



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

**Université ABOU BAKR BELKAID de Tlemcen**  
**Faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la**  
**terre et de l'univers Département de Biologie**  
**Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agro-alimentaire,**  
**Au Biomédical et à l'Environnement**



## **Mémoire**

**Présenté par**

**M<sup>elle</sup> BENNABI Ghaniya**

**M<sup>elle</sup> CHERFI Imane**

**En vue de l'obtention du diplôme de Master académique**

**Filière : Sciences Biologiques**

**Spécialité : Microbiologie et Contrôle de Qualité**

## **Thème**

**Recherche de la production des composés  
antimicrobiens par une bactérie extrêmophile.**

**Soutenu le 23 /06/ 2026**

**Devant le jury composé de :**

|                     |                                  |                                               |
|---------------------|----------------------------------|-----------------------------------------------|
| <b>Présidente</b>   | <b>Dr. BEY Faïza</b>             | <b>M.A.A. l'Université de Tlemcen-Algérie</b> |
| <b>Encadrante</b>   | <b>Dr. NAS Fatima ep. RABEHI</b> | <b>M.C.B. Université de Tlemcen-Algérie</b>   |
| <b>Examinatrice</b> | <b>Dr. BOUMEDIENE Karima</b>     | <b>M.C.B. Université de Tlemcen-Algérie</b>   |

**Année universitaire 2025-2026**

# Remerciement

Avant tout, nous remercions Allah, le Très Miséricordieux et le Tout-Puissant, qui nous a accordé la force, la patience et le courage nécessaires pour mener ce travail à son terme.

Nous adressons nos sincères remerciements aux membres du jury pour l'honneur qu'ils nous font en acceptant d'évaluer ce travail :

- ❖ **Dr. BEY faïza**, Maîtres assistant A. à l'Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen, qui a bien voulu présider ce jury.
- ❖ **Dr. BOUMEDIENE Karima**, Maître de Conférences B. à l'Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen, qui a accepté d'examiner ce mémoire.

Nous sommes profondément honorée par l'intérêt porté à ce travail et très reconnaissante pour les remarques et les conseils que vous voudrez bien lui apporter

Nos remerciements les plus chaleureux s'adressent à notre promotrice, **Mme NAS Fatima**, Maître de Conférences B à l'Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen, pour son encadrement, sa disponibilité, ses orientations précieuses et son soutien constant tout au long de cette étude. Nous avons eu le privilège et l'honneur de travailler sous sa direction.

Nous tenons également à exprimer notre gratitude à l'ensemble des enseignants du Département de Biologie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie ainsi que des Sciences de la Terre et de l'Univers, dont les enseignements et les conseils ont grandement contribué à ma formation universitaire.

Nos remerciements vont aussi à tous les membres du Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, au Biomédical et à l'Environnement (LAMAABE), pour leur accueil et leur collaboration.

Enfin, nous adressons notre profonde reconnaissance à toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail. Leur soutien, leurs encouragements et leur confiance ont été d'une grande importance dans l'aboutissement de ce projet.

## Dédicace

Je dédie ce modeste travail, fruit de plusieurs années d'efforts, de patience et de persévérance, à toute personne qui a cru en moi et m'a soutenue de près ou de loin. À ma très chère mère,  
Source d'amour, de tendresse et de sacrifice. Merci pour ton soutien, ta patience et tes prières. Tu as été ma force dans les moments difficiles et ma lumière. Que Dieu te protège et te bénisse.

À la mémoire de mon cher père,  
Qui nous a quittés, mais dont l'amour et les valeurs restent gravés en moi. Ton absence est une douleur, mais ta présence demeure dans mon cœur. Que Dieu t'accueille dans Son paradis.

À mes chers frères Zakaria, Houari et Abdelhak,  
Merci pour votre amour, votre soutien et votre présence. Vos encouragements ont été une grande source de force tout au long de mon parcours. Je vous souhaite bonheur, réussite et succès.

À ma très chère famille,  
Pour leur bienveillance, leur soutien et leur présence tout au long de mon parcours. Merci pour vos encouragements, votre gentillesse et votre intérêt constant pour ma réussite.

À mes chers amis khadidja , Imane , Ibtissam, Aïcha et maghniya,  
Pour leur présence précieuse, leur soutien sincère et les moments partagés, merci d'avoir été à mes côtés. Votre amitié a été une source de réconfort et de motivation.

À mon encadrante, Madame NAS Fatima Zohra,  
Je vous remercie sincèrement pour votre encadrement, votre disponibilité et vos précieux conseils, qui ont grandement contribué à la réalisation de ce mémoire, je vous exprime toute ma gratitude et mon respect.

**Ghaniya**

# Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

À tous ceux qui ont contribué, de près ou de loin, à l'aboutissement de ce parcours et à la réalisation de ce mémoire.

❖ À mes très chers parents,

À ma mère Khadra, symbole de tendresse, de dévouement et de générosité, qui n'a cessé de m'encourager et de me soutenir tout au long de mes études. Aucun sacrifice n'a été trop grand pour mon bien-être et ma réussite. Que Dieu la protège et lui accorde une longue vie pleine de santé et de bonheur.

À mon père Boumediene, pour son soutien inconditionnel, sa patience, ses précieux conseils et tous les efforts consentis afin de me permettre d'atteindre ce niveau. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance et de mon immense respect.

❖ À mes chers frères Aymen et Oussama, ainsi qu'à ma chère sœur Amani, pour leur affection, leur soutien et leurs encouragements. Je leur souhaite un avenir rempli de réussite, de bonheur et de prospérité.

❖ À mon cher mari, pour sa présence, sa patience, sa compréhension et son soutien indéfectible durant toute cette période. Merci pour la confiance et la sérénité que tu m'as apportées.

❖ À toute ma famille, qui a toujours cru en moi et m'a accompagnée avec amour et bienveillance.

❖ À mes très chères amies Samah, Chaïma, Souhaila et Ghaniya, pour leur amitié sincère, leur aide précieuse et les merveilleux moments partagés. Que Dieu vous protège et vous préserve.

❖ Enfin, j'adresse mes sincères remerciements à notre encadreur Mme NAS Fatima pour son accompagnement, sa disponibilité, ses conseils avisés et son soutien tout au long de la réalisation de ce travail.

**Imane**

# Table des matières

## ملخص

## Abstract

## Résumé

## Liste des Abréviations

## Liste des figures

## Liste des tableaux

## Introduction ..... 3

## 1 Synthèse bibliographique

1. Généralités sur les bactéries extrêmophiles..... 3
2. Les principales catégories de microorganismes extrêmophiles..... 3
  - 2.1 Les microorganismes halophiles et halotolérants ..... 3
  - 2.2 Les microorganismes thermophiles et psychrophiles ..... 4
  - 2.3 Les microorganismes acidophiles et alcalophiles ..... 4
  - 2.4 Autres microorganismes extrêmophiles ..... 5
3. Métabolites secondaires des microorganismes extrêmophiles à activité antimicrobienne..... 5
  - 3.1 Les peptides antimicrobiens (AMPs)..... 6
  - 3.2 Les bacteriocines..... 6
  - 3.3 Les biosurfactants ..... 7
  - 3.4 Les pigments bioactifs ..... 8
4. Les bactéries du genre *Bacillus* ..... 9
  - 4.1 Taxonomie et caractéristique bactériologique du genre *Bacillus* ..... 9
  - 4.2 Habitats des espèces du genre *Bacillus* ..... 9
  - 4.3 Potentiel biotechnologiques des espèces du genre *Bacillus* ..... 9

## Matériel et méthodes

1. Origine de la souche et conditions de culture ..... 11
2. Revivification et vérification de la pureté de la souche LMB3093 ..... 11
3. Caractérisation phénotypique de l'isolat LMB3093 ..... 11
  - 3.1 .Détermination des caractères microscopiques et macroscopiques ..... 11

|                                         |                                                                                                  |           |
|-----------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.2                                     | .Détermination des caractères physiologiques .....                                               | 11        |
| 3.3                                     | .Détermination des caractères biochimiques .....                                                 | 12        |
| 3.3.1                                   | .La galerie API 20 E.....                                                                        | 12        |
| 3.3.2                                   | .Mise en évidence de la catalase .....                                                           | 12        |
| 3.3.3                                   | .Mise en évidence de la Cytochrome-oxydase .....                                                 | 13        |
| 4.                                      | Criblage des activités antimicrobiennes de la souche LMB3093 .....                               | 13        |
| 4.1                                     | Standardisation des inocula des souches de référence.....                                        | 13        |
| 4.2                                     | . Recherche de la production des composés antimicrobiens sur milieu gélosé                       | 14        |
| 4.3                                     | .La recherche de la production des composés antimicrobiens sur milieu liquide                    | 14        |
| 5.                                      | L'extraction des métabolites antimicrobiens de l'isolat LMB3093 .....                            | 15        |
| 6.                                      | Evaluation du pouvoir antimicrobien des différents extraits obtenus .....                        | 16        |
| <b>Résultats et discussions</b>         |                                                                                                  |           |
| <b>1. Résultats</b>                     |                                                                                                  |           |
| 1.1                                     | Caractérisation phénotypique de l'isolat LMB3093 .....                                           | 17        |
| 1.1.1                                   | Détermination des caractères microscopiques .....                                                | 17        |
| 1.1.2                                   | Détermination des caractères macroscopiques .....                                                | 17        |
| 1.1.3                                   | Détermination des caractères physiologiques .....                                                | 18        |
| 1.1.4                                   | Détermination des caractères biochimiques .....                                                  | 18        |
| 1.2                                     | Criblage des activités antimicrobiennes de la souche LMB3093 .....                               | 20        |
| 1.2.1                                   | Recherche de la production des métabolites antimicrobiens sur milieu gélosé<br>et milieu liquide |           |
| 1.2.2                                   | Extraction des métabolites antimicrobiens de l'isolat LMB3093                                    | 21        |
| <b>2. Discussions</b>                   |                                                                                                  |           |
| <b>Conclusion et perspectives.....</b>  |                                                                                                  | <b>26</b> |
| <b>Références bibliographiques.....</b> |                                                                                                  | <b>28</b> |
| <b>Annexe.....</b>                      |                                                                                                  | <b>30</b> |

## ملخص

يتناول هذا العمل دراسة سلالة بكتيرية متعددة التحمل للظروف القاسية Polyextremophile تدعى LMB3093، تم عزلها من السبخة الكبرى لوهران (الجزائر)، بهدف تقييم قدرتها على إنتاج مستقلبات ذات نشاط مضاد للميكروبات. بعد إحياء السلالة ودراسة خصائصها المظهرية، تم تقييم نشاطها المضاد للميكروبات باستخدام تقنية أسطوانات الأغار من المزارع النامية على الوسط الصلب، وتقنية الأبار باستعمال الراشح الفوقي للمزارع السائلة تجاه سلالات مرجعية من الكائنات الدقيقة.

