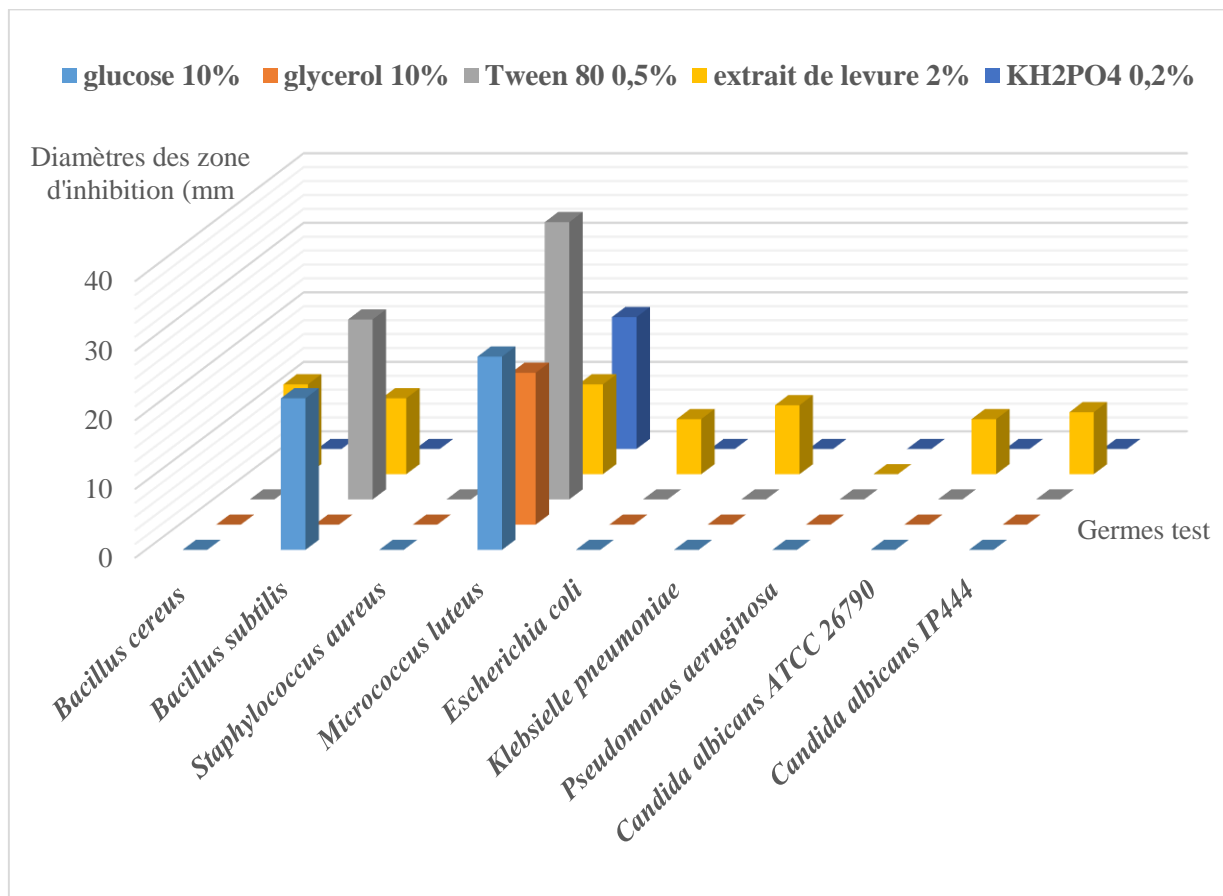
La production des activités antimicrobiennes par notre isolat a été recherchée également sur milieu liquide BN à 10% de NaCl enrichi par différentes concentrations de sources nutritives qui sont : le glucose à 10%, le glycérol à 10% et le Tween 80 à 0,5% comme source de carbone, l'extrait de levure à 0,2%, comme source d'azote, et le  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  à 2% comme source de phosphore vis-à-vis les mêmes germes testés précédemment.

Ces concentrations ont été choisies sur la base des résultats obtenus par **Latati et Mahmoudi (2025)**.

Après cinq jours d'incubation sous agitation (180rpm) à 37°C, les surnageants ont été préparés et évalués pour leur pouvoir antimicrobien par la technique des puits. Les résultats obtenus sont illustrés dans le **tableau N° 3** et la **figure N° 3**:

**Tableau N°3 :** Diamètres des zones d'inhibition en millimètre (mm) obtenus par la technique des puits.

Sources nutritives	Source de carbone			Source d'azote	Source de phosphore
	glucose à 10%	glycérol à 10%	Tween 80 à 0,5%	l'extrait de levure à 0,2%,	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> à 2%
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	13	-
<i>Bacillus subtilis</i>	22	-	-	11	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	.	-	-	12	-
<i>Micrococcus luteus</i>	28	22	18	13	19
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	8	-
<i>Klebsielle pneumoniae</i>	-	-	-	10	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-
<i>Candida albicans ATCC 26790</i>	-	-	-	8	-
<i>Candida albicans IP444</i>	-	-	-	9	-



**Figure N° 3:** histogramme présentant les résultats des activités antimicrobiennes de la souche LMB3073 obtenus par fermentation sur milieu liquide BN à 10% NaCl à différentes sources nutritives.

D'après le **tableau N° 3** et la **figure N° 3** il ressort que

- L'ajout de l'extrait de levure comme sources d'azote a permis la stimulation de la production des activités antimicrobiennes sur bouillon nutritif à 10% de NaCl, vis-à-vis tous les germes testés à l'exception de *Pseudomonas aeruginosa*.
- Pour la source de carbone utilisées, l'ajout du glucose à 10% a donné les meilleurs diamètres des zones d'inhibition à l'encontre de *Micrococcus luteus* (28 mm) et *Bacillus subtilis* (22 mm).
- Le glycérol (10%), le Tween 80 (0.5%) et le  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (2%) favorise la production des activités antimicrobiennes exclusives contre *Micrococcus luteus* avec des diamètres des zones d'inhibition de 22, 18 et 19 mm respectivement.

### **1. 3. Comparaison approfondie de l'efficacité et la rentabilité des activités antimicrobiennes produites par la souche LMB3073 en milieu solide (GN) et en milieu liquide (BN)**

Le **tableau N° 4** résume les différentes conditions expérimentales mises en œuvre pour évaluer la production de métabolites antimicrobiens par l'isolat LMB3073. En s'appuyant sur ce tableau ainsi que sur les **tableaux N° 2** et **N° 3** précédents, il devient possible d'établir une comparaison rigoureuse de l'ensemble des données obtenues, permettant ainsi d'identifier précisément les conditions de culture optimales favorisant une production significative d'activités antimicrobiennes, tant en termes de rendement que d'ampleur du spectre d'action.

