



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^{elle} LATATI Hadil Aya

M^{elle} MAHMOUDI Djihene

En vue de l'obtention du diplôme de Master académique

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Microbiologie et Contrôle de Qualité

Thème

Optimisation de la production des activités antimicrobiennes 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 :

| | | |
|---------------------|---------------------------|--------------------------------------|
| Présidente | Dr. ZENATI Fatima | M.C.B. Université de Tlemcen-Algérie |
| Encadrante | Dr. NAS Fatima ep. RABEHI | M.C.B. Université de Tlemcen-Algérie |
| Examinatrice | Dr. MEBKHOUTI Samira | M.C.B. Université de Tlemcen-Algérie |
| Examinatrice | Dr. ZERHOUNI KHADIDJA | M.C.B. Université de Tlemcen-Algérie |

Année universitaire 2024-2025

Remerciement

Avant tout, nous remercions le bon dieu le tout puissant de mener à terme ce présent travail.

Mes vifs remerciements s'adressent tout d'abord aux membres de jury :

- ❖ **A Dr. ZENATI Fatima : Maitre de conférence B.** à l'université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen qui a accepté de présider ce jury, qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance
- ❖ **Au Dr. MEBKHOUTI Samira et Dr. ZERHOUNI KHADIDJA : Maitres de conférence B.** à l'université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen, qui ont accepté d'examiner ce travail, Nous sommes particulièrement honorée de bénéficier de vos remarques et nous tenons à vous assurer de notre profonde gratitude.

Nous tenons aussi à remercier notre encadrante **Mme NAS Fatima**, Maitre de Conférences B à l'université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen, de nous avoir encadrée, orientée et soutenue tout au long de ce travail. Recevez ici notre plus profonde reconnaissance pour la confiance que vous nous avez accordée, pour votre disponibilité et pour vos nombreux conseils judicieux.

Nous exprimons notre profonde gratitude à l'ensemble de nos enseignants du département de Biologie, au sein de la faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre et de l'univers.

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

Dédicace

Avant toute chose , je tiens a remercier Allah , source de toute sagesse et force , sans qui ce travail n'aurait pu voir le jour .

Avec tous mes sentiments de respect , avec l'expérience de ma reconnaissance , je dédie ma remise de diplôme et ma joie

A mon paradis , à la prunelle de mes yeux , à la force de ma joie et mon bonheur , ma lune et le fil d'espoir qui allumer mon chemin ,celle dont les prières ont protégé mes pas , ma moitié , ma mère NAIMA reposez votre cœur , votre rêve est devenu réalité , enfin votre fille est devenue diplômée comme que tu as tant imaginée et désirée.

A celui qui m'a fait une femme , ma source de vie , d'amour et d'affection , à mon support qui était toujours à mes cotés pour me soutenir et m'encourager , mon père MOHAMMED .

A mes chères sœurs ANFEL et RITADJ mes piliers , mes alliées de cœur , merci pour vos conseils , votre présence réconfortante , votre soutien constant et vos encouragements sincères tout au long de mes études .votre amour , vos sourires et votre tendresse ont illuminé mes journées et apaisé mes moments de doute .

A tous ceux qui me sont chers , ma famille , mes amies , aux personnes qui m'ont aidé et encouragé de près ou de loin , qui étaient toujours à mes cotés et m'ont accompagné mon chemin d'études .

A ma jolie professeure encadrant NAS FATIMA , je tiens à vous exprimer ma profonde gratitude pour votre accompagnement bienveillant , votre patience et vos précieux conseils tout au long de la réalisation de ce mémoire. Votre encadrement rigoureux et vos encouragements m'ont permis de progresser et de donner le meilleur de moi-même. merci pour votre disponibilité, votre écoute, et votre confiance .

Hadil Aya

Dédicace

Louange à Allah سبحانه وتعالى, Le seul qui n'abandonne jamais, Celui qui apaise, qui guide, qui éclaire. Que ce travail soit pour sa satisfaction, et qu'il m'ouvre des portes de baraka et de réussite.

- À mon cher papa **Ahmed**,

Toi qui as toujours été mon repère, ma force tranquille. Tes encouragements, ta patience et ta confiance ont été les piliers de mon parcours. Qu'Allah te récompense pour tout ce que tu fais pour moi.

- À ma douce maman **Fatima**,

Ton amour m'a portée, ta foi en moi m'a sauvée, et tes prières m'ont accompagnée à chaque étape. Qu'Allah te comble de sa miséricorde et te garde en bonne santé.

- À mon frère **Fayçal**, à mes sœurs **Zahira** et à **Djalel**,

Votre soutien et vos encouragements ont illuminé mes journées. Merci pour tout.

- À ma petite nièce **Riham**,

Ton innocence et ta joie de vivre m'ont apporté une force et une douceur inestimables, même dans les moments difficiles. Qu'Allah te protège.

- À ma sœur de cœur **Chaima**,

Ton écoute et ta présence m'ont enrichie plus que tu ne peux l'imaginer. Tu as été une vraie lumière sur mon parcours.

- À mes oncles et mes tantes **Fatna, Naima, Karima, Djamila, Nacira**, et mes cousines **Soundous, Sara, Souad, Meriem**,

Merci pour votre présence et vos mots de réconfort. Vous avez, chacune à votre manière, mis de la douceur dans mon chemin.

- À **Aya, Karima, Bouchra** et **Chaimaa**,

Merci pour votre amitié et les souvenirs partagés. Ce chemin a été plus doux grâce à vous.

- À la mémoire de **mon grand-père** et de **Sihem**,

Vous êtes partis, mais vous ne m'avez jamais quittée. Hbib, ton regard plein de bonté et tes prières m'accompagnent encore. Sihem, ton sourire, ta douceur, tes conseils... tout reste vivant dans mon cœur. Qu'Allah vous accorde sa miséricorde et vous accueille dans son vaste Paradis.

- À **Madame NAS Fatima**,

Merci pour votre accompagnement bienveillant, vos conseils précieux et votre disponibilité tout au long de ce travail.

- À toutes celles et ceux qui m'ont soutenue d'une manière ou d'une autre,

Merci du fond du cœur.

Djihane

Table des matières

ملخص

Abstract

Résumé

Liste des Abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

| | |
|---|----------|
| Introduction général..... | 1 |
| Synthèse bibliographique | |
| 1. Les microorganismes extrêmophiles..... | 3 |
| 1. 1. Définition | 3 |
| 1. 2. Classification des microorganismes extrêmophiles..... | 3 |
| 1. 2. 1. Les microorganismes halotolérants et halophiles | 3 |
| 1. 2. 2. Les microorganismes thermophiles et psychrophiles | 4 |
| 1. 2. 3. Les microorganismes acidophiles et alcalophiles | 5 |
| 2. Les stratégies d'adaptation des bactéries halophiles et halotolérants..... | 5 |
| 2. 1. L'adaptation par accumulation de solutés organiques (les osmoprotecteurs)..... | 5 |
| 2. 2. L'adaptation par accumulation de KCl | 5 |
| 3. Le genre <i>Bacillus</i> | 6 |
| 3.1. Taxonomie du genre <i>Bacillus</i> | 7 |
| 3. 2. Caractéristique microbiologique du genre <i>Bacillus</i>0..... | 7 |
| 3. 3. Niche écologique du genre <i>Bacillus</i> | 8 |
| 3. 4. Production de composés antimicrobiens par le genre <i>Bacillus</i> | 8 |
| 4. Méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne in vitro..... | 9 |
| 4. 1. La technique des cylindres d'agar (<i>Agar plug diffusion method</i>) | 10 |
| 4. 2. La technique des disques en papier (<i>agar disk diffusion method</i> ou <i>filter paper discs</i>) | 11 |
| 4. 3. Technique des puits (<i>Agar well diffusion methode</i>)..... | 11 |
| 4. 4. Méthode des stries croisées ou stries transversales (<i>Cross streak method</i>)..... | 12 |
| 4. 5. La méthode d'empoisonnement du milieu de culture (<i>Poisoned food method</i>)..... | 12 |
| Matériel et méthodes | |
| 1. Origine de la souche LMB3073..... | 12 |

| | |
|--|-----------|
| 2. Revivification et vérification de la pureté de souche | 14 |
| 3. Evaluation de l'activité antimicrobienne de l'isolat LMB3073 à différentes conditions..... | 14 |
| 3. 1. Standardisation des inocula des souches de référence..... | 14 |
| 3. 2. Effet de NaCl sur la production des métabolites antimicrobiens sur milieu gélosé... | 14 |
| 3. 3. Effet de NaCl sur la production des métabolites antimicrobiens sur milieu liquide... | 15 |
| 3. 3. 1. Préparation des surnageants de l'isolat LMB3073..... | 16 |
| 3. 3. 2. Evaluation de l'activité antimicrobienne des surnageants..... | 16 |
| 3. 4. Effet de différentes sources nutritives sur la production des activités antimicrobiennes..... | 16 |
| Résultats et discussion | |
| 1. Résultats..... | 18 |
| 1. 1. Effets de NaCl et de la consistance du milieu de culture (milieu gélosé et milieu liquide) sur la production des métabolites antimicrobiens par l'isolat halotolérant LMB3073..... | 18 |
| 1. 2. Effets de de différente source nutritive sur la production des métabolites antimicrobiens par l'isolat halotolérant LMB3073..... | 19 |
| 2. Discussion | 21 |
| Conclusion et perspectives..... | 24 |
| Références bibliographiques..... | 26 |
| Annexe..... | 33 |

ملخص

تمثل مقاومة المضادات الحيوية تحدياً عالمياً رئيسياً للصحة العامة، مما يجعل استكشاف الكائنات الحية الدقيقة المتطرفة مصدراً واعداً للمركبات الحيوية النشطة ذات الأهمية الكبيرة.

في هذا السياق، تهدف هذه الدراسة إلى تحسين إنتاج المستقلبات المضادة للميكروبات بواسطة سلالة بكتيرية LMB3073 المعزولة من سبخة وهران الكبرى (الجزائر). تتميز هذه السلالة بقدرتها على النمو في ظروف قاسية: تحمل الملوحة (0-20% كلوريد الصوديوم)، وتحمل الحرارة (15-60°م)، وتحمل القلوية (درجة حموضة 5-11).

كان الهدف الرئيسي تقييم تأثير معايير مختلفة للزراعة (الملوحة، قوام الوسط، ومصادر التغذية) على قدرة السلالة لإنتاج مركبات مضادة للميكروبات.

استخدم منهج بحثي يجمع بين الأساليب الميكروبيولوجية الكلاسيكية وتقنيات موحدة لتقييم النشاط المضاد للميكروبات. بعد إحياء السلالة من الحفظ في درجة حرارة 20°م، تم اختبار النشاط المضاد للميكروبات ضد تسعة كائنات دقيقة مستهدفة (4 بكتيريا إيجابية الغرام، 3 سلبية الغرام، وسلالتين من *Candida albicans*) باستخدام طريقتين متكاملتين: تقنية أسطوانات الأجار للكشف عن المستقلبات المنتجة على الأوساط الصلبة، وطريقة الأبار للكشف عن المستقلبات في الأوساط السائلة.

كشفت النتائج الرئيسية أن الإنتاج كان أعلى بشكل ملحوظ في وجود 10% كلوريد الصوديوم. سُجلت أكبر مناطق تثبيط ضد *Micrococcus luteus* و *Bacillus cereus* و *Staphylococcus aureus*. كانت الأوساط الصلبة أكثر ملاءمة من الأوساط السائلة، حيث أظهرت مناطق تثبيط أكبر باستمرار. من بين مصادر التغذية المُختبرة، أظهر مستخلص الخميرة (0.2%) والجليسرول (1%) أفضل ملفات تحفيزية، بينما أدت التركيزات العالية (10%) لبعض مصادر الكربون إلى تثبيط الإنتاج. أظهرت السلالة نشاطاً تفضيلاً ضد البكتيريا إيجابية الغرام.