بعد ذلك، تم استخلاص المستقلبات المنتجة باستعمال مذيبين مختلفي القطبية هما الإيثانول وأسيتات الإيثيل، ثم تم تحديد فعاليتها المضادة للميكروبات. أظهرت النتائج أن السلالة عبارة عن عصية موجبة الغرام، متحركة، وقادرة على النمو ضمن مجال واسع من الملوحة ودرجات الحرارة وقيم الأس الهيدروجيني، مما يؤكد طبيعتها متعددة التحمل للظروف البيئية القاسية.

كما كشف التحري الأولي عن نشاط مضاد للميكروبات ملحوظ خاصة ضد الأنواع *Micrococcus luteus* و *Bacillus cereus* و *Staphylococcus aureus* وتبين أن التخمر على الوسط الصلب أكثر ملاءمة لإنتاج المستقلبات المضادة للميكروبات مقارنة بالتخمر في الوسط السائل.

وقد أظهر المستخلص الإيثانولي أفضل نشاط ضد الأنواع التابعة لجنس *Bacillus*، في حين أظهر مستخلص أسيتات الإيثيل طيفاً أوسع من النشاط المضاد للميكروبات. وتبرز هذه النتائج الإمكانيات البيوتكنولوجية الواعدة للعزلة LMB3093 كمصدر محتمل لإنتاج جزيئات مضادة للميكروبات ذات أهمية كبيرة.

**الكلمات المفتاحية:** الكائنات الحية الدقيقة المحبة للظروف القاسية، النشاط المضاد للميكروبات، المستقلبات الثانوية، التخمر الصلب، التخمر السائل، الاستخلاص بالمذيبات.

## Abstract

This work focuses on the study of a polyextremophilic bacterial strain, designated LMB3093, isolated from the Great Sebkha of Oran (Algeria), with the aim of evaluating its potential for the production of antimicrobial metabolites. Following the revival and phenotypic characterization of the strain, its antimicrobial activity was assessed using the agar cylinder technique from solid cultures and the well diffusion method using culture supernatants against reference microorganisms.

The produced metabolites were subsequently extracted using two solvents of different polarities, ethanol and ethyl acetate, and their antimicrobial activities were evaluated. The results revealed that the strain is a Gram-positive, motile rod capable of growing over a wide range of salinity, temperature, and pH conditions, confirming its polyextremophilic nature.

Primary screening demonstrated significant antimicrobial activity, particularly against *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus*, and *Staphylococcus aureus*. Solid-state fermentation proved to be more favorable for the production of antimicrobial metabolites than liquid fermentation.

The ethanolic extract exhibited the highest activity against *Bacillus* species, whereas the ethyl acetate extract showed a broader spectrum of antimicrobial activity. These findings highlight the biotechnological potential of the LMB3093 isolate as a promising source of valuable antimicrobial molecules.

**Keywords :** extremophilic microorganisms, antimicrobial activity, secondary metabolites, solid-state fermentation, liquid fermentation, solvent extraction.

## Résumé

Ce travail porte sur l'étude d'une souche bactérienne polyextrêmophile, nommée LMB3093, isolée de la Grande Sebkha d'Oran (Algérie), afin d'évaluer son potentiel de production de métabolites antimicrobiens. Après la revivification et la caractérisation phénotypique de la souche, l'activité antimicrobienne a été évaluée par la technique des cylindres d'agar des cultures sur milieu solide et par la technique des puits du surnageant vis-à-vis des germes de référence. Les métabolites produits ont ensuite été extraits à l'aide de deux solvants de polarités différentes, l'éthanol et l'acétate d'éthyle, puis leurs activités antimicrobiennes ont été déterminées. Les résultats ont montré que la souche est un bâtonnet à Gram positif, mobile, capable de croître dans une large gamme de salinité, de température et de pH, confirmant son caractère polyextrêmophile. Le screening primaire a révélé une activité antimicrobienne particulièrement importante contre *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus*. La fermentation sur milieu solide s'est avérée plus favorable à la production des métabolites antimicrobiens que la fermentation liquide. L'extrait éthanolique a présenté la meilleure activité contre les espèces du genre *Bacillus*, tandis que l'extrait d'acétate d'éthyle a montré un spectre d'activité plus large. Ces résultats soulignent le potentiel biotechnologique de l'isolat LMB3093 comme source prometteuse de molécules antimicrobiennes importantes.

**Mots clés :** microorganismes extrêmophiles, activité antimicrobienne, métabolites secondaires, fermentation solide, fermentation liquide, extraction par solvants.

## Liste des abréviations

|                |   |                                                                          |
|----------------|---|--------------------------------------------------------------------------|
| <b>ADN</b>     | : | Acide désoxyribonucléique                                                |
| <b>AMPs</b>    | : | Peptides Antimicrobiens (Antimicrobial Peptides)                         |
| <b>ARN</b>     | : | Acide Ribonucléique                                                      |
| <b>ARNr16s</b> | : | Acide Ribonucléique Ribosomique 16S                                      |
| <b>DO</b>      | : | Densité optique                                                          |
| <b>EPS</b>     | : | Exo polysaccharides                                                      |
| <b>GN</b>      | : | Gélose nutritive                                                         |
| <b>KDa</b>     | : | Kilodalton                                                               |
| <b>M</b>       | : | Molaire                                                                  |
| <b>mL</b>      | : | Millilitre                                                               |
| <b>pH</b>      | : | Potentiel Hydrogène                                                      |
| <b>P/v</b>     | : | Poids/volume                                                             |
| <b>RiPPs</b>   | : | Peptides Ribosomiquement Synthétisés et Modifiés Post-traductionnellemen |
| <b>rpm</b>     | : | Rotation par minute                                                      |
| <b>V/v</b>     | : | Volume/volume                                                            |

## Liste des figures

|                    |                                                                                                                                                                                                                                                |           |
|--------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Figure N° 1</b> | : Filtration du surnageant à l'aide du filtre à seringue                                                                                                                                                                                       | <b>15</b> |
| <b>Figure N° 2</b> | : Photos des résultats de l'examen microscopique après coloration de Gram de l'isolat LMB3093 après 24 heures d'incubation à 30°C sur Gélose Nutritive à 10% de NaCl (A) et Gélose nutritive dépourvue de NaCl (B) (Objectif 100 à immersion). | <b>17</b> |
| <b>Figure N° 3</b> | : Photos de l'aspect des colonies de l'isolat LMB3093 après 24 heures d'incubation à 30°C sur Gélose Nutritive dépourvue de NaCl et à 1 % de NaCl.                                                                                             | <b>18</b> |
| <b>Figure N° 4</b> | : Photo du résultat de la caractérisation de l'isolat LMB3093 par la galerie API 20 E.                                                                                                                                                         | <b>19</b> |
| <b>Figure N° 5</b> | : Photos du résultat de la recherche des enzymes respiratoires : (A) la catalase et (B) le cytochrome oxydase.                                                                                                                                 | <b>19</b> |
| <b>Figure N° 6</b> | : Photos des résultats des activités antimicrobiennes par la technique des cylindres d'agar vis-à-vis <i>Candida albicans</i> (A) ; <i>Micrococcus luteus</i> (B) ; <i>Bacillus cereus</i> (C).                                                | <b>21</b> |

## Liste des tableaux

|                                                                                                                                   |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tableau N° 1</b> : les germes tests utilisés                                                                                   | 13 |
| <b>Tableau N° 2</b> : Résultat de la caractérisation de l'isolat LMB3093 par la galerie API 20E                                   | 19 |
| <b>Tableau N° 3</b> : Diamètres des zones d'inhibition obtenus par les techniques des cylindres d'agar et la technique des puits. | 20 |
| <b>Tableau N° 4</b> : Diamètres des zones d'inhibition des différents extraits par la technique des disques en papier.            | 21 |

# *Introduction*

## ***Introduction***

La résistance aux composés antimicrobiens constitue l'un des défis majeurs de santé publique du XXI<sup>e</sup> siècle. L'utilisation excessive et inappropriée de ces composés a conduit à l'émergence de phénomène de multirésistance chez divers agents pathogènes bactériens et fongiques, la réémergence d'infections auparavant considérées comme maîtrisées, ainsi que l'apparition de nouveaux pathogènes. Cette situation a considérablement compromis l'efficacité des traitements de plusieurs maladies notamment les infections systémiques et certaines complications associées au cancer (**Dishliyska *et al.*, 2025**).

Cette problématique met en évidence la nécessité urgente d'explorer de nouvelles molécules antimicrobiennes et de développer des approches innovantes en matière de conception pharmaceutique.

Les efforts de recherche actuels se concentrent sur le développement de formulations alternatives présentant une efficacité élevée, un potentiel réduit de résistance, une toxicité faible et des effets synergiques optimisés, notamment lorsque ces composés sont issues de sources naturelles.

Les microorganismes provenant d'environnements extrêmes constituent une source prometteuse de métabolites bioactifs originaux dotés de propriétés structurelles et fonctionnelles uniques avec des applications potentielles dans de nombreux domaines, allant de la santé humaine à la protection de l'environnement (**Karnwal *et al.*, 2023**).

Ces microorganismes sont qualifiés d'extrémophiles et en fonction du stress environnemental auquel ils sont adaptés, ils 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 sont adaptés aux basses températures et prospèrent dans des habitats froids ; les alcalophiles, qui se développent dans des milieux alcalins ; les acidophiles qui privilégient des environnements acides. Enfin, les piézophiles, également appelés barophiles, qui se distinguent par leur capacité à croître sous des pressions hydrostatiques particulièrement élevées (**Kochhar *et al.*, 2022**).