**Tableau N° 4 : Comparaison des Conditions Expérimentales**

<b>Paramètres</b>	<b>Milieu solide (GN à 10% NaCl)</b>	<b>Milieu liquide (BN à 10% NaCl)</b>
<b>Technique d'évaluation</b>	Technique des cylindres d'agar	Technique des puits
<b>Sources carbonées</b>	Glucose (1%), Glycérol (1%), Tween 80 (0,5%)	Glucose (10%), Glycérol (10%), Tween 80 (0,5%)
<b>Sources azotées</b>	Acide glutamique (0,1%), Extrait de levure (0,2%)	Extrait de levure (0,2%)
<b>Source phosphorée</b>	$\text{KH}_2\text{PO}_4$ (0,2%)	$\text{KH}_2\text{PO}_4$ (2%)
<b>Durée/Température</b>	5 jours à 37°C (sans agitation)	5 jours à 37°C (sous agitation à 180 rpm)

D'après les tableaux, on constate que :

- Le milieu liquide BN à 10% de NaCl, avec des concentrations élevées en glucose (10%) et en  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (2%), a montré une performance supérieure contre *Micrococcus luteus* (28 mm) et *Bacillus subtilis* (22 mm) avec glucose à 10%, et une zone d'inhibition de 19 mm contre *Micrococcus luteus* avec une concentration de 2% de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .
- L'ajout de l'extrait de levure à 0.2% a favorisé la production des antimicrobiens agissant contre les bactéries à Gram négatif dans les deux milieux, avec des diamètres plus importants obtenus à partir du milieu solide.
- L'extrait de levure a induit également la production des antifongiques contre les *Candida albicans* dans les deux milieux, mais avec une activité modeste (8 à 10 mm).
- L'ajout du Tween 80 à 0.5% dans le milieu liquide a induit la production des antimicrobiens spécifique seulement au *Micrococcus luteus*, cependant, son ajout au milieu solide a favorisé la production des antimicrobien vis-à-vis *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* et *Micrococcus luteus*.

En conclusion de cette partie, nous avons constaté que les conditions qui donnent des zones d'inhibition élevées traduisent une activité puissante, sont souvent dirigée vers un spectre d'action plus restreint, tandis que des zones plus modestes peuvent refléter un spectre d'activité plus large. Par conséquent, il est judicieux d'envisager l'extraction des métabolites produits dans toutes ces conditions, afin d'obtenir à la fois des composés à forte activité spécifique et des composés à spectre d'action étendu. Cette stratégie permettrait d'exploiter pleinement le potentiel bioactif de la souche LMB3073.

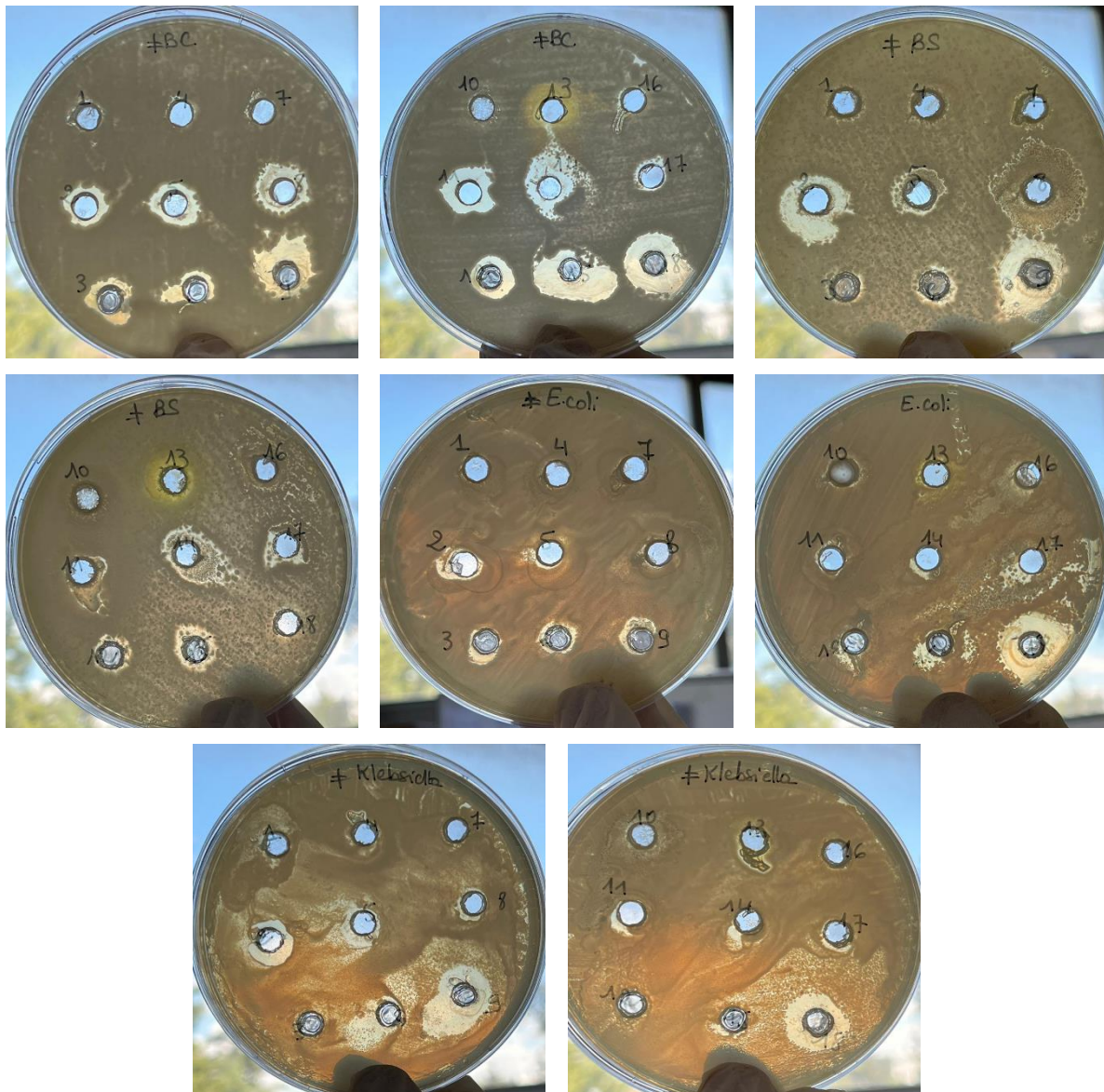
#### 1. 4. L'extraction des métabolites antimicrobiens et évaluation de l'activité des extraits

L'extraction des métabolites antimicrobiens produits par la souche LMB3073 a été réalisée à partir d'une culture sur milieu Gélose Nutritive à 10% de NaCl et Bouillon Nutritif à 10% de NaCl supplémentés par Glucose (1%), Glycérol (1%), Tween 80 (0,5%),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,2%) et Acide glutamique (0,1%).