تمثل هذه السلالة ومستقلباتها مرشحاً واعداً لتطبيقات بيوتكنولوجية متنوعة.

الكلمات المفتاحية : *Bacillus* ، نشاط مضاد للميكروبات، تحسين الإنتاج، مستقلبات ثانوية

Abstract

Antibiotic resistance represents a major global public health challenge, making the exploration of extremophilic microorganisms as sources of novel bioactive compounds of significant interest.

In this context, this study focuses on optimizing the production of antimicrobial metabolites by a polyextremophilic bacterial strain, *Bacillus* sp. LMB3073, isolated from the Great Sebkhah of Oran (Algeria). This strain is characterized as halotolerant (growth at 0–20% NaCl), (15–60°C), and alkalitolerant (pH 5–11).

The primary objective was to evaluate the influence of different culture parameters (salinity, medium consistency, and nutrient sources) on the strain's ability to produce antimicrobial substances.

The methodology combined classical microbiological approaches with standardized techniques for assessing antimicrobial activity. After reviving the strain from -20°C storage, antimicrobial activity was tested against nine target microorganisms (4 Gram-positive bacteria, 3 Gram-negative bacteria, and 2 *Candida albicans* strains) using two complementary methods: the agar cylinder technique to detect metabolites produced on solid media and the well diffusion assay for metabolites in liquid culture.

Obtained results revealed that production was significantly higher in the presence of 10% NaCl. The largest inhibition zones were observed against *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus*, and *Staphylococcus aureus*. Solid media proved more favorable than liquid media, consistently yielding larger inhibition zones. Among the tested nutrient sources, yeast extract (0.2%) and glycerol (1%) showed the highest stimulation profiles, whereas elevated concentrations (10%) of certain carbon sources inhibited production. The strain exhibited preferential activity against Gram-positive bacteria.

This isolate and its metabolites represent a promising candidate for various biotechnological applications.

Keywords: Extremophilic *Bacillus*, antimicrobial activity, production optimization, secondary metabolites.

Résumé

La résistance aux antibiotiques représente un enjeu mondial de santé publique, l'exploration des microorganismes extrêmophiles comme source de nouveaux composés bioactifs présente un intérêt majeur.

Dans un contexte, ce travail vise à l'optimisation de la production des métabolites antimicrobiens par une souche bactérienne poly-extrêmophile, *Bacillus* sp. LMB3073, isolée à partir de la grande Sebkhah d'Oran (Algérie), caractérisée comme halotolérante (croissance entre 0-20% NaCl), thermotolérante (15-60°C) et alcalitolerante (pH 5-11).

L'objectif principal était d'évaluer l'influence de différents paramètres de culture (salinité, consistance du milieu et sources nutritives) sur la capacité de la souche LMB3073 à produire des substances antimicrobiennes.

La méthodologie utilisée a combiné des approches microbiologiques classiques avec des techniques standardisées d'évaluation de l'activité antimicrobienne. Après revivification de la souche conservée à -20°C, l'activité antimicrobienne a été testée contre neuf microorganismes cibles (4 bactéries à Gram positif, 3 à Gram négatif, et 2 souches de *Candida albicans*) par deux méthodes complémentaires : la technique des cylindres d'agar pour mettre en évidence les métabolites produits sur milieu gélosé et la méthode des puits pour mettre en évidence les métabolites produits sur milieu liquide.

Les principaux résultats ont révélé que la production était significativement plus élevée en présence de 10% de NaCl. Les diamètres d'inhibition les plus importants concernaient *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus*. Le milieu gélosé s'est avéré plus favorable que le milieu liquide, avec des zones d'inhibition systématiquement plus larges. Parmi les sources nutritives testées, l'extrait de levure (0,2%) et le glycérol (1%) ont montré les meilleurs profils de stimulation, tandis que des concentrations élevées (10%) de certaines sources carbonées inhibaient la production. La souche a démontré une activité préférentielle contre les bactéries Gram positif.

Cet isolat ainsi que ses métabolites peut constituer un candidat prometteur pour diverses applications biotechnologiques.

Mots clés : *Bacillus* extrêmophiles, activité antimicrobienne, optimisation de production, métabolites secondaires.

Liste des abréviations

| | | |
|--------|---|---|
| rpm | : | Rotation par minute |
| p/v | : | Poids / volume |
| PGP | : | Plant growth promoting |
| ATP | : | Adénosine tri phosphate |
| ARNr | : | ARN ribosomale |
| CLSI | : | Clinical and Laboratory Standards Institute |
| CMI | : | Concentration minimale inhibitrice |
| µL | : | microlitre |
| mm | : | millimètre |
| ATCC | : | American Type Culture Collection |
| IP | : | Institut Pasteur |
| UFC | : | Unité Formant Colonie |
| Tr/min | : | Tours par minute |

Liste des figures

| | | | |
|--------------------|---|---|-----------|
| Figure N° 1 | : | Schéma représentatif de différents systèmes de transport d'ions à travers la membrane plasmique des archées halophiles aérobies de la famille des <i>Halobacteriaceae</i> (Oren, 2006). | 06 |
| Figure N° 2 | : | Photos résultats de l'activité antimicrobienne, par la technique des cylindres d'agar, de l'isolat LMB3073 cultivé sur milieu GN à 10% NaCl à différentes sources nutritives, vis-à-vis <i>Micrococcus luteus</i> et <i>Staphylococcus aureus</i> | 23 |

Liste des tableaux

| | | | |
|---------------------|---|---|-----------|
| Tableau N° 1 | : | Répartition de quelques espèces halophiles et halotolérantes du genre <i>Bacillus</i> | 09 |
| Tableau N° 2 | : | Germes test de référence utilisés | 15 |
| Tableau N° 3 | : | Les résultats des diamètres des zones d'inhibition engendrés par l'isolat LMB3073 ensemencé sur Gélose Nutritive et Bouillon Nutritives à différentes concentrations de NaCl. | 18 |
| Tableau N° 4 | : | Diamètres (en mm) des zones d'inhibition obtenus en présence de différentes sources nutritives (production des antimicrobiens sur milieu gélifié). | 20 |
| Tableau N° 5 | : | Diamètres (en mm) des zones d'inhibition obtenus en présence de différentes sources nutritives (production des antimicrobiens sur milieu liquide) | 20 |

Introduction générale

Introduction générale

La mise en évidence de communautés microbiennes dans des environnements auparavant jugés incompatibles avec la vie, tels que les zones volcaniques, les régions polaires, les lacs hypersalés ou encore les sources hydrothermales, a profondément élargi notre compréhension des conditions physico-chimiques compatibles avec le développement biologique. Les microorganismes prospérant dans ces milieux sont désignés sous le terme d'extrêmophiles ; ils ne se contentent pas de tolérer ces conditions extrêmes, mais y trouvent au contraire des niches écologiques favorables à leur métabolisme et à leur reproduction (**Abbamondi et al., 2019**).

En fonction du type de stress environnemental auquel ils sont adaptés, les microorganismes extrêmophiles peuvent être regroupés en plusieurs catégories : les halophiles et les halotolérants, qui tolèrent des concentrations élevées en sel ; les thermophiles, qui se développent à des hautes températures ; les psychrophiles, qui prospèrent dans les environnements froids ; les alcalophiles, qui se développent en milieux alcalins ; les acidophiles qui préfèrent les milieux acides ; ainsi que les piézophiles (ou barophiles), qui sont capables de croître sous des pressions hydrostatiques importantes (**Kochhar et al., 2022**).

Les microorganismes halophiles et halotolérants présentent un groupe fascinant de microorganismes qui sont adaptés aux environnements salins et hypersalins. Ils sont reconnus comme une source précieuse de métabolites secondaires résilients aux conditions extrêmes, offrant une diversité d'applications biotechnologiques. Ces applications comprennent la production de diverses biomolécules telles que les solutés compatibles, les exopolysaccharides, les biosurfactants, les caroténoïdes, les agents antimicrobiens et les extrêmoenzymes, ainsi que leur utilisation potentielle dans des processus de bioremédiation environnementale et dans la lutte biologique contre les phytopathogènes (**Guevara-Luna et al., 2024**).

Parmi les genres microbiens les plus adaptés aux conditions extrêmes, le genre *Bacillus*. Ses espèces offrent un avantage par rapport aux autres bactéries en raison de leur grande diversité écologique, de leur capacité de former des endospores résistantes et surtout pour leurs potentialités d'applications biotechnologiques très étendues. Elles produisent des enzymes actives à des conditions extrêmes des composés antimicrobiens et anticancéreux, et des biosurfactants, elles stimulent la croissance végétale par leur caractère PGP (Plant growth promoting) et fertilisent les sols par leur capacité de fixer l'azote et solubiliser le phosphate (**Donio et al., 2013 ; Nabti et al., 2013 ; Couto et al., 2015**).

Introduction générale

Compte tenu de l'importance de ce groupe de microorganismes, l'objectif principal de notre mémoire s'est porté sur l'optimisation de la production des activités antimicrobiennes par une souche poly-extrêmophile du genre *Bacillus* isolée de la grande sebkha d'Oran.

Cette souche, préalablement identifiés par Dr. NAS Fatima, a été conservés au sein de l'équipe 3 « Bactéries extrêmophiles » du Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agro-alimentaire, au Biomédical et à l'Environnement (L.A.M.A.A.B.E.) de l'Université de Tlemcen. Elle a démontré un potentiel prometteur pour la production de métabolites secondaires à activité antimicrobienne, ce qui justifie sa sélection pour cette étude.

La démarche expérimentale s'est articulée autour des étapes suivantes :

- La revivification et la vérification de la pureté de la souche LMB3073
- L'évaluation de son pouvoir antimicrobien en testant la production sur milieu Gélosé (Gélose nutritive à 10% de NaCl) et milieu liquide (Bouillon Nutritif à 10% NaCl).
- Optimisation de la production des activités antimicrobiennes sur milieu gélosé et liquide en utilisant différents composée comme source de carbone, d'azote et de phosphore.

Synthèse Bibliographique

1. Les microorganismes extrêmophiles

1. 1. Définition

Le terme « extrêmophile » désigne les microorganismes qui colonisent les habitats caractérisés par des conditions extrêmes où les organismes classiques ne peuvent pas survivre. Parmi ces conditions, les températures extrêmement élevées ou basses, les pH acides ou basiques, les radiations, les pressions extrêmes (élevées ou basses) et les concentrations élevées en sel (Salwan et Sharma, 2020 ; Thakur *et al.*, 2022).

Ce terme a été inventé en 1974 par le scientifique MacElroy dans un article intitulé 'Some comments on the evolution of extremophiles' (Macelroy, 1974)

1. 2. Classification des microorganismes extrêmophiles

Selon les conditions de extrêmes auxquels ils sont confrontés, les microorganismes extrêmophiles sont classés en plusieurs groupes distincts, parmi les plus étudiés : les halophiles et les halotolérants, les acidophiles et les alcaliphiles, les thermophiles et les psychrophiles (Raddadi *et al.*, 2015).