Les microorganismes vivants dans les milieux salins et hypersalins, en particulier les sebkhas, présentent un groupe fascinant au sein des microorganismes extrémophiles. Ils possèdent des caractéristiques biotechnologiques et industrielles spécifiques, à savoir la capacité de produire des biopolymères, des pigments, des antimicrobiens, des biosurfactants, des solutés compatibles et des extrêmoenzymes. En outre, ces microorganismes deviennent de plus en plus utiles comme moyen alternatif, sûr et efficace de bioremédiation d'environnements salins contaminés (**Yadav *et al.*, 2018 ; Nas *et al.*, 2021 ; Saibi *et al.*, 2022 ; Reang *et al.*, 2024**). 1

## *Introduction*

Compte tenu de l'importance de ce groupe de microorganismes, l'objectif principal de notre mémoire s'est porté sur l'évaluation de la production de composés antimicrobiens par une souche bactérienne extrémophile provenant d'une collection isolée par Dr. NAS Fatima le 14 février 2014 à partir de la Grande Sebkha d'Oran. Cette souche a été préalablement identifiée par Dr. NAS Fatima, par séquençage partielle de son ARNr 16S, elle est affiliée au genre *Bacillus*. Elle a été conservée à -20°C au sein de l'équipe 3 « Bactéries extrémophiles » 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.

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

- Revivification et la vérification de la pureté de la souche.
- Caractérisation phénotypique de la souche
- Screening primaire des activités antibactériennes et antifongiques contre des germes de référence, en utilisant la technique des cylindres d'agar
- Extraction des métabolites secondaires bioactifs à l'aide de solvants de polarités variées à partir des cultures sur milieu gélosé et sur milieu liquide
- Evaluation des activités antimicrobiennes des extraits par les techniques des disques en papier.

# *Synthèse Bibliographique*

## **1. Généralités sur les bactéries extrêmophiles**

Avant que les microbiologistes ne mettent en évidence l'extraordinaire diversité des microorganismes présents dans les environnements extrêmes, il était généralement admis qu'aucune forme de vie ne pouvait subsister dans de telles conditions. Toutefois, les recherches menées au cours des dernières décennies ont révélé l'existence d'une grande diversité d'extrêmophiles occupant une large gamme d'habitats extrêmes, notamment les sources hydrothermales, les déserts, les environnements hypersalins, les grottes, les gisements pétroliers et de nombreux autres milieux caractérisés par des conditions physicochimiques particulièrement contraignantes (Sayed *et al.*, 2020 ; Das *et al.*, 2022).

Le terme « extrêmophile » se réfère aux microorganismes qui sont capables de croître et de maintenir leur activité biologique dans des habitats extrêmes, souvent hostiles à la plupart des autres formes de vie. Ce terme a été utilisé pour la première fois en 1974 par le scientifique MacElroy dans un article intitulé 'Some comments on the evolution of extremophiles' (Macelroy, 1974).

Les extrêmophiles peuvent être répartis en deux grandes catégories : les microorganismes extrêmophiles strictes et les microorganismes extrêmo-tolérants. Les premiers dépendent de conditions environnementales extrêmes pour assurer leur croissance et leur développement optimaux. À l'inverse, les microorganismes extrêmo-tolérants, désignés également sous le terme d'extrémotrophes, présentent généralement une croissance optimale dans des conditions modérées, mais sont capables de survivre dans des facteurs environnementaux extrêmes. Par ailleurs, certains microorganismes possèdent la capacité de tolérer simultanément plusieurs conditions extrêmes, ils sont qualifiés poly-extrêmophiles (Salwan et Sharma, 2020).

## **2. Les principales catégories des microorganismes extrêmophiles**

Selon la condition extrême favorisant la croissance, différentes catégories de microorganismes extrêmophiles peuvent être définies, parmi les plus étudiées ; les microorganismes halophiles et halotolérants, les thermophiles et psychrophiles, les acidophiles et les alcaliphiles.

### **2. 1. Les microorganismes halophiles et halotolérants**

Les microorganismes halophiles nécessitent la présence du sel dans le milieu pour leur croissance, au minimum 1 M de sel. En fonction des besoins optimaux en sel pour la croissance, trois catégories d'halophiles sont définies (Rahman *et al.*, 2017) :

- Les microorganismes légèrement halophiles qui se développent sur un intervalle de salinité de 0,34 à 0,85 M.
- Les halophiles modérés qui se développent à des concentrations comprises entre 0,85 et 3,4 M de NaCl.
- Les halophiles extrêmes qui se développent sur un intervalle de salinité allant de 3,4 à 5,1M.  
En revanche, les microorganismes halotolérants sont capables de se développer en absence de sel et de tolérer des concentrations salines croissantes. En se basant sur leur halotolérance, trois catégories sont déterminées (**Rahman et al., 2017**).
- Les microorganismes légèrement halotolérants qui tolèrent des concentrations de allant de 0 jusqu'à 6 à 8% de NaCl (p/v).
- Les microorganismes modérément halotolérants qui tolèrent des concentrations de NaCl allant de 0 jusqu'à 18 à 20% de NaCl (p/v).
- Les microorganismes extrêmement halotolérants qui se développent sur toute la gamme de salinité allant de 0 jusqu'à la saturation.

## **2. 2. Les microorganismes thermophiles et psychrophiles**

Les microorganismes thermophiles abritent les habitats à fortes température, tels que les fumeurs noirs et les sources hydrothermales. Ils nécessitent les températures élevées pour leur croissance et leur survie. En fonction du seuil de températures requises, ces microorganismes sont 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 qui nécessitent des températures inférieures ou égales à 15 °C pour leur croissance optimale, et ne pouvant pas 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**).

## **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 ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) (**Sysoev et al., 2021**).

### **2. 4. Autres microorganismes extrêmophiles**

Il existe d'autres microorganismes qui se développent dans d'autres environnements extrêmes

- les méthanogènes qui peuvent coloniser les solfatares, les couches pétrolifères, les aires de décomposition organique (**Dudeja et al., 2010**).
- les barophiles ou piézophiles qui propagent dans les environnements avec des pressions élevées (**Scheffer and Gieg, 2023**),
- métallophiles qui colonisent les habitats riches en ion métalliques (**Sinha et al., 2014**),
- les radiophiles qui se trouvent dans les milieux avec des niveaux élevés de rayonnement (**Basu, 2022**),
- les xérophiles qui colonisent les environnements avec faible activité d'eau (inférieure à 0.8) (**Kanekar and Kanekar, 2022**)
- les anaérobies stricts qui nécessitent les habitats dépourvus d'oxygène (**Patidar et Prakash, 2022**).

### **3. Métabolites secondaires des microorganismes extrêmophiles à activité antimicrobienne**

Le métabolisme secondaire désigne l'ensemble des voies biosynthétiques conduisant à la production de composés qui ne sont pas directement impliqués dans les fonctions essentielles de croissance, de reproduction ou de survie immédiate des microorganismes. Contrairement au métabolisme primaire, responsable de la synthèse des constituants cellulaires fondamentaux et de la production d'énergie, le métabolisme secondaire intervient principalement dans des fonctions écologiques et adaptatives (**Ibrahimi, 2020**). Ces métabolites sont généralement synthétisés au cours des phases avancées du cycle de croissance, notamment en phase stationnaire, lorsque les ressources deviennent limitées et que les interactions compétitives s'intensifient (**Boukhalfa, 2018**). Leur biosynthèse repose sur l'utilisation de précurseurs issus

du métabolisme primaire, servant de briques moléculaires à l'élaboration de structures chimiques souvent complexes et biologiquement actives (**Grini et al., 2022**).

Chez les bactéries extrêmophiles, le métabolisme secondaire joue un rôle important pour leur adaptation et leur survie, dont les conditions environnementales extrêmes favorisent l'activation de voies métaboliques spécifiques et l'expression de gènes impliqués dans la synthèse de composés originaux, qui peuvent présenter des propriétés biologiques remarquables (**Pardo-Esté et al., 2024**).

Parmi les métabolites secondaires produits par les microorganismes extrêmophiles, les composés à activité antimicrobienne occupent une place fondamentale. Ils confèrent un avantage compétitif aux bactéries productrices en inhibant la croissance des microorganismes compétiteurs partageant la même niche écologique. Ces composés agissent par plusieurs mécanismes d'action qui peuvent être soit l'altération de la perméabilité membranaire, l'inhibition de la biosynthèse de la paroi cellulaire, le blocage de la réplication de l'ADN ou encore l'interférence avec la synthèse protéique (**Pardo-Esté et al., 2024**).

Différents types de métabolites secondaires à activité antimicrobienne sont produits par les microorganismes extrêmophiles, parmi lesquels nous citons : les peptides antimicrobiens, les bactériocines, les biosurfactants, les pigments bioactifs...

### **3. 1. Les peptides antimicrobiens (AMPs)**

Ils sont appelés également les peptides de défense de l'hôte. Ce sont des courts peptides généralement composés de 10 à 100 acides aminés. Ils sont amphiphiles et portent, le plus souvent, une charge positive. La majorité des AMPs exercent une activité antimicrobienne directe en perturbant l'intégrité des membranes cellulaires ou en ciblant des composants intracellulaires des microorganismes pathogènes. D'autres agissent de manière indirecte en modulant la réponse immunitaire de l'hôte, notamment en régulant la production de cytokines, en favorisant le recrutement des cellules immunitaires et en participant aux processus de cicatrisation et de réparation tissulaire. (**Mahlapuu et al., 2016 ; Kang et al., 2025**).

Un exemple de peptide antimicrobien, l'halocine C8, de taille de 7,4 kDa, produite par les archées halophiles des genres *Natrinema*, *Haloterrigena*, *Haloferax* et *Halobacterium* (**Besse et al., 2017**).

### **3. 2. Les bacteriocines**

Les bactériocines constituent un groupe hétérogène de peptides et de protéines possédant un spectre large d'hôtes. Elles peuvent être classées selon l'origine bactérienne (Yang et al., 2014).

Chez les bactéries à Gram négatif, on trouve les colicines (protéines de 25–80 kDa) codées par plasmides ou chromosomes. Ils digèrent l'ADN/ARN ou le peptidoglycane, et les microcines (peptides de taille inférieure de 10 kDa, ribosomaux, parfois modifiés posttraductionnellement, sécrétés via transporteur ABC).