Quant au milieu liquide, l'extraction a été effectuée seulement à partir de la culture de la souche LMB3073 sur Bouillon Nutritif à 10% de NaCl supplémenté par une concentration de 0,5% de Tween 80, dans le but de comparer les résultats d'extraction à partir du milieu liquide et solide.

Trois solvants de polarité différente ont été utilisés : l'eau distillée, l'éthanol et l'acétate d'éthyle. Le pouvoir antimicrobien de tous les extraits obtenus a été testé à l'aide de la méthode des disques en papier.

Les résultats sont illustrés dans la **figure N° 4** et les diamètres des zones d'inhibition obtenus sont représentés dans le **tableau N° 5**.



**Figure N° 4 :** photos des résultats de l'activité antimicrobienne, vis-à-vis quelques germes test, des extraits obtenus à partir de milieu solide (puits de 1 à 15) et à partir du milieu liquide (puits de 16 à 18)

1 : ED KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 : éthanol KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3 : Acétate d'éthyle KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4 : ED glycérol, 5 : éthanol glycérol, 6 : Acétate d'éthyle glycérol, 7 : ED Tween 80, 8 : éthanol Tween 80, 9 : Acétate d'éthyle Tween 80, 10 : ED Glucose, 11 : éthanol Glucose, 12 : Acétate d'éthyle Glucose, 13 : ED Acide glutamique, 14 : éthanol Acide glutamique, 15 : Acétate d'éthyle Acide glutamique, 16 : ED Tween 80, 17 : éthanol Tween 80, 18 : Acétate d'éthyle Tween 80.

**Tableau 5 :** Diamètres des zones d'inhibition des différents extraits obtenus à partir du milieu solide et liquide.

Milieu de culture	Source additionnée	Extrait	<i>B. c</i>	<i>B. s</i>	<i>S. a</i>	<i>M. l</i>	<i>E. c</i>	<i>K. p</i>	<i>P. a</i>	<i>C. a</i> 26790	<i>C. a</i> 444
<b>GN 10% NaCl</b>	Glu 1%	E.D	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Ethano	13	-	8	11	-	-	-	-	-
		Ac Eth	11	8	10	12	-	-	10	-	-
	Gly 1%	E.D	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Ethano	12	10	12	12	8	10	8	-	-
		Ac Eth	9	9	14	13	9	15	9	-	-
	Ac glu 0,1%	E.D	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Ethano	13	13	19	14	-	-	-	-	-
		Ac Eth	13	11	21	16	-	-	-	-	-
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.2%	E.D	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Ethano	10	15	8	11	10	11	7	-	-
		Ac Eth	12	10	12	13	8	10	8	-	-
	T80 0,5%	E.D	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Ethano	13	14	15	<b>20</b>	-	8	8	-	-
		Ac Eth	15	<b>22</b>	<b>21</b>	<b>22</b>	11	<b>20</b>	13	-	-
<b>BN 10% NaCl</b>	T80 0,5%	E.D	-	-	-	18	-	-	-	-	-
		Ethano	7	10	-	22	-	-	-	-	-
		Ac Eth	<b>17</b>	-	-	-	16	16	13	-	-

*Bc* : *Bacillus cereus*, *Bs* : *Bacillus subtilis*, *Sa* : *Staphylococcus aureus*, *MI* : *Micrococcus luteus*, *Ec* : *Escherichia coli*, *Kp* : *Klebsiella pneumoniae*, *Pa* : *Pseudomonas aeruginosa*, *Ca* : *Candida albicans*,

D'après les résultats obtenus, il apparaît que

- L'acétate d'éthyle s'est révélé être le solvant le plus performant pour l'extraction des métabolites produits par l'isolat LMB3073, ce qui suggère une nature apolaire de ces composés.
- L'éthanol, présentant une polarité intermédiaire, a également permis une extraction significative, bien que moins efficace que l'acétate d'éthyle, confirmant ainsi le caractère majoritairement hydrophobe des métabolites.
- L'eau distillée n'a pas permis d'extraire de composés actifs, ce qui renforce l'hypothèse d'une nature non polaire des métabolites antimicrobiens produits par la souche LMB3073.
- Aucune activité antifongique n'a été détectée contre les levures testées, ce qui indique une spécificité antibactérienne des métabolites extraits
- La meilleure extraction a été obtenue à partir d'un milieu gélosé enrichi en Tween 80 (0,5%), suggérant que ce composé favorise soit la production, soit la libération des composés antimicrobiens apolaires

## **2. Discussion**

L'objectif principale de cette étude est de faire une comparaison entre différentes méthodes d'extraction, mises en œuvre à partir des milieux différents et en utilisant des solvants organiques de polarités différentes, en vue d'extraire les molécules antimicrobiennes produites par la souche LMB3073, une bactérie polyextrémophile isolée d'un habitat hypersalin algérien, la grande Sebkhah d'Oran,

Dans une première étape, un screening des activités antimicrobiennes a été effectué en cultivant la souche sur milieu gélosé (Gélose nutritive à 10% de NaCl) et milieu liquide (Bouillon Nutritif à 10% NaCl).

Le choix de la concentration de 10% de NaCl repose sur le fait que cette concentration constitue l'optimum de la croissance de l'isolat LMB3073 et sur la base des résultats obtenus dans le travail de Master de **Latati et Mahmoudi (2025)** qui ont trouvé que la production maximale d'activités antimicrobiennes est obtenue à cette concentration.

La production des métabolites antimicrobiens a été réalisée en cultivant l'isolat LMB3073 sur milieu solide (solid state fermentation) et sur milieu liquide (submerged fermentation). Ce test a été réalisé car plusieurs études ont montré l'impact significatif de la consistance du milieu de culture (solide ou bouillon) sur la production et la diffusion des métabolites antimicrobiens produits par les microorganismes.

Les résultats du criblage primaire de la production des métabolites antimicrobiens par notre isolat ont révélé que la production des activités antimicrobiennes par l'isolat LMB3073 est plus rentable par rapport au milieu liquide. Des résultats similaires ont été rapportés par **Hosny et al. (2011)** avec une souche de *Bacillus licheniformis* NRC-18 isolée de la mer Méditerranée, qui produisait des composés antimicrobiens uniquement en milieu solide, ce phénomène étant attribué à une faible diffusion des métabolites en milieu liquide.