1. 2. 1. Les microorganismes halotolérants et halophiles

Les microorganismes qui prospèrent dans les habitats salins ou hypersalins, tels que les sebkhas, les lacs, le grand lac salé de l'Ouest américain et la Mer Morte, sont divisés en deux communautés :

- Ceux qui sont capables de se développer en absence de sel et tolèrent des concentrations croissantes en sel, ce sont les microorganismes halotolérants.
- Ceux qui nécessitent le sel pour leur croissance, ce sont les microorganismes halophiles

Les microorganismes nécessitant moins de 2% (p /v) de sel pour une croissance optimale ne sont pas considérés comme halophiles.

Dans le groupe de microorganismes halotolérants, il existe plusieurs trois catégories selon la concentration de sel tolérée (Tiquia *et al.*, 2007) :

- ✓ Les microorganismes légèrement halotolérants qui tolèrent des concentrations de NaCl de 6 à 8% (p/v).
- ✓ Les halotolérants modérés qui tolèrent des concentrations de NaCl jusqu'à 18 à 20% (p/v).
- ✓ Les halotolérants extrêmes qui tolèrent toutes concentrations de NaCl varient de 0% jusqu'à le point de saturation.

Concernant les halophiles, ils sont divisés, en fonction de la concentration de sel exigée pour une croissance optimale, en trois catégories selon la classification de **Larsen (1962)**, les Légèrement halophiles qui nécessitent des concentrations allant de 1 à 6% de NaCl (p/v), les halophiles modérés qui exigent des concentrations allant de 3 à 15% de NaCl (p/v), et les halophiles extrêmes qui requièrent des concentration allant de 15 à 30% de NaCl (p/v).

En **1985**, **Kushner** a conçu une autre classification pour répartir les microorganismes halophiles dont il a défini également trois classes :

- Les microorganismes légèrement halophiles : sont ceux qui se développent sur un intervalle de salinité de 1 à 11.5% de NaCl (p/v) avec un optimum de croissance à des concentrations comprises entre 1 et 3% de NaCl (p/v),

- Les halophiles modérés : sont ceux qui se développent à des concentrations comprises entre 2.5 et 20 % de NaCl (p/v) avec un optimum de croissance entre 3 et 11,5 % de NaCl (p/v).

- Les halophiles extrêmes : sont ceux qui se développent sur un intervalle de 11.5 à 30 % de NaCl (p/v) avec un optimum de croissance à des concentrations supérieures à 17.5% de NaCl (p/v).

Plusieurs d'autres classifications de microorganismes halophiles ont été données (**Echigo et al., 2005**; **Echigo et al., 2007** ; **Bowers et al., 2009**). Néanmoins, la classification décrite par Kushner reste la plus adoptée et sur laquelle se base la plupart des travaux (**Oren, 2008** ; **Gonsalves et al., 2012** ; **Nazareth, 2014**).

1. 2. 2. Les microorganismes thermophiles et psychrophiles

Les microorganismes thermophiles sont ceux qui habitent les environnements à température très élevée, tels que les fumeurs noirs et les sources hydrothermales. Ils ne sont pas seulement tolérants à ces températures, mais aussi nécessitent généralement ces dernières pour leur croissance et leur survie. Ces micro-organismes ont été classés en thermophiles modérés dont l'optimum de croissance se situe entre 40°C et 60°C, les thermophiles extrêmes (entre 60°C à 85°C) et les hyperthermophiles (>85°C) (**Mehta et Satyanarayana, 2013**).

Quant aux microorganismes psychrophiles, sont ceux capables de croître de manière optimale à des températures inférieures ou égales à 15 °C et ne pouvant se développer au-dessus de 20 °C. Ils colonisent les eaux glacières, et les régions froides polaires où la lumière disparaît tout près de trois mois par année, où les ressources nutritives ne sont présentes qu'en faible quantité et où la température descend parfois à des niveaux incroyablement bas (**Boetius et al., 2015**).

1. 2. 3. Les microorganismes acidophiles et alcalophiles

Les microorganismes qui prospèrent dans des conditions de pH extrêmement bas ou élevés, sont respectivement désignés sous les termes d'acidophiles et d'alcalophiles.

Les acidophiles nécessitent des pH inférieur à 3 pour se développent de manière optimale. Ils prospèrent dans les environnements acides naturels tels que les champs solfatares, les bassins sulfuriques et les geysers, ainsi que dans des environnements artificiels créés par des activités humaines, comme l'exploitation minière de charbon et de minerais métalliques (**Salwan et Sharma, 2020**).

Les alcaliphiles se développent dans des environnements alcalins avec un pH égale ou supérieur à 9, présentant généralement une croissance optimale à un pH d'environ 10. Ils se trouvent dans les lacs de soude comme exemple le Lake Magadi au Kenya, et les sols riches en carbonates de sodium (Na_2CO_3) (**Sysoev et al., 2021**).

2. Les stratégies d'adaptation des bactéries halophiles et halotolérants

Dans les milieux salins et hypersalins, les microorganismes font face à des contraintes telles que la déshydratation et le stress osmotique liés à la faible activité de l'eau. Pour s'y adapter, les espèces halophiles et halotolérantes adoptent principalement deux stratégies d'osmoprotection : l'accumulation intracellulaire de solutés organiques compatibles, appelés osmoprotecteurs, ou de sels inorganiques comme le KCl. Ces mécanismes permettent de maintenir l'équilibre osmotique avec le milieu extérieur (**Gunde-Cimerman et al., 2018**).

2. 1. L'adaptation par accumulation de solutés organiques (les osmoprotecteurs)

Cette stratégie appelée également « Compatible-solute strategy » ou « Low salt-in ». Elle consiste à exclure les ions sodium du cytoplasme et accumuler des molécules hydrosolubles à faible poids moléculaire, capables de stabiliser la cellule sans perturber ses fonctions métaboliques afin éviter la perte d'eau. Ces composés peuvent être soit synthétisés par la cellule ou importés depuis le milieu externe via des transporteurs spécifiques transport sans qu'ils interfèrent avec leurs métabolismes. Ils sont appelés « solutés compatibles », ils comprennent des polyols et leurs dérivés, les sucres et dérivés, les acides aminés et dérivés, les bêtaïnes, l'ectoïnes (**Shivanand et Mugeraya, 2011**).

Cette stratégie est largement répandue chez les archées, bactéries et eucaryotes, et offre une plus grande flexibilité d'adaptation osmotique que l'accumulation d'ions KCl. Elle nécessite également moins de modifications enzymatiques internes. Toutefois, la biosynthèse des solutés compatibles implique un coût énergétique élevé pour la cellule (**Oren, 2002**).

2. 2. L'adaptation par accumulation de KCl

Cette stratégie appelée aussi « **high salt-in** » ou « **salt-in** ». Elle repose sur l'accumulation intracellulaire de sels, principalement le chlorure de potassium (KCl), afin de limiter les pertes d'eau. Ce mécanisme est typiquement observé chez les *Archaea* halophiles extrêmes et certaines bactéries halophiles extrêmes. La concentration de KCl intracellulaire chez ces microorganismes est plus importante que la concentration extracellulaire du NaCl, ce qui conduit à la restauration de la pression de turgescence en assurant l'équilibre osmotique des deux côtés de la membrane plasmique (**Hänelt et Müller, 2013**).

La régulation de la concentration en ions est possible grâce à l'action coopérative de plusieurs protéines de transport, pompes ioniques, transporteurs couplés ou autres, qui permettent les échanges bidirectionnels des molécules et d'ions (**Oren, 2006**). Ces différents échanges sont illustrés dans **la figure N° 1**.

Chez les halophiles, la force motrice utilisée pour le transport d'ions est une différence de potentiel formé de part et d'autre de la membrane grâce à :

- la chaîne respiratoire, au niveau de laquelle le transport d'électrons est accompagné par l'extrusion des protons,
- des protéines membranaires, 'les bactériorhodopsines ou halorhodopsine', qui grâce à leur pigment rétinol, et sous l'effet de la lumière peuvent aussi être utilisées pour la génération d'un gradient de protons, ou encore
- l'utilisation des ATP synthases fonctionnant contre le gradient protons H^+ où elle entraîne la formation d'ATP.

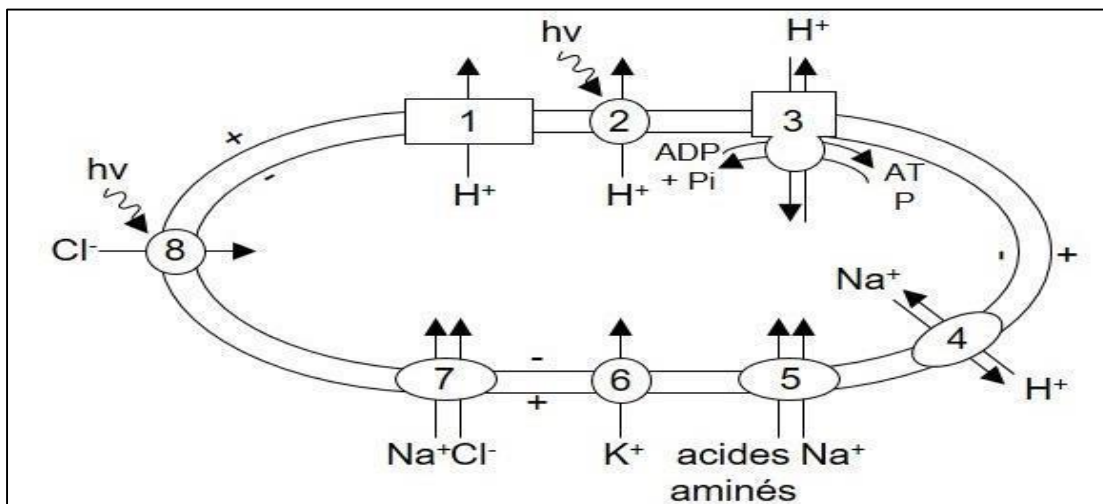


Figure N° 1: Schéma représentatif de différents systèmes de transport d'ions à travers la membrane plasmique des archées halophiles aérobies de la famille des *Halobacteriaceae* (**Oren, 2006**).

1. Extrusion de protons via transport d'électrons respiratoire ;2. Extrusion de protons induite par la lumière de la bactériorhodopsine ;3. Formation d'ATP par l'ATP synthase, entraînée par le gradient de proton ;4. Antiport sodium / proton ; 5. Transport interne des acides aminés induit par le gradient de sodium ;6. Potassium uniport, entraîné par le potentiel membranaire ;7. Système de transport de chlorure indépendant de la lumière, associé au transport de sodium vers l'intérieur ;8. Pompe de chlorure entraînée par la lumière, à médiation par l'halorhodopsine.

3. Le genre *Bacillus*

3.1. Taxonomie du genre *Bacillus*

Le genre *Bacillus* constitue un groupe extrêmement diversifié de bactéries appartenant au phylum des *Firmicutes*, Classe des *Bacilli*, Ordre des *Bacillales*, famille des *Bacillaceae* (Maughan et Van der Auwera, 2011).

Leurs espèces ayant un impact considérable sur la vie humaine. Décrit pour la première fois en 1872, ce genre comprend 293 espèces et sous-espèces nommées allant de bactéries hautement pathogènes (exemple : *Bacillus anthracis*, agent de la maladie du charbon et *Bacillus cereus*, qui est responsable d'intoxications alimentaires) à des microorganismes d'intérêt majeur en agriculture (*Bacillus thuringiensis*, *Bacillus velezensis*) ou dans l'industrie pour la production d'antibiotiques et d'enzymes (*Bacillus subtilis*, *Bacillus clausii*, *Bacillus licheniformis* et *Bacillus wakoensis*). *B. subtilis*, espèce type du genre, est l'un des premiers organismes procaryotes à avoir été étudié en profondeur. Il est largement utilisé comme organisme modèle pour les bactéries à Gram positif et a été au cœur de nombreuses recherches sur la formation des spores (Patel et Gupta, 2020).