Chez les bactéries à Gram positif, les bactériocines sont des peptides de taille inférieure à 60 acides aminés, majoritairement produites par les bactéries lactiques. Selon leur structure et leurs modifications post-traductionnelles, elles sont généralement classées en trois grandes classes qui sont : la classe I qui regroupent des peptides antimicrobiens synthétisés par les ribosomes et modifiés post-traductionnellement, également appelés RiPPs (Ribosomally synthesized and Post-translationally modified Peptides). Cette classe comprend notamment les lantibiotiques, caractérisés par la présence d'acides aminés inhabituels tels que la lanthionine. La nisine constitue l'exemple le plus étudié de cette classe. La classe II comprend les bactériocines de petite taille (< 10 kDa), thermostables et ne subissant pas ou peu de modifications post-traductionnelles. Cette classe inclut notamment les pédiocines, dont la pédiocine PA-1 est un représentant majeur. La classe III est constituée de protéines antimicrobiennes de grande taille (> 10 kDa), généralement thermolabiles comme exemple l'entérolisine A.

Les bactériocines produites par les archées sont appelées et comme exemples d'archéocines extrêmophiles, nous citons l'halocine H4 produite par l'archaea *Haloferax mediterranei* qui cible l'archaea *Halobacterium salinarum* (Naor et al., 2013).

### **3. 3. Les biosurfactants**

Les biosurfactants sont synthétisés principalement par des microorganismes (bactéries, levures, champignons) bien que certaines plantes puissent aussi les produire. Ils sont définis comme des molécules amphiphiles composée de parties lipophiles (non polaires) et hydrophiles (polaires) . Ils réduisent la tension superficielle entre deux phases de polarités différentes (agents tensio-actifs) et améliorent l'assimilation des composés insolubles dans l'eau, tels que les hydrocarbures, en réduisant la tension de surface et en favorisant leur émulsification ce qui facilite aux microorganismes de s'adhérer aux gouttelettes d'hydrocarbures et leur assimilation

ultérieure. Ils peuvent être des molécules intracellulaires, extracellulaires ou localisées à la surface de la cellule (Eras-Muñoz *et al.*, 2022).

Ils présentent des propriétés antibactériennes, antifongiques, antivirales, anticancéreuses et immunomodulatrices, et ils sont biodégradables, moins toxiques, efficace à faible concentration, actifs à des conditions extrêmes de température, pH ou de salinité, et peuvent être produits à partir de substrats renouvelables (Rizvi *et al.*, 2024).

Ils peuvent être classés en deux groupes principaux en fonction de leur poids moléculaire : les biosurfactants de faible poids moléculaire (glycolipides et lipopeptides) et les biosurfactants de poids moléculaire élevé (polysaccharides, lipopolysaccharides, protéines et lipoprotéines). (Pardhi *et al.*, 2022). Les différences chimiques dans la structure moléculaire sont directement liées à leurs activités biologiques et à leurs applications (Albasri *et al.*, 2024).

Comme exemple de bactéries productrices de biosurfactants nous citons la souche halophile *Bacillus tequilensis* CH isolée des eaux saumâtres du lac Chilika (Inde), qui produit un biosurfactant de type lipopeptide capable d'inhiber la formation de biofilms d'*Escherichia coli* et *Streptococcus mutans* sur des surfaces hydrophiles et hydrophobes (Pradhan *et al.*, 2013).

Nous citons également la souche bactérienne extrémophiles *Halomonas sp.* BS4 qui produit un biosurfactant glycolipidique montrant une forte activité antibactérienne in vitro vis-à-vis *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* et *Salmonella typhi*. Ce même surfactant posséderait aussi des effets antifongiques et antiviraux (Donio *et al.*, 2013).

### **3. 4. Les pigments bioactifs**

La production de pigments par les microorganismes extrémophiles constituent l'un de leur mécanisme d'adaptation aux conditions environnementales sévères. Ces pigments jouent un rôle protecteur important en protégeant les cellules contre les rayonnements UV, le stress oxydatif et d'autres facteurs de stress présents dans les milieux extrêmes. Ils agissent également comme un bouclier pour protéger le microorganisme producteur contre les composés antimicrobiens naturels sécrétés par d'autres microorganismes. Ces pigments possèdent également des propriétés antimicrobiennes, antioxydantes, anticancéreuses et photoprotectrices, ce qui leur confère un intérêt considérable dans les domaines pharmaceutique, alimentaire et biotechnologique (Rawat *et al.*, 2024).

Les produits par les microorganismes peuvent se présenter sous différentes couleurs (jaune, orange, rouge, violet ou brun), mais ne sont pas de simples couleurs, ils sont constitués de divers composants chimiques appartiennent à plusieurs familles telles que les caroténoïdes, les mélanines, les prodiginines et la violacéine possédant des activités biologiques multidimensionnelles (Kim, 2013).

Comme exemple de bactéries productrices de pigments bioactifs, la bactérie extrêmophile *Janthinobacterium lividum*. Elle produit un pigment de couleur violette de la classe des violacéines. Ce pigment présente plusieurs activités biologiques, notamment antibactériennes, antifongiques et anticancéreuses (Durán et al., 2016).

#### **4. Les bactéries du genre *Bacillus***

##### **4. 1. Taxonomie et caractéristique bactériologique du genre *Bacillus***

Le genre *Bacillus* appartient au domaine *Bacteria*, phylum *Bacillota* (anciennement *Firmicutes*), classe *Bacilli*, ordre *Bacillales*, et famille *Bacillaceae*. Il regroupe un grand nombre d'espèces ubiquistes présentes dans les sols, l'eau, l'air et dans divers environnements extrêmes (De Vos et al., 2009)..

Les espèces du genre *Bacillus* sont des bâtonnets, Gram positives, Catalase positives, capables de former des endospores résistantes, et peuvent être aérobies strictes ou anaérobies facultatives. La plus part des espèces sont mobiles par des flagelles péritriches. Certaines espèces ont une importance médicale (*B. cereus* : toxi-infections alimentaires ; *B. anthracis* : agent de l'anthrax), d'autres sont bénéfiques (*B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*) comme agents de biocontrôle ou probiotiques (De Vos et al., 2009).

##### **4. 2. Habitats des espèces du genre *Bacillus***

Les espèces appartenant au genre *Bacillus* sont des microorganismes largement répandus dans la biosphère et se distinguent par leur caractère ubiquitaire. Le sol constitue leur habitat principal ; toutefois, grâce à leur grande diversité physiologique et métabolique, elles sont capables de prospérer dans une grande diversité de niches écologiques incluant les milieux aquatiques, les plantes, les aliments ainsi que le microbiote de l'Homme, des animaux et des insectes. Plusieurs espèces ont été isolés à partir de milieux extrêmes, tels que les déserts, l'Antarctique, les sources hydrothermales, les lacs salins et sodés, les marais salants et les mines de sels (Roohi et al., 2014 ; Aissaoui et al., 2018 ; Arab et al., 2018 ; Nas et al., 2021).

#### **4. 3. Potentiel biotechnologiques des espèces du genre *Bacillus***

Les espèces appartenant au genre *Bacillus* possèdent une diversité de propriétés biologiques qui leur confèrent un intérêt considérable en biotechnologie. Outre leur aptitude à former des endospores et de leur croissance généralement rapide, ces bactéries se distinguent par une remarquable plasticité métabolique. Bien que certaines soient pathogènes pour l'être humain, la majorité des espèces exercent des effets bénéfiques et forment un groupe fort utile dans différents domaines notamment les domaines industriel, agricole, environnemental et médical ( **Sun *et al.*, 2021**).

En agriculture, de nombreuses espèces de *Bacillus* agissent comme promoteurs de croissance végétale (PGP) grâce à leur aptitude à fixer l'azote atmosphérique, à solubiliser le phosphate insoluble et à produire des phytohormones. Elles peuvent également jouer le rôle de biofertilisants ou d'agents de biocontrôle en stimulant la résistance des plantes ou en inhibant la croissance de pathogènes. Par ailleurs, ces bactéries sont capables de synthétiser une large gamme de métabolites secondaires bioactifs tels que les sidérophores, des enzymes industrielles (protéases, amylases, cellulases, lipases), ainsi que des composés aux propriétés antibactériennes, antifongiques, antivirales, antitumorales et immunosuppressives (**Nabti *et al.*, 2013 ; Klouche Khelil *et al.*, 2013; Aissaoui *et al.*, 2018 ; Nas *et al.*, 2021 ; Saibi *et al.*, 2022**).

Cette richesse métabolique confère aux *Bacillus* un rôle central dans le développement de solutions durables en biotechnologie verte et pharmaceutique.

## ***Matériel et Méthodes***

Ce travail se concentre sur l'identification phénotypique d'une souche bactérienne nommée LMB3093, isolée d'un écosystème salin algérien (la grande sebkha d'Oran), ainsi que sur l'exploration de son potentiel biotechnologique pour produire des composés antimicrobiens vis-à-vis des souches de référence.

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

La souche étudiée LMB3093 a été isolée par Dr. NAS en 2014 et caractérisation , sur la base du séquençage partiel du gène codant pour l'ARNr 16S, comme appartenant au genre *Bacillus*. Son isolement a été effectué sur Gélose Nutritive à 10% de NaCl, à une température d'incubation de 30°C.

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

### **2. Revivification et vérification de la pureté de la souche LMB3093**

Afin de réaliser nos expériences, la souche LMB3093 a été d'abord été revivifiée sur Bouillon Nutritif contenant 10 % de NaCl jusqu'à l'apparition d'un trouble. Sa pureté a été confirmée par des repiquages répétés sur Gélose Nutritive à 10% de NaCl.

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

### **3. Caractérisation phénotypique de l'isolat LMB3093**

La caractérisation phénotypique de notre isolat a été effectuée en suivant les tests proposés par Logan *et al.* (2009) pour la caractérisation de nouveaux taxons formant des endospores.

#### **3. 1. Détermination des caractères microscopiques et macroscopiques**

Les caractères microscopiques (la mobilité, le type de Gram, la morphologie et le mode de regroupement cellulaire) et macroscopiques (taille, forme, opacité, pigmentation, élévation et consistance des colonies) ont été déterminés à partir des cultures de 24 heures à 30 °C sur Gélose Nutritive exempt de NaCl et Gélose Nutritive supplémentée de 10% (p/v).