De manière générale, la fermentation en milieu solide convient particulièrement aux microorganismes aérobies nécessitant peu d'activité en eau ; l'oxygène est directement accessible, les besoins énergétiques sont réduits, ce qui favorise une production accrue et plus rapide de métabolites secondaires (**Al-Ansari et al., 2019**).

Dans une étude comparative utilisant la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS), **Kibret et al. (2018)** ont mis en évidence de nouveaux métabolites secondaires dans les extraits de *Streptomyces* spp cultivés sur milieu solide, alors que ces composés étaient absents des cultures en milieu liquide.

Certains métabolites secondaires ne peuvent être synthétisés que par fermentation sur milieu solide et ne sont pas produits en fermentation liquide quelle que soit l'importance de la croissance microbienne dans le milieu liquide. Un autre exemple notable est la conioïcétine, un antibiotique actif contre diverses bactéries et champignons, y compris *Staphylococcus aureus* multirésistant. Cette molécule est produite par l'ascomycète *Coniochaeta ellipsoidea* uniquement lors de fermentations en milieu solide, tandis que ce champignon, bien qu'ayant une croissance satisfaisante en milieu liquide, n'y synthétise pas cet antibiotique (**Kumar et al., 2020**).

Les germes tests utilisés pour la recherche de la production des activités antimicrobiennes par l'isolat LMB3073 ont été sélectionnés selon une approche systématique visant à couvrir un spectre représentatif de microorganismes. Particulièrement les espèces *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* appartiennent au groupe **ESKAPE** (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterobacter* spp.), un ensemble de pathogènes prioritaires identifiés par l'OMS en raison de leur implication croissante dans les infections nosocomiales et leur capacité à développer des résistances multifactorielles. Elles ont été largement utilisées dans diverses études portant sur l'exploration de composés bioactifs d'origine microbienne (**Aouiche et al., 2014; Corral et al., 2019 ; Anteneh et al., 2021; Saibi et al., 2022**).

Les méthodes employées pour le screening primaire sont la technique des cylindres d'agar et la technique des puits, ce sont des méthodes de diffusion en milieu gélosé. Elles sont fortement recommandées pour mettre en évidence l'antagonisme entre les microorganismes (**Balouiri et al., 2016 ; Botta et al., 2020; Anteneh et al., 2021; Nas et al., 2021**). Outre leur simplicité, elles permettent de tester l'activité de plusieurs isolats ou extraits vis-à-vis du même germe test sur une même boîte de Pétri en un temps court.

La souche présente un spectre d'activité dirigé essentiellement contre les bactéries à Gram positif, notamment *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* et *Micrococcus luteus*. Cela peut être dû à la nature des parois des bactéries test. La paroi des bactéries à Gram positif est constituée d'une couche épaisse de peptidoglycane ce qui les rend vulnérables aux composés antimicrobiens. Par contre, la membrane externe chez les bactéries à Gram négatif limite la pénétration des métabolites. De nombreuses études antérieures ont montré que les activités antimicrobiennes produites par les espèces du genre *Bacillus* sont généralement plus actives contre les bactéries à Gram positif. Cette spécificité serait due au fait que ces bactéries produisent majoritairement des peptides antimicrobiens ciblant particulièrement les bactéries à Gram positif (**Syed et al., 2009; Chen et al., 2010**).

L'incorporation de diverses sources nutritives, à des concentrations différentes, dans le milieu de la production, a révélé une influence significative sur l'expression du pouvoir antimicrobien de notre isolat, en modulant soit positivement la production soit en la réprimant. Ce qui confirme l'importance de l'optimisation des conditions nutritionnelles dans l'induction du métabolisme secondaires chez les bactéries du genre *Bacillus* (**Zhang et al., 2024**).

Les recherches menées par **Gesheva** et ses collaborateurs (**2005**) ont démontré que la nature des sources nutritives telles que le carbone, l'azote, le phosphore, le potassium, le magnésium et les oligo-éléments influence de manière notable la biosynthèse des composés bioactifs chez *Streptomyces hygroscopicus* (**Gesheva et al., 2005**). De même, **Awais et al. (2007)** ont rapporté des résultats similaires pour la production d'activités antimicrobiennes par *Bacillus subtilis*. Ainsi, il est essentiel d'optimiser les paramètres physico-chimiques et la composition du milieu de culture afin de maximiser la synthèse de biomolécules. Il est toutefois important de noter que les conditions optimales pour la production d'agents antimicrobiens ne coïncident pas nécessairement avec celles favorisant la croissance cellulaire.

L'extraction des métabolites produits par l'isolat LMB3073 a été effectuée en utilisant trois solvants de polarité différente à savoir l'eau distillée, l'éthanol et l'acétate d'éthyle. L'acétate d'éthyle et l'éthanol se sont avérés être de bons solvants pour extraire les composés antimicrobiens synthétisés par cette souche. Ils permettent l'extraction à la fois des composés

## ***Résultats et Discussion***

antibactériens actifs vis-à-vis les bactéries à Gram positif et à Gram négatif. L'eau distillée semble être le solvant le moins efficace, avec peu ou pas d'activité. Cela pourrait suggérer que les métabolites antimicrobiens produits par la souche possèdent un caractère hydrophobe et sont peu solubles dans l'eau distillée, ce qui explique également le non efficacité de certains surnageants. Ces observations soulignent l'importance du choix du solvant et de la composition du milieu de culture pour l'extraction efficace des métabolites antibactériens.

*Conclusion*

*et*

*Perspectives*

## *Conclusion et Perspectives*

L'objectif principal de ce travail était, d'une part, d'évaluer la production des activités antimicrobiennes d'une souche poly-extrêmophile LMB3073, isolée de la grande Sebkh d'Oran, en fonction de différentes conditions de salinité, de type de milieu de culture et de diverses sources nutritives et d'autre part d'extraire les molécules produites pour chaque paramètre expérimental.

Dans un premier temps la production a été recherchés sur milieu solide (GN à 10%) de NaCl, et sur milieu liquide (BN 10% de NaCl). Les résultats ont révélées qu'une meilleure production a été obtenue à partir de la culture de l'isolat sur GN à 10 de NaCl.

L'extraction a été effectuée, à l'aide d'une batterie de solvants de polarité différente (eau distillée, éthanol et acétate d'éthyle), à partir de milieu solide à 10% de NaCl supplémentée indépendamment avec 1% de glucose, 1% de glycérol et 0,5% de tween 80, comme source de carbone ; l'acide glutamique à 0,1% comme source d'azote, et le  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  à 0.2% comme source de phosphore.