La classification des espèces de ce genre a connu une évolution constante, avec une augmentation notable du nombre d'espèces répertoriées. Cette dynamique est en grande partie attribuable à l'amélioration des techniques d'enrichissement et d'isolement, qui prennent en compte la diversité physiologique ainsi que les exigences nutritionnelles et culturelles propres à ces bactéries. Par ailleurs, l'essor des outils de biologie moléculaire, en particulier l'analyse des séquences des gènes codant l'ARN ribosomique 16S, a considérablement affiné les processus de caractérisation et d'identification génétique (Fritze, 2004).

Les études phylogénétiques fondées sur la comparaison des séquences 16S de l'ARNr, complétées par des données chimio-taxonomiques, ont conduit à une révision de la taxonomie du genre. Ainsi, plusieurs espèces auparavant classées dans le genre *Bacillus* ont été reclassées dans d'autres genres ou intégrées dans de nouveaux genres (Gaur, 2015). Parmi ceux-ci, on peut citer : *Amphibacillus* (Niimura et al., 1990), *Alicyclobacillus* (Wisotzkey et al., 1992), *Paenibacillus* (Ash et al., 1993), *Halalkalibacillus* (Echigo et al., 2007). Malgré ces

réajustements taxonomiques, *Bacillus* demeure l'un des genres bactériens les plus hétérogènes (Zhang *et al.*, 2009).

3. 2. Caractéristique microbiologique du genre *Bacillus*

Les espèces du genre *Bacillus* se distinguent des autres bactéries par leur capacité de former des endospores, leur morphologie cellulaire et leur type de Gram, leur type respiratoire et par la production de la catalase. Elles se présentent sous forme de bâtonnets à Gram positif isolés, en paires, ou en chaînettes, elles sont immobiles ou mobiles par des flagelles péritriches, sporulantes, aérobies ou aéro-anaérobies facultatives, catalase positive et oxydase variable. Il existe des espèces capsulées : *B. anthracis*, *B. licheniformis*, *B. megaterium* et *B. subtilis*. Elles poussent sur des milieux ordinaires tels que la gélose nutritive et la gélose au sang. 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. Ces microorganismes sont des chimioorganotrophes ou chimiolithotrophes et prototrophes ou auxotrophes (De Vos *et al.*, 2009).

3. 3. Niche écologique du genre *Bacillus*

Les espèces appartenant au genre *Bacillus* sont largement distribuées dans la nature. Bien que leur habitat principal soit le sol, leur remarquable diversité physiologique et métabolique leur permet d'occuper une grande variété de niches écologiques. On les retrouve ainsi dans les environnements aquatiques, les végétaux, les denrées alimentaires, ainsi que chez l'être humain, les animaux, les insectes, et même dans des milieux extrêmes tels que les déserts, les régions polaires comme l'Antarctique, les sources hydrothermales, les lacs hypersalés et alcalins, les marais salants ou encore les mines de sel (Roohi *et al.*, 2014 ; Aissaoui *et al.*, 2018 ; Arab *et al.*, 2018 ; Nas *et al.*, 2021).

La première espèce halophile officiellement décrite au sein du genre *Bacillus* est *Bacillus halophilus*, identifiée par Ventosa et ses collaborateurs en 1989 (Ventosa *et al.*, 1989). Cette espèce se développe dans une gamme de salinité allant de 3 à 30 % (p/v), avec une croissance optimale observée à 15 % (p/v). Elle présente également la capacité de produire une nucléase extracellulaire halophile dotée d'activités RNase et DNase (Berkeley *et al.*, 2002).

Depuis, de nombreuses espèces halophiles et halotolérantes du genre *Bacillus* ont été découvertes, isolées et analysées. Le **Tableau N° 1** présente une synthèse de leur distribution.

Tableau N° 1: Répartition de quelques espèces halophiles et halotolérantes du genre *Bacillus*

| Espèces | Habitats d'isolement | Concentration de NaCl pour croissance (%) | Références |
|-------------------------|--------------------------------------|---|---------------------------------|
| <i>B. krulwichiae</i> | Sol salin (Japon) | 0-14% | Yumoto et al., 2003 |
| <i>B. oshimensis</i> | Sol salin d'Oshima (Japon) | 0-20 (opt 7%) | Yumoto et al., 2005 |
| <i>B. isabeliae</i> | Etang salé (Island) | 1-14 % (opt 4 à 6%) | Albuquerque et al., 2008 |
| <i>B. persepolensis</i> | Lac hypersalin de Howz-Soltan (Iran) | 5 - 20% (opt 10%) | Amoozegar et al., 2009 |
| <i>B. iranensis</i> | Lac hypersalin d' Aran-Bidgol (Iran) | 2.5 - 15% (opt 5-7.5%) | Bagheri et al., 2012 |
| <i>B. persicus</i> | Lac hypersalin d'Aran-Bidgol (Iran) | 0.5 - 10% (opt 2.5%) | Didari et al., 2013 |
| <i>B. licheniformis</i> | Lac salin à Sambhar (Inde) | 3 - 15% (opt 10%) | Gaur, 2015 |
| <i>Bacillus spp.</i> | La Grande Sebkhha d'Oran | 0 - 20% (opt 0%) | Nas et al., 2021 |

3. 4. Production de composés antimicrobiens par le genre *Bacillus*.

Les espèces du genre *Bacillus* possèdent une grande diversité de propriétés biologiques, en plus de leur capacité bien connue à former des spores et à croître rapidement. Ces caractéristiques les rendent particulièrement intéressantes pour des applications biotechnologiques variées. Bien que certaines espèces soient pathogènes pour l'être humain, la majorité d'entre elles représentent un groupe utile dans de nombreux secteurs (**Maughan et Van der Auwera, 2011**). En effet, certaines souches jouent un rôle de promoteurs de croissance des plantes (PGP) et agissent comme biofertilisants grâce à leur aptitude à fixer l'azote ou à solubiliser le phosphate. De plus, ces bactéries sont capables de produire une large gamme de métabolites secondaires aux structures variées et aux fonctions biologiques multiples, incluant des biosurfactants, des phytohormones, des sidérophores, des enzymes, des antibiotiques, des antifongiques, des antiviraux, des antitumoraux, ainsi que des composés immunosuppresseurs (**Nabti et al., 2013**).

Le genre *Bacillus* est reconnu depuis longtemps comme une source majeure d'antibiotiques, notamment depuis l'époque marquée par la découverte intensive de ces molécules. Les antibiotiques produits par ces bactéries sont principalement des peptides de faible poids moléculaire, synthétisés soit par voie ribosomale, soit via des mécanismes enzymatiques non ribosomaux (**Stein, 2005**).

Les peptides synthétisés de manière ribosomale sont généralement produits durant la phase de croissance active. Ils incluent notamment des lantibiotiques comme la nisine et la

subtiline, qui exercent une activité antibactérienne contre les bactéries à Gram positif (Stein, 2005).

À l'inverse, les peptides non ribosomiques, générés par l'action d'enzymes de type NRPS (Non-Ribosomal Peptide Synthetases), sont produits en fin de croissance ou pendant la sporulation. Parmi eux, on peut citer les bacillomycines et la mycosubtiline, reconnues pour leurs propriétés antifongiques et hémolytiques (Stein, 2005 ; Stoica *et al.*, 2019).

Par ailleurs, *Bacillus* produit aussi divers antibiotiques non peptidiques aux structures chimiques variées, tels que les amicoumacines, les macrolactines et leurs dérivés (Stoica *et al.*, 2019).

Plus de 167 antibiotiques issus d'espèces du genre *Bacillus* ont été décrits. Parmi les plus notables figurent : la polymyxine, la difficidine, la subtiline, la mycobacilline et la bacitracine, produites par *Bacillus subtilis* ; la gramicidine et la tyrothricine, issues de *Bacillus brevis* ; la cerexine et la zwittermicine, produites par *Bacillus cereus* ; la circuline, par *Bacillus circulans* ; la laterosporine, par *Bacillus laterosporus* ; la bacitracine, également produite par *Bacillus licheniformis* ; la polymyxine et la colistine, par *Bacillus polymyxa* ; ainsi que la pumuline, par *Bacillus pumilus*. La majorité de ces composés présentent une activité ciblée contre les bactéries à Gram positif. Toutefois, certaines molécules, comme la polymyxine, la colistine et la circuline, sont également actives contre des bactéries à Gram négatif, tandis que d'autres telles que la bacillomycine, la mycobacilline et la fungistatine présentent une action antifongique, efficace contre les champignons et les levures (Syed *et al.*, 2009 ; Awais *et al.*, 2010).

4. Méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne in vitro

L'évaluation de la sensibilité des microorganismes aux agents antimicrobiens est une étape essentielle dans les domaines de la découverte de médicaments, de l'épidémiologie et de la prédiction de l'efficacité thérapeutique.

Après la révolution de l'ère d'or, au cours de laquelle la majorité des grandes classes d'antibiotiques (tétracyclines, céphalosporines, aminosides, macrolides) ont été découvertes et que les principaux défis de la chimiothérapie ont été surmontés dans les années 1960, l'histoire semble se répéter. Ces molécules prometteuses sont aujourd'hui menacées par l'augmentation de la résistance microbienne et l'apparition de nouveaux pathogènes. Cette situation a un impact majeur, avec l'échec de certains traitements en raison de la présence de bactéries multi-résistantes, ce qui représente désormais un enjeu mondial pour la santé publique (Guschin *et al.*, 2015).

Ainsi, la découverte de nouveaux antibiotiques constitue un objectif crucial. Les produits naturels demeurent l'une des sources principales de nouvelles molécules thérapeutiques. Ils

proviennent d'organismes variés, notamment des bactéries procaryotes, des microorganismes eucaryotes, des plantes, et d'autres êtres vivants (**Balouiri et al., 2016**).

Ces dernières années, de nombreux chercheurs se sont consacrés à l'étude d'extraits végétaux et microbiens, d'huiles essentielles, de métabolites secondaires purs ainsi que de nouvelles molécules synthétisées en tant qu'agents antimicrobiens. Toutefois, une analyse de la littérature scientifique révèle que la comparaison des résultats est souvent difficile en raison de l'utilisation de méthodologies variées et non standardisées (préparation de l'inoculum, taille de l'inoculum, milieux de culture, conditions d'incubation, critères de lecture, etc.) (**Balouiri et al., 2016**).

Plusieurs méthodes ont été développées pour le screening du pouvoir antimicrobien de métabolites secondaires issus des plantes ou de microorganismes. Parmi les plus utilisées :

4. 1. La technique des cylindres d'agar (*Agar plug diffusion method*)

Cette méthode est fréquemment utilisée pour mettre en évidence l'antagonisme entre microorganismes. Elle consiste à cultiver la souche d'intérêt sur un milieu de culture approprié, en réalisant des stries serrées à la surface d'une boîte de Pétri. Au cours de sa croissance, la souche microbienne sécrète des molécules qui diffusent dans le milieu gélosé. Après incubation, un cylindre d'agar est prélevé de manière aseptique à l'aide d'un emporte-pièce stérile, puis transféré sur la surface d'une autre boîte contenant une gélose préalablementensemencée avec le microorganisme cible. Les substances diffusent alors du cylindre d'agar vers le milieu environnant. L'activité antimicrobienne des composés sécrétés est révélée par l'apparition d'une zone d'inhibition autour des cylindres d'agar (**Elleuch et al., 2010**).