#### **3. 2. Détermination des caractères physiologiques**

Les conditions physicochimiques (salinité, température et pH) qui favorisent la croissance de l'isolat LMB3093 ont été déterminées en utilisant des milieux gélosés, en ajustant une de ces

conditions tout en gardant les deux autres inchangées (**Gomri et al., 2021**). La croissance a été surveillée chaque jour pendant une durée de 72 heures.

- La gamme de salinité favorable à la croissance a été établie en ensemençant l'isolat sur GN à pH 7 contenant des concentrations en NaCl allant de 0 à 25 % (p/v). Les cultures ont ensuite été incubées à 30°C.
- L'intervalle de température propice à la croissance a été déterminé en incubant l'isolat ensemençant sur GN à 10% de NaCl et un pH 7, à des températures variant allant de 20 et 55°C.
- L'intervalle de pH favorable à la croissance a été déterminé en cultivant l'isolat sur GN à 10% de NaCl, ajustée à des pH de 5, 6, 7, 8 et 9. L'incubation a été effectuée à 30°C.

### **3. 3. Détermination des caractères biochimiques**

Sur le plan biochimique, la caractérisation des isolats a été réalisée en utilisant la galerie API® 20E et d'autres tests de la microbiologie classique.

#### **3. 3. 1. La galerie API® 20E**

La plaque API 20E permet d'étudier 20 tests biochimiques, ils comportent la recherche de la  $\beta$ -Galactosidase (ONPG), l'Ornithine décarboxylase (ODC), la lysine décarboxylase (LDC), l'Arginine dihydrolase (ADH), l'utilisation du citrate (CIT), la production du H<sub>2</sub>S, d'Urée (URE), du tryptophane désaminase (TDA), d'indole (IND), d'acétoïne (VP), la liquéfaction de la gélatine (GEL) et la dégradation des sucres (**voir annexe**).

La préparation de l'inoculum a été effectuée dans du Bouillon Nutritif à 10% de NaCl à partir des cultures de 24 heures sur GN à 10% de NaCl. La densité optique de la suspension a été ajustée 0.1 à la longueur d'onde de 590 nm. L'inoculation de la plaque a été effectuée conformément aux directives mentionnées dans le catalogue fourni avec les plaques (**voir annexe**)

Après 24 heures d'incubation, les réactions se manifestent par des virages de couleur spontanés ou mis en évidence par l'ajout de réactifs. L'interprétation des résultats se réfère au catalogue joint avec les plaques (**voir annexe**).

#### **3. 3. 2. Mise en évidence de la catalase**

La catalase est l'enzyme responsable de l'élimination du peroxyde d'hydrogène. Le principe consiste à mettre en contact une colonie avec une goutte d'eau oxygénée H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La

présence de l'enzyme entraîne un dégagement immédiat des bulles gazeuses (**Health Protection Agency, 2011**).

### 3. 3. 3. Mise en évidence de la Cytochrome-oxydase

Le cytochrome oxydase est la dernière enzyme de la chaîne respiratoire. Elle assure le transfert des électrons sur l'oxygène ou sur un autre oxydant minéral. Sa recherche s'effectue en utilisant des disques imprégnés du réactif oxalate de N, N-diméthyl-1, <sup>1</sup> -phénylène diaminedichlorure de couleur rose dont le principe est de mettre en contact une colonie avec le disque. Sur un tube à hémolyse contenant de l'eau physiologique inoculé par une colonie, on met le disque d'oxydase. Après quelques minutes, un résultat positif se traduit par le virage de la couleur rose du disque vers un violet noirâtre indique la présence de l'enzyme (**Public Health England, 2014**).

## 4. Criblage des activités antimicrobiennes de la souche LMB3093

La production des activités antimicrobiennes a été étudiée aussi bien en milieu gélosé (Solid State Fermentation SSF) qu'en milieu liquide (Submerged fermentation SmF) vis-à-vis de neuf germes de référence (**Tableau 1**).

**Tableau 1** : les germes tests utilisés

|                                 | Espèces                       | Référence  |
|---------------------------------|-------------------------------|------------|
| <b>Bactéries à Gram positif</b> | <i>Bacillus cereus</i>        | ATCC 11778 |
|                                 | <i>Bacillus subtilis</i>      | ATCC 6633  |
|                                 | <i>Staphylococcus aureus</i>  | ATCC 25923 |
|                                 | <i>Micrococcus luteus</i>     | ATCC 15307 |
|                                 | <i>Enterococcus faecalis</i>  | ATCC 29212 |
| <b>Bactéries à Gram négatif</b> | <i>Escherichia coli</i>       | ATCC 25922 |
|                                 | <i>Klebsiella pneumonia</i>   | ATCC 70603 |
|                                 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | ATCC 27853 |

### <sup>1</sup> . 1. Standardisation des inocula des souches de référence

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

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

|                |                         |            |
|----------------|-------------------------|------------|
| <b>Levures</b> | <i>Candida albicans</i> | ATCC 26790 |
|----------------|-------------------------|------------|

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

#### **4. 2. Recherche de la production des composés antimicrobiens sur milieu gélifié**

La mise en évidence de la production des activités antimicrobiennes sur milieu gélifié a été réalisée par la technique des cylindres d'agar (**Balouiri et al., 2016**). Cette méthode consiste à ensemencer notre isolat en stries serrées, de façon à obtenir un tapis, sur Gélose Nutritive additionnée de 10 % de NaCl.

Après 7 jours d'incubation à 30°C, des cylindres d'agar d'environ de 6 mm de diamètre ont été prélevés et déposés sur des boîtes de pétri contenant la gélosés Muller-Hinton et Sabouraud préalablement ensemencés 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 non ensemencée ont été utilisés comme témoins.

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

#### **4. 3. La recherche de la production des composés antimicrobiens sur milieu liquide**

Pour cette étude, deux à trois colonies de 24 heures à 30°C sur Gélose Nutritive supplémentée de 10% de NaCl, ont été inoculées dans 10 mL de Bouillon Nutritif à 10% de NaCl. Après 7 jours d'incubation à 30°C sous agitation (180 rpm), la culture a été centrifugée à 10000 t/min pendant 30 minutes et le surnageant a été récupérés et filtré à l'aide des filtres de seringue de 0.22  $\mu$ m (**Figure 1**), puis testé pour son pouvoir antimicrobien par la technique des puits (**Balouiri et al., 2016**).

Sur la gélose Muller-Hinton et Sabouraud préalablement ensemencée par les germes tests, des puits de 6 mm de diamètre ont été perforés aseptiquement en utilisant l'extrémité plate des embouts, ensuite, un volume de 100  $\mu$ L de surnageant y a été introduit. Des puits contrôles, ont reçus 100  $\mu$ L de Bouillon Nutritif à 10 % de NaCl.

## **Matériel et Méthodes**

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

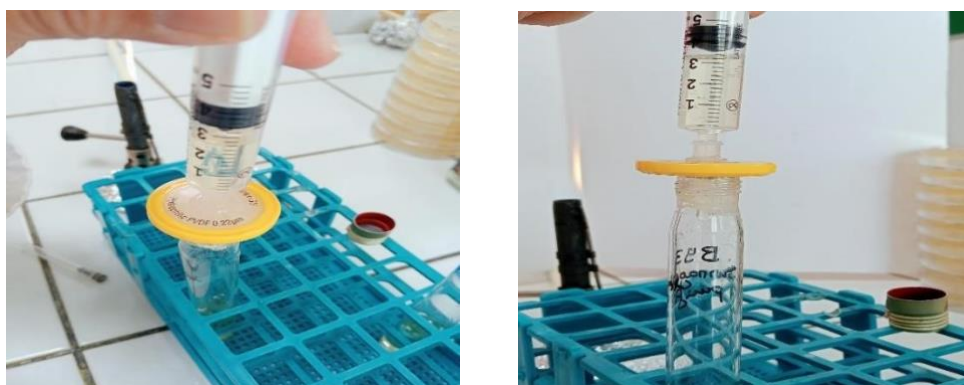


**Figure 1** : Filtration du surnageant à l'aide du filtre à seringue

### **5. L'extraction des métabolites antimicrobiens de l'isolat LMB3093**

L'extraction a été effectuée à partir des surnageants et des cultures sur milieu gélosé préparés précédemment. Deux solvants de polarité différentes ont été utilisés ; l'éthanol et l'acétate d'éthyle.

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

Les mélanges gélose-solvant ont subi une agitation pendant deux heures à 37°C, puis une filtration en utilisant une passoire stérile. Les phases organiques ont été ensuite évaporées à l'air libre. Les résidus secs ont été récupérés dans 1 mL du même solvant de l'extraction et utilisé pour les tests d'activité antimicrobienne.

L'extraction à partir des surnageants a été réalisée selon le protocole de **Rahman *et al.* (2017)**. Chaque solvant a été utilisé dans un rapport volumique de 1:1 (v/v) avec les surnageants. Les mélanges ont été soumis à une agitation pendant 2 heures à 37°C, puis laissés décanter dans une burette jusqu'à une séparation complète des phases aqueuse et organique.

Les phases organiques ont été soigneusement récupérées puis évaporées à l'air libre. Les résidus secs ont été solubilisés dans 1 mL du même solvant d'extraction.

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

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

### ***Matériel et Méthodes***

Des disques de 6 mm ont été imprégnés par 50  $\mu$ L de chaque extrait et déposés sur des boîtes contenant la gélose Muller-Hinton et Sabouraud. Des disques contenant 50  $\mu$ L des solvants purs ont été utilisés comme contrôles négatifs.

Les boîtes ont été placées à 4 °C pendant 2 heures, puis incubées à 37 °C pendant 24 heures. Le pouvoir antimicrobien a été déterminé par mesure du diamètre des zones d'inhibition autour des disques.

## ***Résultats et Discussion***

## **1. Résultats**

### **1. 1. Caractérisation phénotypique de l'isolat LMB3093**

#### **1. 1. 1. Détermination des caractères microscopiques**

Les caractères microscopiques de l'isolat LMB3093 ont été déterminés après 24 heures d'incubation à 30°C sur Gélose Nutritive exempt de sel et à 10% de NaCl. L'observation de l'état frais a montré qu'il est mobile et l'examen microscopique après coloration de Gram a révélé que les cellules se présentent sous forme de gros et longs bâtonnets avec des extrémités arrondies et un type de paroi Gram positif et sans un mode de regroupement particulier (isolés) (**Figure 2A**). Sur Gélose nutritive dépourvue de sel, l'isolat forme des endospores après 24 d'incubation à 30°C (**Figure 2B**).