Les résultats ont montré que l'acétate d'éthyle constitue le meilleur solvant permettant l'extraction des métabolites agissant vis-à-vis les bactéries à Gram positif et à Gram négatif, que ce soit à partir du milieu solide ou liquide, suivie par l'éthanol.

Egalement pour les sources nutritives, leur utilisation a montré une influence notable sur la qualité et la quantité des métabolites produits par l'isolat LMB3073. Il en ressort à partir des résultats que le Tween 80 à 0,5% a exercé un effet stimulateur du pouvoir antimicrobien de la souche.

Les résultats acquis au cours de cette étude, nous incite à

- Tester le pouvoir antimicrobien de l'isolat vis-à-vis d'autres germes d'intérêt médical.
- Optimiser les conditions de production en utilisant d'autres paramètres physicochimiques (pH, Températures), nutritives ou des substrats à faible cout comme les déchets industriels.

Combiner plusieurs paramètre ensemble ou utiliser d'autres approches comme la co-culture sur milieu liquide.

- Essayer d'autres solvants organiques avec des polarités différente pour l'extraction des activités antimicrobiens.

- Faire une purification et une caractérisation des extraits par le biais des techniques de chimie analytique tels que la chromatographie en phase gazeuse ou liquide couplée à la spectroscopie de masse.

Tester d'autres applications biotechnologiques de ces extraits comme les activités insecticides, antivirales et anticancéreuses.

*Références*  
*bibliographiques*

1. **Aissaoui, N., Mahjoubi, M., Nas, F., Mghirbi, O., Arab, M., Souissi, Y., Hoceini, A., Masmoudi, A. S., Mosbah, A., Cherif, A., & Klouche-Khelil, N. (2018).** Antibacterial potential of 2,4-Di-tert Butylphenol and Calixarene-based prodrugs from thermophilic *Bacillus licheniformis* isolated in algerian hot spring. *Geomicrobiology Journal*. 1-10. <https://doi.org/10.1080/01490451.2018.1503377>
2. **Ajilogba, C. F., & Babalola, O. O. (2019).** GC-MS analysis of volatile organic compounds from Bambara groundnut rhizobacteria and their antibacterial properties. *World journal of microbiology & biotechnology*, 35 (6), 83. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2660-7>.
3. **Al-Ansari, M., Alkubaisi, N., Vijayaragavan, P., & Murugan, K. (2019).** Antimicrobial potential of *Streptomyces* sp. to the Gram positive and Gram negative pathogens. *Journal of infection and public health*, 12 (6), 861–866. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2019.05.016>.
4. **Aljohny, B. O. (2015).** Halophilic Bacterium - A Review of New Studies. *Biosciences Biotechnology Research Asia*,. 12 (3), 2061-2069. <http://dx.doi.org/10.13005/bbra/1874>.
5. **Anteneh, Y. S., Yang, Q., Brown, M. H., & Franco, C. M. M. (2021).** Antimicrobial Activities of Marine Sponge-Associated Bacteria. *Microorganisms*, 9(1), 171. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010171>
6. **Aouiche, A., Bijani, C., Zitouni, A., Mathieu, F., & Sabaou, N. (2014).** Antimicrobial activity of saquayamycins produced by *Streptomyces* spp. PAL114 isolated from a Saharan soil. *Journal de mycologie medicale*, 24(2), e17–e23. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2013.09.001>.
7. **Arab, M., Bakour, S., Lalaoui, R., Aissaoui, N., Nas, F., Hoceini, A., Fournier P. E, Klouche-Khelil, N. (2018).** Diversity of aerobic *Bacilli* analysis using molecular and culture-based approaches in debagh hot spring. *Geomicrobiology Journal*, 1–11. <https://doi.org/10.1080/01490451.2018.152093>.
8. **Ash, C., Priest, F. G., & Collins, M. D. (1993).** Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. Proposal for the creation of a new genus *Paenibacillus*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 64 (3-4), 253–260. <https://doi.org/10.1007/BF00873085>.
9. **Awais M., Aamer A. S., Abdul H. and Fariha H. (2007).** Isolation, identification and optimization of bacitracin produced by *bacillus* sp. *Pak. J. Bot.*, 39(4): 1303-1312.

10. **Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. K. (2016).** Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of pharmaceutical analysis*, 6(2), 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>.
11. **Bargiela, R., Korzhenkov, A. A., McIntosh, O. A., Toshchakov, S. V., Yakimov, M. M., Golyshin, P. N., & Golyshina, O. V. (2023).** Evolutionary patterns of archaea predominant in acidic environment. *Environmental microbiome*, 18(1), 61. <https://doi.org/10.1186/s40793-023-00518-5>.
12. **Berkeley, R., Heyndrickx, M., Logan, N., & De Vos, P. (2002).** Applications and Systematics of *Bacillus* and Relatives. © Blackwell Science Ltd.
13. **Boone D. R., Liu Y. T., Zhao Z. J., Balkwill D. L., Drake G. R., Stevens T. O. and Aldrich H. C. 1995.** *Bacillus infernus* sp. nov., an Fe(III)-reducing and Mn(IV)-reducing anaerobe from the deep terrestrial subsurface. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45: 441 - 448.
14. **Botta, L., Saladino, R., Barghini, P., Fenice, M., & Pasqualetti, M. (2020).** Production and identification of two antifungal terpenoids from the *Posidonia oceanica* epiphytic Ascomycota *Mariannaea humicola* IG100. *Microbial cell factories*, 19(1), 184. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01445-7>
15. **Chen, L., Wang, G., Bu, T., Zhang, Y., Wang, Y., Liu, M., & Lin, X. (2010).** Phylogenetic analysis and screening of antimicrobial and cytotoxic activities of moderately halophilic bacteria isolated from the Weihai Solar Saltern (China). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(5), 879–888. <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0247-4>.
16. **Chen, L., Wang, G., Bu, T., Zhang, Y., Wang, Y., Liu, M., & Lin, X. (2010).** Phylogenetic analysis and screening of antimicrobial and cytotoxic activities of moderately halophilic bacteria isolated from the Weihai Solar Saltern (China). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(5), 879–888. <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0247-4>.
17. **CLSI M02-A12. (2015).** Performance Standards for antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standards - Twelfth Edition. CLSI Document M02-A12. Wayne, PA, Clinical and Laboratory Standards Institute.
18. **CLSI M44-A2. (2009).** Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Guideline-Second Edition. CLSI Document M44-A2. Wayne, PA, Clinical and Laboratory Standards Institute.