4. 2. La technique des disques en papier (*agar disk diffusion method ou filter paper discs*)

Développée en 1940, cette méthode est aujourd'hui la technique de référence dans de nombreux laboratoires de microbiologie clinique pour les tests de sensibilité aux antimicrobiens. Plusieurs standards ont été établis par le Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) pour les bactéries et les levures. Bien que cette méthode ne soit pas adaptée à toutes les bactéries exigeantes, des protocoles ont été développés pour tester certaines d'entre elles comme les *streptocoques*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, avec des milieux de culture et des conditions d'incubation spécifiques (**CLSI, 2012**).

Le protocole consiste à ensemencer la surface d'une boîte de Pétri contenant un milieu gélosé avec un inoculum standardisé du microorganisme à tester. Ensuite, des disques de papier filtre imprégnés d'une concentration donnée de l'agent antimicrobien sont placés à la surface. Après incubation, l'agent diffuse dans le milieu et inhibe la croissance bactérienne autour du disque. Le diamètre de la zone d'inhibition est ensuite mesuré.

Cette méthode donne des résultats qualitatifs, classant les bactéries comme sensibles, intermédiaires ou résistantes. Elle ne permet pas de différencier une action bactéricide d'une action bactériostatique et ne permet pas non plus une détermination précise de la concentration minimale inhibitrice (CMI), bien qu'une estimation approximative soit parfois possible. Malgré cela, sa simplicité, son faible coût et sa facilité d'interprétation en font une méthode très utilisée, notamment pour tester des extraits de plantes, des huiles essentielles et d'autres composés naturels (**Das et al., 2010**).

4. 3. Technique des puits (*Agar well diffusion methode*)

Cette méthode est largement utilisée pour évaluer l'activité antimicrobienne des extraits de plantes ou de microorganismes. De manière similaire à la méthode de disque en papier, la surface de la boîte contenant la gélose estensemencée en répartissant uniformément un volume de l'inoculum microbien sur toute la surface du milieu. Ensuite, des puits de 6 à 8 mm de diamètre sont perforés de manière aseptique à l'aide d'un emporte-pièce stérile ou d'un embout. Un volume de 20 à 100 μL de la solution de l'agent antimicrobien ou de l'extrait, préparée à la concentration souhaitée, est alors introduit dans le puits. La boîte est ensuite incubée dans des conditions appropriées, selon les exigences du microorganisme testé. L'agent antimicrobien diffuse dans le milieu gélosé et inhibe la croissance de la souche microbienne testée (**Balouiri et al., 2016**).

4. 4. Méthode des stries croisées ou stries transversales (*Cross streak method*)

Cette méthode est utilisée pour effectuer un dépistage rapide de l'antagonisme entre microorganismes. La souche microbienne d'intérêt est d'abordensemencée par une strie unique au centre d'une boîte de Pétri contenant de la gélose. Après une période d'incubation adaptée à la souche d'intérêt, d'autres microorganismes sontensemencés par stries perpendiculaires à la strie centrale. Après une incubation supplémentaire, les interactions antimicrobiennes sont évaluées par l'observation des zones d'inhibition formées le long des stries croisées (**Balouiri et al., 2016**).

4. 5. La méthode d'empoisonnement du milieu de culture (*Poisoned food method*)

Cette méthode est principalement utilisée pour évaluer l'effet antifongique contre les moisissures. L'agent antifongique ou l'extrait à tester est incorporé dans la gélose fondue à la concentration finale souhaitée, puis bien homogénéisé. Le milieu est ensuite versé dans des boîtes de Pétri. Après solidification, un disque mycélien de 2 à 5 mm est placé au centre de la boîte. Après incubation dans des conditions appropriées selon la souche fongique testée, les diamètres de croissance fongique sont mesurés dans les boîtes témoins (sans agent) et dans les

boîtes contenant l'agent antifongique. L'activité antifongique est exprimée en pourcentage d'inhibition, elle est calculée à l'aide de la formule suivante (**Balouiri et al., 2016**) :

$$\mathbf{T = \frac{Db - Da}{Db} \times 100}$$

T : Taux d'inhibition de la croissance mycélienne en %.

Da : Le diamètre (en mm) de la zone de la croissance mycélienne du disque d'agar de la culture pure de 5 à 7 jours inoculé sur milieu adéquat **additionné de l'agent antifongique** (extrait, surnageant...).

Db : Le diamètre (en mm) de la zone de la croissance mycélienne du disque d'agar de la culture pure de 5 à 7 jours inoculé sur milieu adéquat **non additionné** de l'agent antifongique.

De manière générale, lorsque la standardisation de la méthode pose problème, il est recommandé d'utiliser un témoin positif contenant une molécule antimicrobienne connue, afin de valider la fiabilité de l'approche expérimentale et de permettre une comparaison rigoureuse des résultats (**Balouiri et al., 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 l'optimisation de la production des activités antimicrobiennes par une souche poly-extrêmophile du genre *Bacillus* nommée LMB3073.

1. Origine de la souche LMB3073

L'isolat LMB3073 fait partie d'une collection de souches bactériennes isolées par Dr. NAS Fatima en février 2014, lors de ces travaux de doctorat (**Nas, 2022**) à partir des échantillons d'eau prélevés de la grande sebkha d'Oran.

L'isolement a été effectué sur milieu Bouillon Nutritif à 10% de NaCl, et la purification a été réalisée par des repiquages successifs sur milieu Gélose Nutritive supplémentée de 10% de NaCl.

La souche LMB3073 est affiliée au genre *Bacillus*, son identification a été confirmée par le séquençage du gène codant l'ARNr 16S. Elle est poly-extrêmophile capable de se développer dans de large plage de température (15 à 60°C), de pH (5 à 11) et de salinité (de 0 à 20% de NaCl). Par ailleurs, elle a démontré un potentiel antimicrobien notable (**Nas et al., 2021**) ce qui justifie sa sélection pour cette étude.

2. Revivification et vérification de la pureté de souche

La souche a été conservée à -20°C sur Bouillon Nutritif supplémenté de 10% de NaCl et 25% de glycérol. Afin de la revivifier, 200 µL de la culture conservée ont été inoculés dans 5 mL de Bouillon Nutritif additionné de 10 % de NaCl (p/v). L'incubation a été faite à 37°C jusqu'à l'apparition d'un trouble. Des repiquages successifs ont été effectués par la suite sur Gélose Nutritive à 10% de NaCl (p/v) afin de vérifier sa pureté.

3. Evaluation de l'activité antimicrobienne de l'isolat LMB3073 à différentes conditions

3. 1. Standardisation des inocula des souches de référence

L'évaluation du pouvoir antimicrobien a été effectuée vis-à-vis neuf germes de référence (4 bactéries à Gram positif, 3 bactéries à Gram négatif et 2 levures) (**Tableau N° 2**) par la technique des puits.

Tableau N° 2: Germes test de référence utilisés

| Bactéries à Gram positif | Référence | Bactéries à Gram négatif | Référence | Champignons | Référence |
|---------------------------------|------------------|---------------------------------|------------------|-------------------------|------------------|
| <i>Bacillus cereus</i> | ATCC 11778 | <i>Escherichia Coli</i> | ATCC 25922 | <i>Candida albicans</i> | ATCC 26790 |
| <i>Bacillus subtilis</i> | ATCC 6633 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | ATCC 70603 | <i>Candida albicans</i> | IP444 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | ATCC 25923 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | ATCC 27853 | | |
| <i>Micrococcus luteus</i> | ATCC 15307 | | | | |

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 1×10^8 à 2×10^8 UFC mL⁻¹) (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 1×10^6 à 5×10^6 UFC mL⁻¹) (Rodríguez-Tudela *et al.*, 2001).

3. 2. Effet de NaCl sur la production des métabolites antimicrobiens sur milieu gélosé

L'évaluation de l'effet de NaCl sur la production des activités antimicrobiennes par l'isolat LMB3073 sur milieu gélose a été réalisé par la technique des cylindres d'agar (Blouiri *et al.*, 2016). Cette méthode consiste à ensemercer la souche en stries serrées sur la Gélose Nutritive exempt et à 10% de NaCl de façon à obtenir un tapis. 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 le milieu gélosé Muller-Hinton préalablement ensemençés 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 (p/v) non ensemençée ont été utilisés comme témoins.

Les boîtes de pétri sont placées pendant deux heures à 4°C pour permettre la diffusion des substances antimicrobiennes, puis incubées durant 24 heures à 37°C.

3. 3. Effet de NaCl sur la production des métabolites antimicrobiens sur milieu liquide

3. 3. 1. Préparation des surnageants de l'isolat LMB3073

A partir d'une culture de 24 heures à 37°C de l'isolat LMB3073 sur Gélose Nutritive contenant 10% de NaCl, des suspensions de densité optique de 0,1 à la longueur d'onde $\lambda = 600$ nm, ont été préparées dans de Bouillon Nutritif exempt et additionné de 10% de NaCl.

Après 5 jours d'incubation à 37 °C sous agitation à 180 rpm, les suspensions bactériennes ont été transférées dans des tubes coniques, puis centrifugées à 10000 t/min à 4°C pendant 30 minutes. Les différents surnageants ont ensuite été récupérés.

3. 3. 2. Evaluation de l'activité antimicrobienne des surnageants

Les surnageants récupérés ont été testé pour leur pouvoir antimicrobien par la technique des puits (**Balouiri et al., 2016**).

Sur des géloses Muller-Hinton préalablementensemencées par écouvillonnage avec les suspensions standardisées à 0.5 McFarlad des germes tests. Des puits de 6 mm de diamètre ont été aseptiquement perforés à l'aide de l'extrémité plate des pipettes pasteur stériles, puis 50 μ L de chacun des surnageants ont été introduit dans les puits. Des puits témoins ont reçues 50 μ L de Bouillon Nutritif avec 10 % de NaCl.

Les boîtes de pétri ont été 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.

3. 4. Effet de différentes sources nutritives sur la production des activités antimicrobiennes

Afin d'étudier l'effet de différentes sources nutritives sur la production de composés antimicrobiens, la souche LMB3073 a étéensemencée sur les milieux de base, le bouillon nutritif à 10 % de NaCl et la gélose nutritive à 10% de NaCl, enrichis par l'ajout de différents composés (source de carbone, source d'azote, source de phosphore) à différentes concentrations.

Chaque composé a été ajouté individuellement aux milieux de base. Après ensemencement, les différentes cultures ont été incubées à 37 °C pendant 5 jours.

L'incubation des cultures liquides a été effectuée sous agitation (180 rpm) et à la fin de l'incubation, elles ont été centrifugées à 10000 tr/min pendant 30 minutes et les surnageants ont été récupérés.

L'évaluation du pouvoir antimicrobien a été effectuée par la méthode des cylindres d'agar pour les cultures sur milieu gélosé et la méthode des puits pour les surnageants.

❖ Sources de carbone

Les différentes sources de carbone utilisées

- Glucose (monosaccharide) à des concentrations de 1% et 10%.
- Saccharose (disaccharide) à des concentrations de 1% et 10%.
- Glycérol (alcool polyol) à des concentrations de 1% et 10%.
- Tween 80 à des concentrations de 0.5% et 5%.

❖ Source d'azote

Les différentes sources d'azote utilisées sont :

- L'acide glutamique à une concentration de 0,1% et 1%.
- L'extrait de levure à des concentrations de 0.2% et 0.5%.

❖ Source de phosphore

- La source de phosphore utilisée est le KH_2PO_4 (phosphate monopotassique) à des concentrations de 0,2% et 2%.