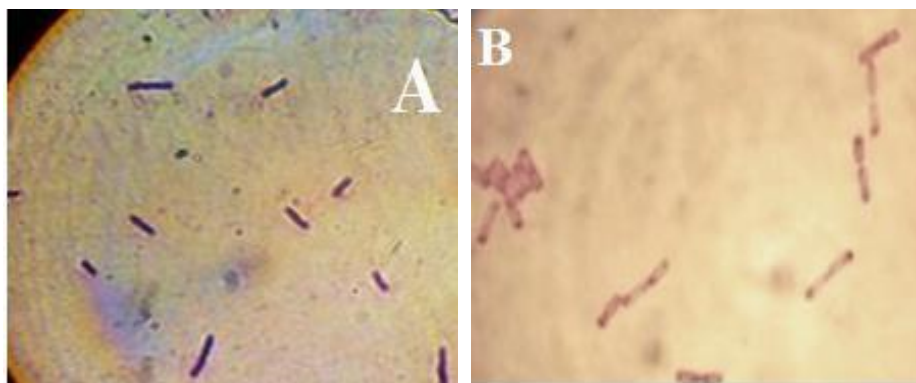


**Figure 2** : Photos des résultats de l'examen microscopique après coloration de Gram de l'isolat LMB3093 après 24 heures d'incubation à 30°C sur Gélose Nutritive à 10% de NaCl (A) et Gélose nutritive dépourvue de NaCl (B) (Objectif 100 à immersion).

#### **1. 1. 2. Détermination des caractères macroscopiques**

Les caractères macroscopiques de l'isolat ont été déterminés après 24 heures d'incubation à 30 °C sur Gélose Nutritive exempt de NaCl et Gélose Nutritive supplémentée de 10% de sel (p/v) (**Figure 3**).

Sur GN exempt de NaCl, les colonies apparaissent circulaires avec un diamètre de 2 à 3mm, opaques de couleur beige. Leur surface est plate, lisse et brillante à contour irrégulier et à consistance crémeuse et non muqueuse. Elles dégagent une odeur.

Sur GN à 10% de NaCl, elles sont circulaires de 3 à 4 mm de diamètre et de couleur beige. Leur surface est bombée, lisse et brillante avec un contour irrégulier, translucide avec une consistance muqueuse et ne dégagent aucune odeur.



**Figure 3 :** Photos de l'aspect des colonies de l'isolat LMB3093 après 24 heures d'incubation à 30°C sur Gélose Nutritive dépourvue de NaCl et à 10% de NaCl.

### **1. 1. 3. Détermination des caractères physiologiques**

Les conditions physicochimiques qui favorisent la croissance de l'isolat LMB3093 ont été déterminées en suivant quotidiennement leur croissance durant 72 heures sur Gélose Nutritive à différents paramètres de salinité, de température et de pH.

La gamme de salinité favorable à la croissance a été établie en ensemençant l'isolat sur GN à pH 7 contenant des concentrations en NaCl allant de 0 à 25 % (p/v). Les cultures ont ensuite été incubées à 30°C. L'isolat a montré une croissance sur les milieux de culture contenant de 0 à 20 % (p/v) de NaCl avec un optimum de croissance à 0 % de NaCl. Aucune croissance n'a été observée à 25% de NaCl.

L'intervalle de température propice à la croissance a été déterminé en incubant l'isolat ensemenché sur GN à 10% de NaCl et un pH 7, à des températures allant de 20 à 55°C. Les résultats obtenus montrent une croissance sur toute la gamme étudiée avec un optimum dans une plage de 30 à 55°C.

L'intervalle de pH favorable à la croissance a été étudié en cultivant l'isolat sur GN à 10% de NaCl ajustée à des pH de 5, 6, 7, 8 et 9. L'incubation a été effectuée à 30°C. L'isolat a montré un pouvoir de croître sur toute la gamme de pH étudiée avec un optimum à pH neutre de 6 à 7. A pH 9, l'isolat a présenté une bonne croissance par rapport au pH 5.

### **1. 1. 4. Détermination des caractères biochimiques**

Les propriétés métaboliques et le profil biochimique de l'isolat a été déterminé par la galerie API 20E et les tests de la recherche de la catalase et le cytochrome oxydase.

Les résultats obtenus pour la caractérisation la galerie API 20E sont récapitulés dans le **tableau 2** et la **figure 4**.

**Tableau 2** : Résultat de la caractérisation de l'isolat LMB3093 par la galerie API 20E

| Test | Résultat | Test             | Résultat | Test | Résultat | Test | Résultat |
|------|----------|------------------|----------|------|----------|------|----------|
| ONPG | +        | H <sub>2</sub> S | -        | GEL  | +        | RHA  | -        |
| ADH  | +        | URE              | +        | GLU  | +        | SAC  | -        |
| LDC  | +        | TDA              | -        | MAN  | -        | MEL  | -        |
| ODC  | +        | IND              | -        | INO  | -        | AMY  | -        |
| CIT  | +        | VP               | +        | SOR  | -        | ARA  | -        |



**Figure 4.** Photo du résultat de la caractérisation de l'isolat LMB3093 par la galerie API 20 E.

A partir du **tableau 1** et de la **figure 4**, il ressort que l'isolat LMB3093 produit la  $\beta$ galactosidase, l'Arginine dihydrolase, la Lysine décarboxylase, l'Ornithine décarboxylase, l'uréase, l'acétoïne et la gélatinase. Il utilise le citrate comme seul source de carbone et d'énergie.

Il ne possède pas la tryptophanase responsable de la production d'indole, ni la Tryptophane désaminase et ne produit pas de H<sub>2</sub>S. Quant aux sucres, la seule réaction positive s'est produite avec le glucose.

La recherche des enzymes respiratoires, a révélé la présence de la catalase et le cytochrome oxydase. Les résultats sont illustrés dans la **figure 5**.

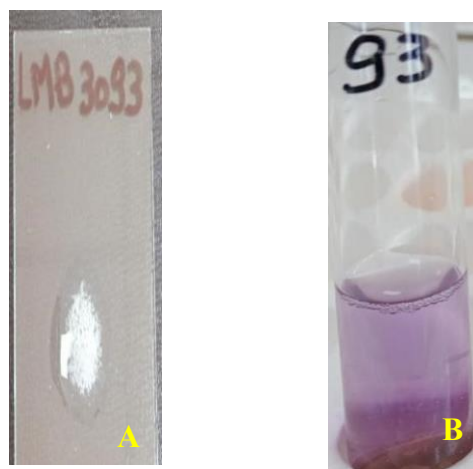


**Figure 4** : Photos du résultat de la recherche des enzymes respiratoires : (A) la catalase et (B) le cytochrome oxydase.

## 1. 2. Criblage des activités antimicrobiennes de la souche LMB3093

### 1. 2. 1. Recherche de la production des métabolites antimicrobiens sur milieu gélosé et milieu liquide

Après la revivification et la purification de l'isolat, son pouvoir à produire des activités antimicrobiennes vis-à-vis des germes de référence a été évalué en utilisant la technique des cylindres d'agar pour les cultures sur milieu gélosé (GN à 10% de NaCl) et la technique des puits pour les cultures sur bouillon (BN à 10% NaCl) après sept jours d'incubation à 30°C. Les différents diamètres obtenus sont représentés dans le **tableau 3**. La **figure 5** montre les photos de quelques résultats.

**Tableau 3 :** Diamètres des zones d'inhibition obtenus par les techniques des cylindres d'agar et la technique des puits.

| Le germe de référence         | Diamètres obtenus par                                            | Diamètres obtenus par la                               |
|-------------------------------|------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
|                               | technique des cylindres d'agar (culture sur milieu gélosé) en mm | technique des puits (culture sur milieu liquide) en mm |
| <i>Bacillus cereus</i>        | 15                                                               | -                                                      |
| <i>Bacillus subtilis</i>      | 10                                                               | -                                                      |
| <i>Staphylococcus aureus</i>  | 12                                                               | -                                                      |
| <i>Micrococcus luteus</i>     | 30                                                               | 15                                                     |
| <i>Enterococcus faecalis</i>  | -                                                                | -                                                      |
| <i>Escherichia coli</i>       | 09                                                               | -                                                      |
| <i>Klebsiella pneumonia</i>   | -                                                                | -                                                      |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | -                                                                | -                                                      |
| <i>Candida albicans</i>       | 17                                                               | -                                                      |

La recherche de la production des composés antimicrobiens sur milieu gélosé a révélé que l'isolat LMB3093 produit des métabolites contre *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli* et *Candida albicans*. Les diamètres des zones d'inhibition les plus importants ont été obtenus vis-à-vis *Micrococcus luteus* (30 mm), *Candida albicans* (17 mm) et *Bacillus cereus* (15 mm).

Pour la recherche de l'activité des composés antimicrobiens sur milieu liquide, le pouvoir antimicrobien de l'isolat a été enregistré seulement vis-à-vis *Micrococcus luteus* avec un diamètre de 15 mm.

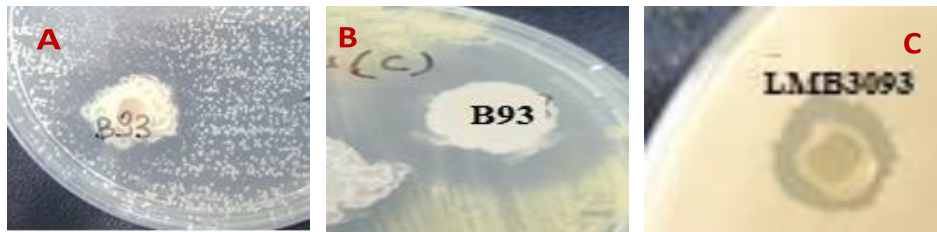


**Figure 5** : Photos des résultats des activités antimicrobiennes par la technique des cylindres d'agar vis-à-vis *Candida albicans* (A) ; *Micrococcus luteus* (B) ; *Bacillus cereus* (C).