## Références bibliographiques

19. Corral, P., Amoozegar, M. A., & Ventosa, A. (2019). Halophiles and Their Biomolecules: Recent Advances and Future Applications in Biomedicine. *Marine drugs*, 18(1), 33. <https://doi.org/10.3390/md18010033>.
20. Couto, C. R. de A., Alvarez, V. M., Marques, J. M., Jurelevicius, D. A., & Seldin, L. (2015). Exploiting the aerobic endospore-forming bacterial diversity in saline and hypersaline environments for biosurfactant production. *BMC Microbiology*, 15(1), 240. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0575-5>.
21. De Vos, P., Garrity, G.M., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.H. & Whitman, W.B. (2009). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The Firmicutes. 2nd ed (Vol. 3). USA : Springer.
22. Donio, M. B., Ronica, S. F., Viji, V. T., Velmurugan, S., Jenifer, J. A., Michaelbabu, M., & Citarasu, T. (2013). Isolation and characterization of halophilic *Bacillus* sp. BS3 able to produce pharmacologically important biosurfactants. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, 6 (11), 876–883. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(13\)60156-X](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(13)60156-X).
23. Echigo, A., Fukushima, T., Mizuki, T., Kamekura, M., & Usami, R. (2007). *Halalkalibacillus halophilus* gen. nov., sp. nov., a novel moderately halophilic and alkaliphilic bacterium isolated from a non-saline soil sample in Japan. *International Journal of systematic and evolutionary microbiology*, 57(Pt 5), 1081–1085. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64830-0>.
24. Edbeib, M. F., Wahab, R. A., & Huyop, F. (2016). Halophiles: biology, adaptation, and their role in decontamination of hypersaline environments. *World journal of microbiology & biotechnology*, 32(8), 135. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2081-9>
25. Elshikh, M., Ahmed, S., Funston, S., Dunlop, P., McGaw, M., Marchant, R., & Banat, I. M. (2020). Bacitracin, an effective antimicrobial peptide: mode of action and potential applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(15), 6695–6706. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10645-7>
26. Fritze D. 2004. Taxonomy of the Genus *Bacillus* and Related Genera: The Aerobic Endospore-Forming Bacteria, *Phytopathology*. 94 (1), 1245-1248.
27. Gaur, A. (2015). Isolation and Characterization of Halotolerant *Bacillus* sp. with extra Cellular A-Amylase production Potential from Sambhar salt lake, India; *International Research Journal of Environment Sciences*. 4(6), 7-10.

28. **Gesheva V., Ivanova V., Gesheva R. 2005.** Effects of nutrients on the production of AK-111-81 macrolide antibiotic by *Streptomyces hygroscopicus*. *Microbiol. Res.*, 160: 243-248
29. **Horikoshi K. (2008).** Past, present and future of extremophiles. *Extremophiles : life under extreme conditions*, 12(1), 1–2. <https://doi.org/10.1007/s00792-007-0127-5>
30. **Horikoshi, K. and Bull, A.T., 2011.** Prologue: Definition, categories, distribution, origin and evolution, pioneering studies, and emerging fields of extremophiles. In: *Extremophiles handbook*. Tokyo: Springer. pp. 3-15.
31. **Hosny, M.S., Sheir, D.H. & Eldewany, A.I. (2011).** Production of antimicrobial agent from marine bacteria isolated from Mediterranean. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 5 (5), 121-128.
32. **Karnwal, A., Shrivastava, S., Al-Tawaha, A. R. M. S., Kumar, G., Singh, R., Kumar, A., Mohan, A., Yogita, & Malik, T. (2023).** Microbial Biosurfactant as an Alternate to Chemical Surfactants for Application in Cosmetics Industries in Personal and Skin Care Products: *A Critical Review*. *BioMed research international*, 2023, 2375223. <https://doi.org/10.1155/2023/2375223>.
33. **Kibret, M., Guerrero-Garzón, J. F., Urban, E., Zehl, M., Wronski, V. K., Rückert, C., Busche, T., Kalinowski, J., Rollinger, J. M., Abate, D., & Zotchev, S. B. (2018).** *Streptomyces* spp. From Ethiopia Producing Antimicrobial Compounds: Characterization via Bioassays, Genome Analyses, and Mass Spectrometry. *Frontiers in microbiology*, 9, 1270. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01270>.
34. **Kim, H. Y, Heo, D. Y., Park, H. M., Singh, D., & Lee, C. H. (2016).** Metabolomic and Transcriptomic Comparison of Solid-State and Submerged Fermentation of *Penicillium expansum* KACC 40815. *PLoS ONE*, 11(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149012>.
35. **Klouche Khelil, N., Aissaoui, N., Nas, F., Cayol, J. L., & Ghellai L. (2013).** A novel halotolerant bacterium isolated from El Goléa Lake in Algeria and antimicrobial potential of this strain. *Journal of Agricultural Science and Technology A*. 3: 825-834.
36. **Kumar, A., Singh, R. P., & Singh, R. (2020).** Soil pH management for sustainable agriculture. In *Soil Acidity and Plant Growth* (pp. 63–84). Singapore: Springer. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-0969-4\\_4](https://doi.org/10.1007/978-981-15-0969-4_4).
37. **MacElroy, R. D. (1974).** Some comments on the evolution of extremophiles. *Biosystems*, 6(1),74-75.
38. **Maughan, H., & Van der Auwera, G. (2011).** *Bacillus* taxonomy in the genomic era finds phenotypes to be essential though often misleading. *Infection, genetics and evolution*:

- Journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 11(5), 789–797. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.02.001>.
39. **Meena, K. R., & Kanwar, S. S. (2015).** Lipopeptides as the antifungal and antibacterial agents: applications in food safety and therapeutics. *BioMed Research International*, 2015, Article ID 473050. <https://doi.org/10.1155/2015/473050>
40. **Mesbah, N. M., Cook, G. M., & Wiegel, J. (2009).** The halophilic alkalithermophile *Natranaerobius thermophilus* adapts to multiple environmental extremes using a large repertoire of Na(K)/H antiporters. *Molecular microbiology*, 74(2), 270–281. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06845.x>.
41. **Mondol, M. A. M., Shin, H. J., & Islam, M. T. (2013).** Diversity of secondary metabolites from marine *Bacillus* species: chemistry and biological activity. *Marine Drugs*, 11(8), 2846–2872. <http://doi.org/10.3390/md11082846>.
42. **Mongkolthanaruk W. (2012).** Classification of *Bacillus* beneficial substances related to plants, humans and animals. *Journal of microbiology and biotechnology*, 22(12), 1597–1604. <https://doi.org/10.4014/jmb.1204.04013>
43. **Mucsi, M., Borsodi, A. K., Megyes, M., & Szili-Kovács, T. (2024).** Response of the metabolic activity and taxonomic composition of bacterial communities to mosaically varying soil salinity and alkalinity. *Scientific reports*, 14(1), 7460. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-57430-2>.
44. **Nabti, E. H., Mokrane, N., Ghoul, M., Manyani, H., Dary, M., & Megias, M. G. (2013).** Isolation and Characterization of Two Halophilic *Bacillus* (*B. licheniformis* and *Bacillus sp*) with Antifungal Activity. *Journal of Ecology of Health & Environment*, 1(1), 13–17. <http://dx.doi.org/10.12785/jehe/010102>.
45. **Nas, F., Aissaoui, N., Mahjoubi, M., Mosbah, A., Arab, M., Abdelwahed, S., & Klouche-Khelil, N. (2021).** A comparative GC-MS analysis of bioactive secondary metabolites produced by halotolerant *Bacillus* spp. isolated from the Great Sebkhia of Oran. *International Microbiology*, 24(3), 455–470. <https://doi.org/10.1007/s10123-021-00185-x>.
46. **Nazina, T. N., Tourova, T. P., Poltarus, A. B., Novikova, E. V., Grigoryan, A. A., Ivanova, A. E., Lysenko, A. M., Petrunyaka, V. V., Osipov, G. A., Belyaev, S. S., & Ivanov, M. V. (2001).** Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenuatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus*

- thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. th.* *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 51(2), 433–446.  
<https://doi.org/10.1099/00207713-51-2-433>.
47. Ongena, M., & Jacques, P. (2008). Bacillus lipopeptides: versatile weapons for plant diseasebiocontrol. *Trends in Microbiology*, 16(3), 115–125.  
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.12.009>
48. Patel, S., & Gupta, R. S. (2020). A phylogenomic and comparative genomic framework for resolving the polyphyly of the genus *Bacillus*: Proposal for six new genera of *Bacillus* species, *Peribacillus* gen. nov., *Cytobacillus* gen. nov., *Mesobacillus* gen. nov., *Neobacillus* gen. nov., *Metabacillus* gen. nov. and *Alkalihalobacillus* gen. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 70(1), 406–438.  
<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003775>.
49. Pinchuk, I.V., Bressollier, P., Verneuil, B., Fenet, B., Sorokulova, I.B., Graud, F. and Urdaci, M.C., 2001. In Vitro Anti-*Helicobacter pylori* Activity of the Probiotic Strain *Bacillus subtilis* 3 is Due to Secretion of Antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(11), 3156–3161.
50. Rahman, S. S., Siddique, R., & Tabassum, N. (2017). Isolation and identification of halotolerant soil bacteria from coastal Patenga area. *BMC research notes*, 10 (1), 531.  
<https://doi.org/10.1186/s13104-017-2855-7>.
51. Rampelotto, P. H. (2013). Polyextremophiles: life under multiple forms of stress. *International Journal of Astrobiology*, 12(1), 56–65.
52. Rodríguez-Tudela, J. L., Cuenca-Estrella, M., Díaz-Guerra, T. M., & Mellado, E. (2001). Standardization of antifungal susceptibility variables for a semiautomated methodology. *Journal of clinical microbiology*, 39 (7), 2513–2517.  
<https://doi.org/10.1128/JCM.39.7.2513-2517.2001>.
53. Roohi, A., Ahmed, I., Khalid, N., Iqbal, M., & Jamil, M. (2014). Isolation and phylogenetic identification of halotolerant/halophilic bacteria from the salt mines of Karak, Pakistan. *International Journal of Agriculture and Biology*, 16: 564–570.
54. Saibi, A. N. E., Nas, F., Arab, M., Aissaoui, N., Boukeroui, Y., & Klouche-Khelil, N. (2022). Antimicrobial and Enzymatic Profiling of Halophilic and Halotolerant Bacteria from a Hypersaline Lake The Great Sebkh of Oran, Northwestern Algeria, *Geomicrobiology Journal*, 39 (9), 816–831.  
<https://doi.org/10.1080/01490451.2022.2079777>.

55. Salwan, R., & Sharma, V. (2020). Overview of extremophiles. Physiological and Biotechnological Aspects of Extremophiles. 3-11. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818322-9.00001-0>.
56. Sarafin, Y., Donio, M. B., Velmurugan, S., Michaelbabu, M., & Citarasu, T. (2014). *Kocuria marina* BS-15 a biosurfactant producing halophilic bacteria isolated from solar salt works in India. *Saudi journal of biological sciences*, 21(6), 511–519. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.01.001>.
57. Satyanarayana, T., Raghukumar, C. and Shivaji, S., 2005. Extremophilic microbes: Diversity and perspectives. *Current Science*, 1(89), 78-90.
58. Sharma, R., Soni, S.K., Vohra, R.M., Gupta, L.K. and Gupta, J.K., (2002). Purification and characterisation of a thermostable alkaline lipase from a new thermophilic *Bacillus sp.* RSJ-1. *Process Biochemistry*, 37(10), 1075-1084.
59. Singh, R. P., Jha, P. N. (2016). A halotolerant bacterium *Bacillus licheniformis* HSW-16 augments induced systemic tolerance to salt stress in wheat plant (*Triticum aestivum*). *Front Plant Sci* 7: 1890. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01890>.
60. Stein, T. (2005). *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular microbiology*, 56 (4), 845–857. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04587.x>.
61. Stoica, R. M., Moscovici, M., Tomulescu, C., Cășărică, A., Băbeanu, N., Popa, O., & Kahraman, H. I. A. (2019). Antimicrobial compounds of the genus *Bacillus*: a review. *Romanian Biotechnological Letters*. 24 (6), 1111-1119. <https://doi.org/10.25083/rbl/24.6/1111.1119>.
62. Syed, A. M., Safia, A., & Abdul H. (2009). Report: antibiotic production by thermophilic *Bacillus* specie SAT-4. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*, 22(3), 339–345.
63. Thakur, N., Singh, S. P., & Zhang, C. (2022). Microorganisms under extreme environments and their applications. *Current research in microbial sciences*, 3, 100141. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2022.100141>.
64. Usami, R., Echigo, A., Fukushima, T., Mizuki, T., Yoshida, Y., & Kamekura, M. (2007). *Alkalibacillus silvisoli* sp. nov., an alkaliphilic moderate halophile isolated from non-saline forest soil in Japan. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 57(4), 770–774. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64713-0>.
65. Varsha, K. K., Devendra, L., Shilpa, G., Priya, S., Pandey, A., & Nampoothiri, K. M. (2015). 2,4-Di-tert-butyl phenol as the antifungal, antioxidant bioactive purified from a