Résultats et Discussion

1. Résultats

1. 1. Effets de NaCl et de la consistance du milieu de culture (milieu gélosé et milieu liquide) sur la production des métabolites antimicrobiens par l'isolat halotolérant LMB3073

La production des métabolites antimicrobiens par l'isolat halotolérant LMB3073, sur Gélose Nutritive et Bouillon Nutritive, a été testée en absence de sel et en présence de 10 % de NaCl (p/v) par la technique des cylindres d'agar (Production sur milieu solide) et la technique des puits (Production sur milieu liquide), vis-à-vis les neuf germes de référence utilisés. Les résultats obtenus sont présentés dans le **Tableau N° 3**.

Tableau N° 3: Les résultats des diamètres des zones d'inhibition engendrés par l'isolat LMB3073 ensemencé sur Gélose Nutritive et Bouillon Nutritives à différentes concentrations de NaCl.

| Les isolats | Diamètres (en mm) des zones d'inhibition obtenus par les cylindres d'agar (production sur milieu gélosé) | | | Diamètres (en mm) des zones d'inhibition obtenus par les surnageants (production sur milieu liquide) | | |
|------------------------------------|--|----------------|-----------|--|----------------|-----------|
| | à 0% de NaCl | à 10 % de NaCl | *Témoin 1 | à 0% de NaCl | à 10 % de NaCl | *Témoin 2 |
| <i>Bacillus cereus</i> | 13 | 16 | - | 11 | 13 | - |
| <i>Bacillus subtilis</i> | 12 | 13 | - | 10 | 11 | - |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 13 | 15 | - | 10 | 12 | - |
| <i>Micrococcus luteus</i> | 14 | 16 | - | 12 | 13 | - |
| <i>Escherichia coli</i> | 9 | 11 | - | 7 | 8 | - |
| <i>Klebsielle pneumoniae</i> | 11 | 13 | - | 7 | 10 | - |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | - | - | - | - | - | - |
| <i>Candida albicans ATCC 26790</i> | 9 | 10 | - | 7 | 8 | - |
| <i>Candida albicans IP444</i> | 8 | 10 | - | 7 | 9 | - |

*Témoin 1 : des cylindres d'agar prélevés à partir de GN à 10% de NaCl non ensemencée

*Témoin 2 : Bouillon nutritif à 10% de NaCl

A partir du **Tableau N° 3**, il apparaît que :

- La production des activités antimicrobiennes a été effectuée sur les deux types de milieu de culture ; milieu solide (Gélose nutritive) et milieu liquide (Bouillon Nutritive), avec des diamètres des zones d'inhibition obtenus à partir des cylindre d'agar plus importants que ceux obtenus par les surnageants.

- Les diamètres des zones d'inhibition obtenus en présence de 10% de NaCl sont importants à ceux obtenus en absence de sel.
- L'isolat LMB3073 produit des activités antibactériennes et antifongiques.
- Les témoins n'ont exercés aucun effet inhibiteur.
- L'isolat montre une bonne activité contre les Gram positifs (*Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*) et une activité plus faible contre les Gram négatifs (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*). Aucune inhibition n'est observée contre *Pseudomonas aeruginosa*.
- L'isolat exerce une activité modeste contre *Candida albicans*, légèrement augmentée en présence de NaCl.
- L'activité inhibitrice la plus importante est observée à l'encontre de *Micrococcus luteus*.

1. 2. Effets de de différente source nutritive sur la production des métabolites antimicrobiens par l'isolat halotolérant LMB3073.

La production des métabolites antimicrobiens a été également évaluée en présence de différentes sources de carbone, d'azote et de phosphore à différentes concentrations. Elle a été cherchée toujours sur milieu gélosé (GN) et milieu liquide (BN) additionnés de 10% de NaCl. Un exemple de résultat est illustré dans la **figure N° 2**. Les résultats sont résumés dans les **tableaux N° 4 et N° 5** respectivement.

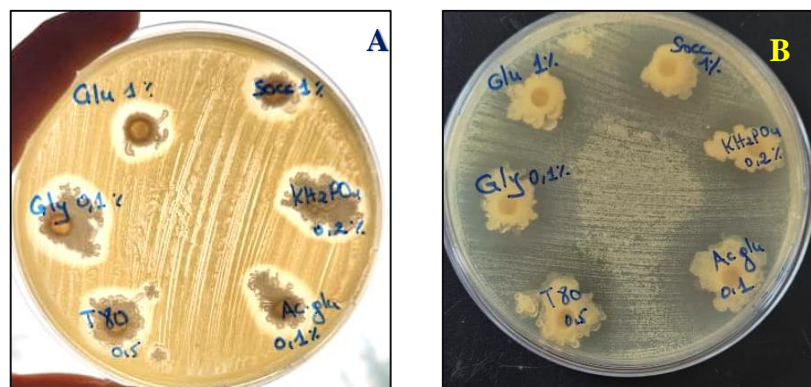


Figure N° 2 : Photos résultats de l'activité antimicrobienne, par la technique des cylindres d'agar, de l'isolat LMB3073 cultivé sur milieu GN à 10% NaCl à différentes sources nutritives, vis-à-vis *Micrococcus luteus* (A) et *Staphylococcus aureus* (B).

Tableau N° 4: Diamètres (en mm) des zones d'inhibition obtenus en présence de différentes sources nutritives (production des antimicrobiens sur milieu gélosé)

| | Sources de carbone | | | | | | | | Sources d'azote | | | | Source de phosphore | |
|------------------------------------|--------------------|-----|------------|-----|----------|-----|----------|----|------------------|----|-------------------|------|---------------------------------|----|
| | Glucose | | Saccharose | | Glycérol | | Tween 80 | | Acide glutamique | | Extrait de levure | | KH ₂ PO ₄ | |
| | 1% | 10% | 1% | 10% | 1% | 10% | 0.5% | 5% | 0.1% | 1% | 0,2% | 0,5% | 0,2% | 2% |
| <i>Bacillus cereus</i> | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 16 | - | - | - |
| <i>Bacillus subtilis</i> | 9 | - | 7 | - | 9 | - | 7 | - | 10 | - | 13 | - | 6 | - |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 8 | - | 8 | - | 9 | - | 10 | - | 7 | - | 15 | - | 8 | - |
| <i>Micrococcus luteus</i> | 11 | 14 | 12 | 12 | 10 | 7 | 18 | 6 | 11 | - | 16 | - | 11 | 8 |
| <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 | - | - | 7 |

Tableau N° 5: Diamètres (en mm) des zones d'inhibition obtenus en présence de différentes sources nutritives (production des antimicrobiens sur milieu liquide)

| | Sources de carbone | | | | | | | | Sources d'azote | | | | Source de phosphore | |
|------------------------------------|--------------------|-----|------------|-----|----------|-----|----------|----|------------------|----|-------------------|------|---------------------------------|----|
| | Glucose | | Saccharose | | Glycérol | | Tween 80 | | Acide glutamique | | Extrait de levure | | KH ₂ PO ₄ | |
| | 1% | 10% | 1% | 10% | 1% | 10% | 0.5% | 5% | 0.1% | 1% | 0,2% | 0,5% | 0,2% | 2% |
| <i>Bacillus cereus</i> | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 13 | - | - | - |
| <i>Bacillus subtilis</i> | - | 22 | - | - | - | 26 | - | - | - | - | 11 | 8 | - | - |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 12 | - | - | - |
| <i>Micrococcus luteus</i> | - | 28 | - | 22 | - | 40 | 18 | - | - | - | 13 | 12 | - | 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 | - | - | - |

A partir des **tableaux N° 4 et N° 5**, il apparaît que :

- Les concentrations élevées des sources nutritives (ex : 10% de glycérol ; 5% de Tween 80 ; 0.5% d'extrait de levure) entraînent souvent une diminution ou disparition totale de la production des métabolites antimicrobiens sur milieu gélosé par rapport aux faibles concentrations.
- Les sources de carbone utilisées favorisent la production sur milieu gélosé à faibles concentrations. À fortes concentrations, il y a disparition totale des activités inhibitrices de *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus*
- Pour la production sur milieu liquide, plus la concentration des sources augmente, plus il y aura une production de métabolites antimicrobiens à l'exception de Tween 80 et extrait de levure.
- À faible concentration, l'acide glutamique stimule la production des antimicrobiens, mais seulement sur milieu gélosé. Sur milieu liquide aucune production n'a été exprimée.
- L'extrait de levure à 0.2% semble la meilleur source d'azote qui favorise la production des antimicrobiens que ce soit sur milieu gélosé ou liquide. Il stimule la biosynthèse des antimicrobiens agissant sur la majorité des germes de référence testés.
- Les milieux liquides avec des concentrations élevées de certaines sources, comme Glucose, saccharose et KH_2PO_4 , induisent des diamètres plus grands qu'en milieu solide.

2. Discussion

Dans cette étude, on s'est intéressé à optimiser la production des métabolites antimicrobiens par une souche halotolérante LMB3073, en testant plusieurs conditions : la consistance du milieu de culture (gélosé et liquide), la salinité (absence et présence de 10% de NaCl) et de différentes sources nutritives (sources de carbone, sources d'azote et source de phosphore)

Cette souche a été isolée par Dr. NAS Fatima en février 2014, à partir des échantillons d'eau prélevés de la grande sebkha d'Oran. Son isolement a été effectué sur Bouillon Nutritif à 10% de NaCl, elle a été identifiée par séquençage de son gène codant l'ARNr 16S et affiliée au genre *Bacillus*. Elle possède un caractère poly-extrêmophile, dont elle est capable de se développer dans de large plage de température (15 à 60°C), de pH (5 à 11) et de salinité (de 0 à 20% de NaCl) (Nas *et al.*, 2021).

Dans un premier temps, nous avons étudié en parallèle l'effet du milieu de culture et de la salinité sur la biosynthèse des activités antimicrobiennes par l'isolat. L'ensemble de résultats obtenus a montré que la production sur milieu gélosé est plus rentable que la production sur milieu liquide

Pareilles conclusions ont été rapportées par certaines études qui ont montré que la production sur milieu solide présente une rentabilité nettement supérieure à celle effectuée en milieu liquide. En règle générale, la fermentation en milieu solide est particulièrement adaptée aux micro-organismes cultivés dans des conditions aérobies et caractérisés par une faible activité en eau, et puisque l'oxygène est apporté directement aux microorganismes, les besoins énergétiques demeurent modestes, ce qui permet d'obtenir des rendements plus élevés en métabolites secondaires sur des périodes plus courtes (**Demain, 1999 ; Al-Ansari et al., 2019**).

De même, **Hosny et al. (2011)** ont isolé une espèce bactérienne à partir de la mer méditerranéenne identifiée comme *Bacillus licheniformis* NRC-18, capable de produire des substances antimicrobiennes seulement sur milieu solide et ont expliqué ce résultat par l'incapacité de ces composés antimicrobiens synthétisés par cette souche à se diffuser dans les milieux aqueux.

Certains métabolites secondaires ne peuvent être synthétisés que par fermentation sur milieu solide, même lorsque la croissance microbienne est significative en milieu liquide. Un excellent exemple est la conioctin qui est un antibiotique efficace contre les bactéries et les champignons ainsi que contre *Staphylococcus aureus* multi-résistants. Cet antibiotique est produit par l'ascomycète *Coniochaeta ellipsoidea* en fermentation solide alors que sur milieu liquide ce champignon ne l'a jamais produit malgré une bonne croissance (**Kumar et al., 2020**).