### 1. 2. 2. Extraction des métabolites antimicrobiens de l'isolat LMB3093

Les métabolites antimicrobiens de l'isolat ont été extraire à partir de la culture sur milieu Gélase Nutritive à 10% de NaCl et des surnageant issu à partir de la culture sur BN à 10% de NaCl après sept jours d'incubation. Deux solvants de polarité différente ont été utilisés : le méthanol et l'acétate d'éthyle. Le pouvoir antimicrobien de tous les extraits obtenus a été testé à l'aide par la méthode des disques en papier. Les diamètres des zones d'inhibition obtenus sont représentés dans le **tableau 4**.

**Tableau 4** : Diamètres des zones d'inhibition des différents extraits par la technique des disques en papier.

| Le germe de référence         | Culture sur milieu Gélosé |                            | Culture sur milieu liquide |                            |
|-------------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
|                               | Extrait éthanolique       | Extrait d'acétate d'éthyle | Extrait éthanolique        | Extrait d'acétate d'éthyle |
| <i>Bacillus cereus</i>        | 15                        | 7                          | 9                          | -                          |
| <i>Bacillus subtilis</i>      | 11                        | 7                          | -                          | -                          |
| <i>Staphylococcus aureus</i>  | -                         | 7                          | -                          | 9                          |
| <i>Micrococcus luteus</i>     | -                         | 9                          | -                          | 9                          |
| <i>Enterococcus faecalis</i>  | -                         | -                          | -                          | -                          |
| <i>Escherichia coli</i>       | -                         | 10                         | -                          | 9                          |
| <i>Klebsiella pneumonia</i>   | -                         | -                          | -                          | -                          |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | -                         | -                          | -                          | -                          |
| <i>Candida albicans</i>       | -                         | -                          | -                          | -                          |

Les extrait éthanolique ont montré une activité antibactérienne principalement contre les bactéries du genre *Bacillus* particulièrement vis-à-vis *Bacillus cereus* dont l'éthanol a permis d'extraire les métabolites inhibant cette bactérie à partir du milieu solide et milieu liquide.

## ***Résultats et discussion***

Les extraits d'acétate d'éthyle présentent un spectre d'activité plus large que celui de l'éthanol dans les deux types d'extraction, bien que les diamètres d'inhibition obtenus sont relativement faibles que ceux obtenus par extraction par l'éthanol.

Aucune activité antimicrobienne n'a été observée contre *Candida albicans* par les différents extraits bien qu'elle a été inhibée dans le screening primaire par contact direct à l'aide de la technique des cylindres d'agar.

## **2. Discussion**

Dans la première partie de notre travail, nous nous sommes intéressés à la caractérisation de notre isolat LMB3093 sur le plan phénotypique conformément aux recommandations établies par **Logan *et al.* (2009)** pour la description de nouveaux taxons aérobies formant d'endospores.

Nous avons commencé par un examen microscopique à l'état frais et après coloration de Gram. Les observations obtenues ont révélées que les cellules de l'isolat LMB3093 se présentent sous forme de bacilles mobiles possédant une paroi de type Gram positif. Sur Gélose Nutritive exempt de NaCl, l'isolat forme des endospores après un temps court d'incubation (24 heures) sans nécessiter l'ajout de composés favorisant la sporulation tel que le  $\text{CaCl}_2$  ou le  $\text{MnSO}_4$ . En revanche, lorsque le milieu est supplémenté de NaCl, la formation de spores est considérablement retardée et n'est observée qu'après 15 à 20 jours d'incubation. La capacité à former des endospores en conditions aérobies constitue un critère taxonomique majeur pour l'identification des espèces appartenant au genre *Bacillus* et est prise en compte dans toutes les éditions du Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Ces structures de résistance, métaboliquement inactives, permettent aux bactéries de persister face à des conditions environnementales hostiles (**McKenney *et al.*, 2013**).

L'étude des caractéristiques macroscopiques a permis de révéler une différence au niveau de l'aspect des colonies en présence et en absence de NaCl. Sur le milieu additionné de sel, les colonies deviennent translucides avec une consistance muqueuse et non dégageant d'odeur. Ces observations nous ont poussés à construire les hypothèses suivantes :

- La formation de colonies translucides avec une consistance muqueuse peut être expliquée par la production des exopolysaccharides (EPS) par l'isolat car le sel constitue un stress osmotique qui peut induire la synthèse d'exopolysaccharides ou d'une capsule polysaccharidique. Ces EPS retiennent de l'eau autour de la cellule et limitent la déshydratation.

## ***Résultats et discussion***

- La disparition de l'odeur, peut être expliquée par le fait que le stress salin modifie le métabolisme et réduit la synthèse des composés organiques volatils ou inhibe les enzymes impliqués dans la production de molécules volatiles.

**Jung et al. (2025)** ont étudié l'effet du stress salin sur la croissance de certaines bactéries (*Burkholderia gladioli*, *Burkholderia glumae*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (*Pcc*), *Ralstonia solanacearum*, et *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*). Ils ont conclurent que la salinité élevée est un facteur critique qui affecte fortement la structure et la composition des bactéries et induit modifications physiologiques et des états hyperosmotiques et hyperioniques qui inhibent la croissance ou réduisent la biomasse bactérienne et provoque des perturbations dans les activités biologiques, notamment celles liées à la dégradation de la matière organique, au cycle des nutriments et à l'activité enzymatique.

L'étude de la croissance de l'isolat à différentes concentrations de NaCl a montré que sa croissance est observée en absence de NaCl et en présence de 20%. Donc d'après la classification proposée par **Rahman et al. (2017)**, cet isolat est classé comme modérément halotolérant. La concentration de 0 % de NaCl représente la première concentration ayant favorisé une croissance importante de l'isolat, ce qui suggère que son optimum de croissance est en absence de sel.

Concernant la température, notre isolat présente une croissance dans un intervalle compris entre 25 et 55 °C, avec un optimum situé entre 30 et 55 °C. Selon **Bowers et al. (2009)**, cette caractéristique permet de classer cet isolat parmi les bactéries thermo-tolérantes.

L'isolat étudié montre également une croissance optimale à des valeurs de pH neutres à légèrement alcalines. Ce comportement est caractéristique des microorganismes alcalitolérants, capables de croître préférentiellement à des pH proches de la neutralité tout en supportant des conditions alcalines (**Bowers et al., 2009**).

La présence des caractères halotolérant, alcali-tolérance et de la thermo-tolérance chez cet isolat permet finalement de le considérer comme un microorganisme polyextrémophile selon **Mesbah et al. (2009)**.

Le système API 20E a mis en évidence un potentiel métabolique intéressant. Il a été décrits pour l'identification rapide et précise des bactéries du genre *Bacillus*, il est plus reproductibles que les tests classiques et de nombreuses études ont cité son utilisation pour identifier des isolats du genre *Bacillus* (**Encinas et al., 1996 ; Phillip et al., 2012 ; NAS et al., 2021 ; Saibi et al., 2022**).

La deuxième partie de notre travail est consacré à la recherche de la mise en évidence du pouvoir antimicrobien de l'isolat LMB3093 contre des germes de référence. Dans un premier

## ***Résultats et discussion***

temps, nous nous sommes évalué le pouvoir antimicrobien de l'isolat par la recherche de la production des composés antimicrobiens sur milieu gélosé à l'aide de la technique des cylindres d'agar et sur bouillon (Surnagent) à l'aide de technique des puits.

Les cylindres d'agar ont exercé un pouvoir inhibiteur contre 6 germes test sur neuf, avec des diamètres importants à l'encontre de *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus*, *Candida albicans* et *Staphylococcus aureus*. Pour le surnageant, il a exercé une activité inhibitrice vis-à-vis seulement *Micrococcus luteus*. Ces résultats nous laissent conclure que la production des composés antimicrobiens en milieu solide par notre isolat est plus importante quantitativement et qualitativement que celle en milieu liquide ce qui veut dire que la consistance du milieu de culture influe sur la production de métabolites.

**Hosny et al. (2011)** ont isolé une espèce bactérienne à partir de la mer méditerranéenne désignée comme *Bacillus licheniformis* NRC-18 qui est capable de produire des substances antimicrobiennes seulement sur milieu solide et ont expliqué ce résultat par le fait que les composés antimicrobiens synthétisés par cette souche ne diffusent pas dans le milieu aqueux.

**Kumar et al., (2021)** dans leur étude, ont trouvé que le champignon *Coniochaeta ellipsoidea* produit un antibiotique, appelé le conoicetin, efficace contre les champignons et les bactéries en particulier *Staphylococcus aureus* multi-résistants, seulement en fermentation solide alors que sur milieu liquide ce champignon ne l'a jamais produit malgré une bonne croissance.

La culture en milieu solide constitue une méthode favorable pour les microorganismes aérobies nécessitant une faible activité d'eau. Dans ces conditions, l'oxygène est facilement disponible et les dépenses énergétiques liées au métabolisme sont réduites, ce qui stimule la biosynthèse des métabolites secondaires et permet d'obtenir des rendements plus élevés en un temps plus court (**Al-Ansari et al., 2019**).

L'extraction des métabolites antimicrobiens a été effectuée à partir des cultures sur milieux solide et liquide en utilisant deux solvants de polarité différente à savoir l'éthanol, et l'acétate d'éthyle. Les résultats obtenus montrent que l'activité antimicrobienne varie également en fonction du solvant d'extraction. L'extrait éthanolique présente la plus forte activité contre *Bacillus cereus*, tandis que l'extrait d'acétate d'éthyle possède un spectre d'action plus large mais une activité généralement plus faible.

La recherche du pouvoir inhibiteur des extraits a montré également la disparition de certaines activités antimicrobiennes qui ont été observées dans le screening primaire comme exemple l'activité du cylindre d'agar contre *Candida albicans*, et l'apparition de nouvelles

## ***Résultats et discussion***

activités antimicrobiennes après extraction comme exemple l'activité du surnageant vis-à-vis *E. coli* et *Staphylococcus aureus*. La disparition de certaines activités observées lors du screening primaire peut être expliqué par le fait que les solvants utilisés ne sont pas capables d'extraire les métabolites actives car chaque solvant possède une polarité spécifique et extrait des familles particulières de composés bioactifs, ou bien elle est due à la perte ou la dégradation de molécules au cours de l'extraction. A l'inverse, certains composés antimicrobiens présents en faible quantité dans l'extrait brut peuvent être concentrés après extraction et révéler une activité qui n'était pas détectable lors du screening primaire.