## *Références bibliographiques*

- newly isolated *Lactococcus* sp. *International journal of food microbiology*, 211, 44–50.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.06.025>.
- 66. Ventosa A., Garcia M. T., Kamekura M., Onishi H. and Ruiz- Berraquero F. (1989).** *Bacillus halophilus* sp. nov., a moderately halophilic *Bacillus* species. *Systematic Applied Microbiology*, 12: 162–165.
- 67. Wainwright, M., 2003.** A microbiologist looks at panspermia. *Astrophysics and Space Science*, 2(285), 563-570.
- 68. Zhang, P., Yin, Y., & Wen, J. (2024).** *Fermentation optimization and metabolomic analysis of a Bacillus subtilis co-culture system for fengycin production from mixed sugars.* **Biochemical Engineering Journal**, **209**, 109406.  
<https://doi.org/10.1016/j.bej.2024.109406>

# *Annexe*

## Composition des milieux de culture et solutions

### **Gélose nutritive**

Peptone .....	15g
Extrait de viande .....	10g
Extrait de levure .....	02g
Chlorure de sodium .....	10g
Agar .....	20g
Eau distillée.....	1000mL

pH =6,8-7,4

### **Bouillon Nutritif**

Peptone .....	20.0g
Extrait de levure .....	5,0 g
Chlorure de sodium .....	10 g
Eau distillée .....	1000mL

pH = 7,2 ± 0,2.

## ملخص

يتناول هذا البحث دراسة سلالة متعددة المقاومة للظروف البيئية القاسية من نوع *Bacillus* LMB3073، المعزولة من السبخة الكبرى بوهران، بهدف تقييم قدرتها على إنتاج أنشطة مضادة للميكروبات ومقارنة كفاءة استخلاص نواتجها الثانوية.

تمت زراعة السلالة على أوساط صلبة وسائلة تحتوي على 10% من كلوريد الصوديوم (NaCl)، ومدعمة بمصادر مختلفة من الكربون (الغلوكوز، الغليسول، Tween 80)، والنيتروجين (مستخلص الخميرة، حمض الغلوتاميك)، والفوسفور ( $KH_2PO_4$ ). تم اختبار الأنشطة المضادة للميكروبات ضد تسعة كائنات مرجعية، شملت بكتيريا موجبة وسالبة الغرام بالإضافة إلى الخمائر، باستخدام تقنيتي الأسطوانة على الأجار والأبار. أجريت عملية استخلاص النواتج الأيضية باستخدام الماء المقطر، الإيثانول، وأسيتيت الإيثيل.

وقد أظهرت النتائج أن أسيتيت الإيثيل كان الأكثر فعالية في استخلاص المركبات النشطة، حيث وفر مناطق تثبيط كبيرة ضد *Bacillus subtilis*، *Staphylococcus aureus* و *Micrococcus luteus*. بينما أظهر الإيثانول فعالية متوسطة، ولم يُظهر الماء المقطر أي نشاط يُذكر. كما تبين أن الوسط الصلب المدعم بـ 0.5% من Tween 80 ساهم في تعزيز إنتاج أنشطة مضادة للميكروبات قوية. وقد تركزت هذه الأنشطة بشكل رئيسي ضد البكتيريا موجبة الغرام، مع فعالية ضعيفة تجاه البكتيريا سالبة الغرام والخمائر.

تؤكد هذه النتائج الإمكانيات البيوتكنولوجية للسلالة LMB3073، وتبرز أهمية ظروف الزراعة واختيار المذيب المناسب من أجل تحسين إنتاج واستخلاص المركبات المضادة للميكروبات.

**الكلمات المفتاحية:** *Bacillus*، الأنشطة المضادة للميكروبات، الاستخلاص، المذيبات، المصادر الغذائية.

## Abstract

This work focuses on the study of the poly-extremophilic strain *Bacillus* LMB3073, isolated from the Great Sebkhah of Oran, with the aim of evaluating its production of antimicrobial activities and comparing the efficiency of metabolite extraction methods.

The strain was cultivated on solid and liquid media containing 10% NaCl, supplemented with various carbon sources (glucose, glycerol, Tween 80), nitrogen sources (yeast extract, glutamic acid), and a phosphorus source ( $KH_2PO_4$ ). Antimicrobial activities were assessed against nine reference microorganisms, including Gram-positive and Gram-negative bacteria, as well as yeasts, using agar plug and well diffusion techniques. Metabolites were extracted using distilled water, ethanol, and ethyl acetate. The results showed that ethyl acetate provided the most effective extraction, yielding significant inhibition zones against *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, and *Micrococcus luteus*. Ethanol showed moderate effectiveness, whereas distilled water showed no activity. Solid medium enriched with 0.5% Tween 80 enhanced the production of strong antimicrobial activities. The observed activities were primarily directed against Gram-positive bacteria, with limited action against Gram-negative bacteria and yeasts.

These results confirm the biotechnological potential of strain LMB3073 and underscore the importance of culture conditions and solvent choice for optimizing the production and extraction of antimicrobial metabolites.

**Keywords:** *Bacillus*, antimicrobial activities, extraction, solvents, nutritional sources.

## Résumé

Ce mémoire porte sur l'étude d'une souche poly-extrémophile *Bacillus* LMB3073 isolée de la grande Sebkhah d'Oran, pour objectif d'évaluer sa production d'activités antimicrobiennes et de comparer l'efficacité d'extraction de ses métabolites.

La souche a été cultivée sur milieux solides et liquides contenant 10% de NaCl, supplémentés en différentes sources de carbone (glucose, glycérol, Tween 80), d'azote (extrait de levure, acide glutamique) et de phosphore ( $KH_2PO_4$ ). Les activités antimicrobiennes ont été testées contre neuf germes de référence, incluant des bactéries à Gram positif et Gram négatif ainsi que des levures, par les techniques des cylindres d'agar et des puits. L'extraction des métabolites a été réalisée avec l'eau distillée, et l'acétate d'éthyle.

Les résultats obtenus ont révélé que l'acétate d'éthyle a permis une extraction plus efficace des composés actifs, donnant des zones d'inhibition importantes contre *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* et *Micrococcus luteus*. L'éthanol a montré une efficacité intermédiaire, tandis que l'eau distillée n'a révélé aucune activité. Le milieu solide enrichi en Tween 80 à 0.5% a favorisé la production d'activités antimicrobiennes puissantes. Les activités observées étaient principalement dirigées contre les bactéries à Gram positif, avec une faible action contre les Gram négatif et les levures.

Ces résultats confirment le potentiel biotechnologique de la souche LMB3073 et soulignent l'importance des conditions de culture et du choix du solvant pour optimiser la production et l'extraction de métabolites antimicrobiens.

**Mots clés :** *Bacillus*, activités antimicrobiens, extraction, solvants, sources nutritives