Dans leur analyse comparative par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) des extraits de *Streptomyces* spp issus de milieux liquides et solides, **Kibret et al. (2018)** ont identifié de nouveaux métabolites secondaires uniquement présents dans les extraits provenant du milieu solide gélosé. Ces résultats suggèrent que cette approche de culture présente un fort potentiel pour de futures démarches de bioprospection.

Les résultats ont également révélé que l'ajout de NaCl améliore la production de substances antimicrobiennes, comme en témoignent les diamètres des zones d'inhibition, significativement plus élevés en présence de 10 % de NaCl par rapport à l'absence de sel. Les témoins (cylindre d'agar avec NaCl et BN contenant 10 % de NaCl) n'ont montré aucun effet inhibiteur, confirmant ainsi que ce n'est pas le NaCl qui exerce directement une action antimicrobienne, mais qu'il stimule plutôt la souche à produire un taux important de métabolites antimicrobiens. Ces observations rejoignent les observations rapportées **Nas et al. (2021)**.

Les résultats ont également montré que les bactéries à Gram positif présentent une sensibilité plus élevée que les bactéries à Gram négatif vis-à-vis les métabolites produit par la souche LMB3073. Ces observations concordent avec plusieurs études antérieures, qui ont rapporté que les activités antimicrobiennes produites par les espèces du genre *Bacillus* sont généralement plus efficaces contre les bactéries à Gram positif. Cette différence s'explique par le fait que les *Bacillus* synthétisent principalement des peptides antimicrobiens actifs spécifiquement contre les bactéries à Gram positif (Syed *et al.*, 2009 ; Awais *et al.*, 2010 ; Chen *et al.*, 2010).

La souche a exercé une activité modeste contre *Candida albicans*, légèrement augmentée en présence de NaCl. Cela pourrait s'expliquer par la stimulation de la synthèse de lipopeptides antifongiques comme les bacillomycines (Stein, 2005 ; Stoica *et al.*, 2019).

L'isolat LMB3073 n'a montré aucune activité vis-à-vis *Pseudomonas aeruginosa*, cela pourrait être dû à l'absence des cibles chez les germe test ou bien le taux de production de composés antimicrobiens n'est pas suffisant pour atteindre le seuil d'inhibition, à savoir la concentration minimale inhibitrice pour chaque microorganisme test utilisé. L'absence de l'activité antimicrobienne peut être expliquée également par le fait *Pseudomonas aeruginosa* possède des mécanismes de résistance inhibiteurs de ces activités antimicrobiennes même si celles-ci sont produites en quantités suffisantes.

Quant aux l'influence des sources nutritives sur la production des activités antimicrobiennes, les résultats nous ont montré que la production d'activités antimicrobiennes varie en fonction du type et de la concentration des sources nutritives utilisées, cela 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).

Conclusion
et
Perspectives

Ce travail de a porté sur l'optimisation de la production des activités antimicrobiennes par une souche poly-extrêmophile du genre *Bacillus*, isolée de la grande sebkha d'Oran (Algérie). L'objectif principal était d'évaluer l'influence de diverses conditions de culture (salinité, consistance du milieu, et sources nutritives) sur la capacité de la souche LMB3073 à produire des métabolites antimicrobiens.

Cette étude s'inscrit dans un contexte où la résistance aux antibiotiques devient un enjeu majeur de santé publique, et où la recherche de nouvelles molécules antimicrobiennes, notamment issues d'environnements extrêmes, représente une piste prometteuse.

Les méthodes employées dans ce travail ont combiné des approches microbiologiques classiques et des techniques standardisées pour évaluer l'activité antimicrobienne ;

Dans un premier temps, la production de métabolites antimicrobiens par la souche a été explorée la sur milieu gélosé (Gélose Nutritive) et milieu liquide (Bouillon nutritif) en absence de sel et en présence de 10% de NaCl. Les résultats ont montré que La production d'antimicrobiens était significativement plus élevée sur milieu gélosé et en présence de 10% de NaCl.

Dans un second temps, et sur la base des résultats des résultats démontrant l'effet stimulant du NaCl, la concentration de 10% de NaCl a été systématiquement maintenue lors de l'étude de l'influence des différentes sources nutritionnelles sur la production des métabolites antimicrobiens. Les résultats obtenus ont mis en évidence une modulation significative de la production en fonction de la nature et de la concentration des sources nutritionnelles. En effet, certaines combinaisons ont induit une stimulation marquée de l'activité antimicrobienne, tandis que d'autres ont conduit à une inhibition partielle ou totale de cette production. Ces observations soulignent l'importance d'un apport contrôlé et équilibrer de source de carbone, d'azote ou de phosphore pour optimiser le rendement de production de métabolites bioactifs.

Ces résultats s'intègrent dans une perspective plus large de valorisation des ressources microbiennes des milieux extrêmes pour la découverte de nouveaux composés bioactifs.

En perspective, il serait intéressant de poursuivre ce travail par l'identification structurale et fonctionnelle des composés antimicrobiens produits, en utilisant des techniques analytiques telles que les techniques chromatographique, la spectrométrie de masse et la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN).

Conclusion et Perspectives

Il serait également pertinent tester d'autres paramètres (température, pH, aération) pour maximiser la production et de séquencer le génome de la souche pour identifier les gènes responsables de la biosynthèse des antimicrobiens.

Par ailleurs, l'évaluation de l'efficacité de ces métabolites *in vivo* et l'étude de leur toxicité seraient une étape cruciale pour envisager des applications industrielles, pharmaceutiques ou agroalimentaires.

En fin, cette étude a démontré le potentiel de la souche *Bacillus* LMB3073 comme source de molécules antimicrobiennes, tout en soulignant l'importance des conditions de culture pour optimiser leur production. Les résultats obtenus contribuent à la compréhension des microorganismes extrêmophiles et ouvrent la voie à des applications pratiques dans la lutte contre l'antibiorésistance et incitent également l'exploration d'autres habitats extrêmes algériens, riches en biodiversité microbienne, qui pourrait représenter une piste prometteuse pour la découverte de nouvelles souches productrices de biomolécules d'intérêt.

Références
bibliographiques

Références bibliographiques

1. **Abbamondi, G. R., Kambourova, M., Poli, A., Finore, I., & Nicolaus, B. (2019).** Quorum Sensing in Extremophiles. *Quorum Sensing*, 97–123. <https://doi:10.1016/b978-0-12-814905-8.00004-6>.
2. **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>
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. **Albuquerque, L., Tiago, I., Taborda, M., Nobre, M. F., Veríssimo, A., & da Costa, M. S. (2008).** *Bacillus isabeliae* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from a sea salt evaporation pond. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 58 (1), 226–230. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65217-0>.
5. **Amoozegar, M. A., Sánchez-Porro, C., Rohban, R., Hajighasemi, M. & Ventosa, A. (2009).** *Bacillus persepolensis* sp. nov., a moderately halophilic bacterium from a hypersaline lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59, 2352–2358.
6. **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>.
7. **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>.
8. **Awais, M., Pervez, A., Yaqub, A., & Shah, M. M. (2010).** Production of antimicrobial metabolites by *Bacillus subtilis* immobilized in polyacrylamide gel. *Pakistan Journal of Zoology*. 42 (3) 267-275.
9. **Bagheri, M., Didari, M., Amoozegar, M. A., Schumann, P., Sánchez-Porro, C., Mehrshad, M., & Ventosa, A. (2012).** *Bacillus iranensis* sp. nov., a moderate halophile from a hypersaline lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(4), 811–816. <https://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.030874-0>.

Références bibliographiques

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. **Berkeley, R., Heyndrickx, M., Logan, N., & De Vos, P. (2002).** Applications and Systematics of *Bacillus* and Relatives. © Blackwell Science Ltd.
12. **Boetius, A., Anesio, A. M., Deming, J. W., Mikucki, J. A., & Rapp, J. Z. (2015).** Microbial ecology of the cryosphere: sea ice and glacial habitats. *Nature reviews. Microbiology*, 13(11), 677–690. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3522>.
13. **Bowers, K. J., Mesbah, N. M., & Wiegel, J. (2009).** Biodiversity of poly-extremophilic Bacteria: does combining the extremes of high salt, alkaline pH and elevated temperature approach a physico-chemical boundary for life? *Saline Systems*, 5(1), 9. <http://doi.org/10.1186/1746-1448-5-9>.
14. **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>.
15. **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.
16. **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.
17. **CLSI, (2012).** Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, Approved Standard, 7th ed., CLSI document M02-A11. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087, USA, 2012
18. **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>.
19. **Das, K., Tiwari, R.K.S., D.K. Shrivastava (2010),** Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agents: current methods and future trends, *J. Med. Plants Res.* 4 ,104–111.

Références bibliographiques

20. **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.
21. **Demain, A. L. (1999).** Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. *Applied microbiology and biotechnology*, 52 (4), 455–463. <https://doi.org/10.1007/s002530051546>.
22. **Didari, M., Amoozegar, M. A., Bagheri, M., Mehrshad, M., Schumann, P., Spröer, C., & Ventosa, A. (2013).** *Bacillus persicus* sp. nov., a halophilic bacterium from a hypersaline lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(Pt 4), 1229–1234. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.042689-0>.
23. **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).
24. **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>.
25. **Echigo, A., Hino, M., Fukushima, T., Mizuki, T., Kamekura, M., & Usami, R. (2005).** Endospores of halophilic bacteria of the family *Bacillaceae* isolated from non-saline Japanese soil may be transported by Kosa event (Asian dust storm). *Saline systems*, 1, 8. <https://doi.org/10.1186/1746-1448-1-8>.
26. **Elleuch, L., Shaaban, M., S. Smaoui, et al., (2010)** Bioactive secondary metabolites from a new terrestrial *Streptomyces* sp. TN262, *Applied Biochemical Biotechnology*. 162 579–593
27. **Fritze D. 2004.** Taxonomy of the Genus *Bacillus* and Related Genera: The Aerobic Endospore-Forming Bacteria, *Phytopathology*. 94 (1), 1245-1248.
28. **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.
29. **Gonsalves, V., Nayak, S., & Nazareth, S. (2012).** Halophilic fungi in a polyhaline estuarine habitat. *Journal of Yeast and Fungal Research*, 3(3): 30 - 36. <https://doi.org/10.5897/JYFR12.007>.

Références bibliographiques

30. **Guevara-Luna, J., Arroyo-Herrera, I., Tapia-García, E. Y., Estrada-de Los Santos, P., Ortega-Nava, A. J., & Vásquez-Murrieta, M. S. (2024).** Diversity and biotechnological potential of cultivable halophilic and halotolerant bacteria from the "Los Negritos" geothermal area. *Microorganisms*, 12 (3), 482. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12030482>.
31. **Gunde-Cimerman, N., Plemenitaš, A., & Oren, A. (2018).** Strategies of adaptation of microorganisms of the three domains of life to high salt concentrations. *FEMS microbiology reviews*, 42(3),353–375. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy009>.
32. **Guschin A., Ryzhikh P., Rummyantseva T., et al.,** Treatment efficacy, treatment failures and selection of macrolide resistance in patients with high load of *Mycoplasma genitalium* during treatment of male urethritis with Josamycin, *BMC Infect. Dis.* 15 (2015) 1–7.
33. **Hänelt, I., & Müller, V. (2013).** Molecular mechanisms of adaptation of the moderately halophilic bacterium *Halobacillus halophilus* to its environment. *Life (Basel, Switzerland)*, 3(1), 234–243.
34. **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.
35. **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>.
36. **Kochhar, N., I K, K., Shrivastava, S., Ghosh, A., Rawat, V. S., Sodhi, K. K., & Kumar, M. (2022).** Perspectives on the microorganism of extreme environments and their applications. *Current research in microbial sciences*, 3, 100134. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2022.100134>.
37. **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.
38. **Kushner, D. J. (1985).** The *Halobacteriaceae* In: the Bacteria: Academic press, London. Vol. 8, pp. 171.
39. **MacElroy, R. D. (1974).** Some comments on the evolution of extremophiles. *Biosystems*, 6(1),74-75.

Références bibliographiques

40. **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>.
41. **Mehta D. et Satyanarayana T. 2013.** Chapitre: Diversity of Hot Environments and Thermophilic Microbes. *In* T. Satyanarayana et al. (eds.), *Thermophilic Microbes in Environmental and Industrial Biotechnology: Biotechnology of Thermophiles*. 3-60.
42. **Nabti, E. H., Mokrane, N., Ghouli, 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>.
43. **Nas, F. (2022).** Recherche de souches extrêmophiles du genre *Bacillus* productrices de composés antimicrobiens issues de la Grande Sebkhâ d’Oran. Thèse de doctorat, Université Abou Bakr Belkaid de Tlemcen.
44. **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 Sebkhâ of Oran. *International Microbiology*, 24(3), 455–470. <https://doi.org/10.1007/s10123-021-00185-x>.
45. **Nazareth, S. W. (2014).** The world of halophilic fungi. *KAVAKA*, 42: 131-144.
46. **Niimura, Y., Koh, E., Yanagida, F., Suzuki, K.I., Komagata, K. & Kozaki, M. (1990).** *Amphibacillus xylanus* gen. nov., sp. nov., a facultatively anaerobic spore-forming xylan-digesting bacterium which lacks cytochrome, quinone, and catalase. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 40(3), 297-301. <https://doi.org/10.1099/00207713-40-3-297>.
47. **Oren, A. (2002).** Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 28(1), 56–63. <http://doi.org/10.1038/sj/jim/7000176>
48. **Oren, A. (2006).** Life at High Salt Concentrations. *In*: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H., Stackebrandt E. (eds) *The Prokaryotes*. Springer, New York, NY. 2:263-282. https://doi.org/10.1007/0-387-30742-7_9.
49. **Oren, A. (2008).** Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Saline Systems*, 4(1), 2. <https://doi.org/10.1186/1746-1448-4-2>.

50. **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>.
51. **Raddadi, N., Cherif, A., Daffonchio, D., Neifar, M., & Fava, F. (2015).** Biotechnological applications of extremophiles, extremozymes and extremolytes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(19), 7907–7913. <http://doi.org/10.1007/s00253-015-6874-9>.
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. **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>.
55. **Shivanand, P., & Mugeraya, G. (2011).** Halophilic bacteria and their compatible solutes—osmoregulation and potential applications. *Current Science*, 100 (10), 1516-1521.
56. **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>.
57. **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>.
58. **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.
59. **Sysoev, M., Grötzinger, S. W., Renn, D., Eppinger, J., Rueping, M., & Karan, R. (2021).** Bioprospecting of Novel Extremozymes From Prokaryotes-The Advent of Culture-

Références bibliographiques

- Independent Methods. *Frontiers in microbiology*, 12, 630013. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.630013>.
60. **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>.
61. **Tiquia, S. M., Davis, D., Hadid, H., Kasparian, S., Ismail, M., Sahly, R., Shim, J., Singh, S., & Murray, K. S. (2007).** Halophilic and halotolerant bacteria from river waters and shallow groundwater along the Rouge River of southeastern Michigan. *Environmental technology*, 28 (3), 297–307. <https://doi.org/10.1080/09593332808618789>.
62. **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.
63. **Wisotzkey, J. D., Jurtshuk, P., Jr, Fox, G. E., Deinhard, G., & Poralla, K. (1992).** Comparative sequence analyses on the 16S rRNA (rDNA) of *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestris*, and *Bacillus cycloheptanicus* and proposal for creation of a new genus, *Alicyclobacillus* gen. nov. *International journal of systematic bacteriology*, 42(2), 263–269. <https://doi.org/10.1099/00207713-42-2-263>.
64. **Yumoto, I., Hirota, K., Goto, T., Nodasaka, Y., & Nakajima, K. (2005).** *Bacillus oshimensis* sp. nov., a moderately halophilic, non-motile alkaliphile. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 55 (2), 907–911. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63488-0>.
65. **Yumoto, I., Yamaga, S., Sogabe, Y., Nodasaka, Y., Matsuyama, H., Nakajima, K., & Suemori, A. (2003).** *Bacillus krulwichiae* sp. nov., a halotolerant obligate alkaliphile that utilizes benzoate and m-hydroxybenzoate. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 53 (5), 1531–1536. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02596-0>.
66. **Zhang, L., Wang, Y., Dai, J., Tang, Y., Yang, Q., Luo, X., & Fang, C. (2009).** *Bacillus korlensis* sp. nov., a moderately halotolerant bacterium isolated from a sand soil sample in China. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 59 (7), 1787–1792. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.004879-0>.
67. **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

تمثل مقاومة المضادات الحيوية تحدياً عالمياً رئيسياً للصحة العامة، مما يجعل استكشاف الكائنات الحية الدقيقة المتطرفة مصدراً واعداً للمركبات الحيوية النشطة ذات الأهمية الكبيرة. في هذا السياق، تهدف هذه الدراسة إلى تحسين إنتاج المستقلبات المضادة للميكروبات بواسطة سلالة بكتيرية LMB3073 المعزولة من سبخة وهران الكبرى (الجزائر). تتميز هذه السلالة بقدرتها على النمو في ظروف قاسية: تحمل الملوحة (0-20% كلوريد الصوديوم)، وتحمل الحرارة (15-60°C)، وتحمل القلوية (درجة حموضة 5-11). كان الهدف الرئيسي تقييم تأثير معايير مختلفة للزراعة (الملوحة، قوام الوسط، ومصادر التغذية) على قدرة السلالة لإنتاج مركبات مضادة للميكروبات. استخدم منهج بحثي يجمع بين الأساليب الميكروبيولوجية الكلاسيكية وتقنيات موحدة لتقييم النشاط المضاد للميكروبات. بعد إحياء السلالة من الحفظ في درجة حرارة 20°C، تم اختبار النشاط المضاد للميكروبات ضد تسعة كائنات دقيقة مستهدفة (4 بكتيريا إيجابية الغرام، 3 سلبية الغرام، وسلالتين من *Candida albicans*) باستخدام طريقتين متكاملتين: تقنية أسطوانات الأجار للكشف عن المستقلبات المنتجة على الأوساط الصلبة، وطريقة الأبار للكشف عن المستقلبات في الأوساط السائلة. كشفت النتائج الرئيسية أن الإنتاج كان أعلى بشكل ملحوظ في وجود 10% كلوريد الصوديوم. سُجلت أكبر مناطق تثبيط ضد *Bacillus* و *Micrococcus luteus* و *Staphylococcus aureus* و *cereus*. كانت الأوساط الصلبة أكثر ملاءمة من الأوساط السائلة، حيث أظهرت مناطق تثبيط أكبر باستمرار. من بين مصادر التغذية المختبرة، أظهر مستخلص الخميرة (0.2%) والجليسرول (1%) أفضل ملفات تحفيزية، بينما أدت التركيزات العالية (10%) لبعض مصادر الكربون إلى تثبيط الإنتاج. أظهرت السلالة نشاطاً تفضيلاً ضد البكتيريا إيجابية الغرام. تمثل هذه السلالة ومستقلباتها مرشحاً واعداً لتطبيقات بيوتكنولوجية متنوعة.

الكلمات المفتاحية: *Bacillus*، نشاط مضاد للميكروبات، تحسين الإنتاج، مستقلبات ثانوية

Abstract

Antibiotic resistance represents a major global public health challenge, making the exploration of extremophilic microorganisms as sources of novel bioactive compounds of significant interest.

In this context, this study focuses on optimizing the production of antimicrobial metabolites by a polyextremophilic bacterial strain, *Bacillus* sp. LMB3073, isolated from the Great Sebkhah of Oran (Algeria). This strain is characterized as halotolerant (growth at 0–20% NaCl), (15–60°C), and alkalitolerant (pH 5–11).

The primary objective was to evaluate the influence of different culture parameters (salinity, medium consistency, and nutrient sources) on the strain's ability to produce antimicrobial substances.

The methodology combined classical microbiological approaches with standardized techniques for assessing antimicrobial activity. After reviving the strain from -20°C storage, antimicrobial activity was tested against nine target microorganisms (4 Gram-positive bacteria, 3 Gram-negative bacteria, and 2 *Candida albicans* strains) using two complementary methods: the agar cylinder technique to detect metabolites produced on solid media and the well diffusion assay for metabolites in liquid culture. Obtained results revealed that production was significantly higher in the presence of 10% NaCl. The largest inhibition zones were observed against *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus*, and *Staphylococcus aureus*. Solid media proved more favorable than liquid media, consistently yielding larger inhibition zones. Among the tested nutrient sources, yeast extract (0.2%) and glycerol (1%) showed the highest stimulation profiles, whereas elevated concentrations (10%) of certain carbon sources inhibited production. The strain exhibited preferential activity against Gram-positive bacteria.

This isolate and its metabolites represent a promising candidate for various biotechnological applications.

Keywords: Extremophilic *Bacillus*, antimicrobial activity, production optimization, secondary metabolites.

Résumé

La résistance aux antibiotiques représente un enjeu mondial de santé publique, l'exploration des microorganismes extrêmophiles comme source de nouveaux composés bioactifs présente un intérêt majeur.

Dans un contexte, ce travail vise à l'optimisation de la production des métabolites antimicrobiens par une souche bactérienne poly-extrêmophile, *Bacillus* sp. LMB3073, isolée à partir de la grande Sebkhah d'Oran (Algérie), caractérisée comme halotolérante (croissance entre 0-20% NaCl), thermotolérante (15-60°C) et alcalitolerante (pH 5-11).

L'objectif principal était d'évaluer l'influence de différents paramètres de culture (salinité, consistance du milieu et sources nutritives) sur la capacité de la souche LMB3073 à produire des substances antimicrobiennes.

La méthodologie utilisée a combiné des approches microbiologiques classiques avec des techniques standardisées d'évaluation de l'activité antimicrobienne. Après revivification de la souche conservée à -20°C, l'activité antimicrobienne a été testée contre neuf microorganismes cibles (4 bactéries à Gram positif, 3 à Gram négatif, et 2 souches de *Candida albicans*) par deux méthodes complémentaires : la technique des cylindres d'agar pour mettre en évidence les métabolites produits sur milieu gélosé et la méthode des puits pour mettre en évidence les métabolites produits sur milieu liquide.

Les principaux résultats ont révélé que la production était significativement plus élevée en présence de 10% de NaCl. Les diamètres d'inhibition les plus importants concernaient *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus*. Le milieu gélosé s'est avéré plus favorable que le milieu liquide, avec des zones d'inhibition systématiquement plus larges. Parmi les sources nutritives testées, l'extrait de levure (0,2%) et le glycérol (1%) ont montré les meilleurs profils de stimulation, tandis que des concentrations élevées (10%) de certaines sources carbonées inhibaient la production. La souche a démontré une activité préférentielle contre les bactéries Gram positif.

Cet isolat ainsi que ses métabolites peut constituer un candidat prometteur pour diverses applications biotechnologiques.

Mots clés : *Bacillus* extrêmophiles, activité antimicrobienne, optimisation de production, métabolites secondaires.