## ***Conclusion et perspectives***

## Conclusion et Perspectives

La résistance croissante des microorganismes pathogènes aux antibiotiques conventionnels constitue aujourd'hui un problème majeur de santé publique à l'échelle mondiale. Cette situation a suscité un intérêt grandissant pour la recherche de nouvelles molécules bioactives d'origine naturelle, notamment celles produites par les microorganismes extrêmophiles. En raison de leur adaptation à des conditions environnementales sévères, ces microorganismes possèdent des voies métaboliques particulières leur permettant de synthétiser des métabolites secondaires originaux présentant un fort potentiel biotechnologique.

Dans ce contexte, le présent travail s'est intéressé à l'étude d'une souche bactérienne polyextrêmophile, LMB3093, isolée de la Grande Sebkha d'Oran, dans le but de sa caractérisation phénotypiquement et d'évaluer son pouvoir à produire des composés antimicrobiens.

La caractérisation phénotypique a montré que la souche étudiée est un bacille Gram positif, mobile, sporulé, capable de croître dans une large gamme de salinité (0 à 20 % de NaCl), de température (20 à 55 °C) et de pH (5 à 9). Ces caractéristiques confirment son aptitude à s'adapter à des conditions environnementales variées et soulignent son caractère polyextrêmophile.

Le criblage primaire de l'activité antimicrobienne a révélé que la souche produit des métabolites capables d'inhiber plusieurs microorganismes de référence, notamment *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli* et *Candida albicans*. Les diamètres d'inhibition les plus importants ont été observés vis-à-vis de *Micrococcus luteus*.

L'étude comparative des deux modes de fermentation liquid et solide a montré que la fermentation sur milieu solide est nettement plus rentable à la production des métabolites antimicrobiens que la fermentation en milieu liquid.

L'extraction des métabolites à l'aide de solvants de polarités différentes a mis en évidence l'influence importante du procédé d'extraction sur le profil biologique des composés obtenus. L'extrait éthanolique a montré une activité particulièrement intéressante contre les bactéries du genre *Bacillus*, notamment *Bacillus cereus*, tandis que l'extrait d'acétate d'éthyle a présenté un spectre d'action plus large, bien que les diamètres d'inhibition observés soient relativement faibles. Par ailleurs, l'apparition de certaines activités antimicrobiennes après extraction, ainsi que la disparition d'autres activités observées lors du screening primaire, suggèrent que les métabolites produits par la souche agissent probablement de manière synergique et que leur

## ***Conclusion et Perspectives***

extraction dépend fortement de leur nature chimique et de leur solubilité dans les différents solvants utilisés.

Dans l'ensemble, les résultats obtenus démontrent que la souche LMB3093 constitue une source prometteuse de métabolites antimicrobiens et confirment le potentiel biotechnologique des microorganismes extrêmophiles des écosystèmes salins algériens, encore insuffisamment explorés.

Au regard des résultats obtenus, plusieurs perspectives de recherche peuvent être envisagées:

- Réaliser une optimisation des paramètres de culture (pH, température, salinité, durée d'incubation et composition du milieu) afin d'améliorer les rendements de production des métabolites antimicrobiens,
- Réaliser une purification et fractionnement des extraits actifs par des techniques chromatographiques afin d'isoler les molécules responsables de l'activité antimicrobienne,
- Réaliser une caractérisation chimique des composés bioactifs par des techniques analytiques modernes telles que la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS/MS), la chromatographie gazeuse (GC-MS) et la résonance magnétique nucléaire (RMN) ;
- Evaluer l'activité des métabolites produits contre des souches cliniques multirésistantes afin d'apprécier leur potentiel thérapeutique ;
- entreprendre une caractérisation moléculaire approfondie de la souche, notamment par le séquençage complet du génome et l'identification des clusters de gènes impliqués dans la biosynthèse des métabolites secondaires ;
- Explorer d'autres applications biotechnologiques potentielles de cette souche, notamment dans les domaines pharmaceutique, agroalimentaire et environnemental.

## *Références bibliographiques*

1. **Aissaoui, N., Mahjoubi, M., Nas, F., Mghirbi, O., Arab, M., Souissi, Y., Hoceini, A., Masmoudi, A. S., Mosbah, A., Cherif, A., & Klouche-Khelil, N. (2018).** Antibacterial potential of 2,4-Di-tert Butylphenol and Calixarene-based prodrugs from thermophilic *Bacillus licheniformis* isolated in algerian hot spring. *Geomicrobiology Journal*. 1-10. <https://doi.org/10.1080/01490451.2018.1503377>
2. **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>.
3. **Albasri, H. M., Almohammadi, A. A., Alhhazmi, A., Bukhari, D. A., Waznah, M. S., & Mawad, A. M. M. (2024).** Production and characterization of rhamnolipid biosurfactant from thermophilic *Geobacillus stearothermophilus* bacterium isolated from Uhud mountain. *Frontiers in microbiology*, 15, 1358175. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1358175>.
4. **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>.
5. **Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibnsouda, 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>.
6. **Basu B. (2022).** The radiophiles of Deinococcaceae family: Resourceful microbes for innovative biotechnological applications. *Current research in microbial sciences*, 3, 100153. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2022.100153>.
7. **Besse A, Vandervennet M, Goulard C, Peduzzi J, Isaac S, Rebuffat S, Carré-Mlouka A. (2017).** Halocin C8: an antimicrobial peptide distributed among four halophilic archaeal genera: Natrinema, Haloterrigena, Haloferax, and Halobacterium. *Extremophiles*. 21 (3):623-638. Doi: 10.1007/s00792-017-0931-5.
8. **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>.
9. **Boukhalfa R. K. (2018).** Isolement d'actinomycètes à partir de deux échantillons de sol et la mise en évidence de quelques activités enzymatiques. Mémoire Master Recherche :

Microbiologie générale et Biologie Moléculaire des Microorganismes. Université des Frères Mentouri Constantine 1, 2-12 p.

10. **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, 9. <https://doi.org/10.1186/1746-1448-5-9>.
11. **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.
12. **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.
13. **Das, T., Al-Tawaha, A. R., Pandey, D. K., Nongdam, P., Shekhawat, M. S., Dey, A., Choudhary, K., & Sahay, S. (2022).** Halophilic, acidophilic, alkaliphilic, metallophilic, and radioresistant fungi: habitats and their living strategies. In *Extremophilic Fungi: Ecology, Physiology and Applications*, 171-193. [https://doi.org/10.1007/978-981-164907-3\\_9](https://doi.org/10.1007/978-981-164907-3_9)
14. **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.
15. **Dishliyska, V., Miteva-Staleva, J., Gocheva, Y., Stoyancheva, G., Yovchevska, L., Abrashev, R., Spasova, B., Angelova, M., & Krumova, E. (2025).** Biological Potential of Extremophilic Filamentous Fungi for the Production of New Compounds with Antimicrobial Effect. *Fermentation*, 11(6), 347. <https://doi.org/10.3390/fermentation11060347>.
16. **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).
17. **Durán, N., Justo, G. Z., Ferreira, C. V., Melo, P. S., Cordi, L., et Martins, D. (2016).** Violacein: properties and biological activities. *Biotechnology Advances*, 34(6), 1030-1045.
18. **Encinas, J. P., Sanz-Gómez, J., García-López, M. L., García-Armesto, M. R., & Otero,**

- A. (1996). Evaluation of different systems for the identification of *Bacillus* strains isolated from Spanish fermented sausages. *Meat science*, 42 (2), 127–131. [https://doi.org/10.1016/0309-1740\(95\)00036-4](https://doi.org/10.1016/0309-1740(95)00036-4).
19. Eras-Muñoz, E., Farré, A., Sánchez, A., Font, X., & Gea, T. (2022). Microbial biosurfactants: a review of recent environmental applications. *Bioengineered*, 13(5), 12365–12391. <https://doi.org/10.1080/21655979.2022.2074621>.
20. Gomri, M.A., Bentaleb, A., Bouchekrit, S., & Kharroub, K. (2021). Isolation of thermophilic bacteria producing exopolysaccharides from the geothermal spring of Hammam Grouz (Mila, Algeria). *Algerian Journal of Nutrition and Food Sciences*, 1(4), 1–9. <https://fac.umc.edu.dz/inataa/revue/files/ajnfs0104001>.
21. Grini I., Hafsa S., Bouali H. (2022). Les actinomycètes des écosystèmes naturels algériens (Une mise à jour). Mémoire Master Recherche : Microbiologie Appliquée. Université de Larbi Tébessi-Tébessa, 13-31 p.
22. Health Protection Agency. (2011). Catalase Test. UK Standards for Microbiology Investigations. 8 Issue 2.2.
23. 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.
24. Ibrahimi M. (2020). Extraction et caractérisation de nouveaux antibactériens produits par les actinobactéries prédatrices d'origine marine. Thèse de Doctorat: Biochimie, biologie moléculaire. Université de Poitiers, 32-39 p.
25. Jung, H., Han, G., Lee, D., Jung, H.-K., Kim, Y.-S., Kong, H. J., Kim, Y.-O., Seo, Y.S., & Park, J. (2025). Understanding the Impact of Salt Stress on Plant Pathogens Through Phenotypic and Transcriptomic Analysis. *Plants*, 14(1), 97. <https://doi.org/10.3390/plants14010097>.
26. Kanekar, P.P., Kanekar, S.P. (2022). Xerophilic and Xerotolerant Microorganisms. In: Diversity and Biotechnology of Extremophilic Microorganisms from India. Microorganisms for Sustainability. Springer, Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-98119-1573-4\\_10](https://doi.org/10.1007/978-98119-1573-4_10).
27. Kang, Z., Zhang, H., & Ning, K. (2025). Discovery and optimization of antimicrobial peptides from extreme environments on global scale. *Briefings in Bioinformatics*, 26(Suppl 1), i21. <https://doi.org/10.1093/bib/bbaf631.027>.

28. Karnwal, A., Shrivastava, S., Al-Tawaha, A. R. M. S., Kumar, G., Singh, R., Kumar, A., Mohan, A., Yogita, & Malik, T. (2023). Microbial Biosurfactant as an Alternate to Chemical Surfactants for Application in Cosmetics Industries in Personal and Skin Care Products: *A Critical Review. BioMed research international*, 2023, 2375223. <https://doi.org/10.1155/2023/2375223>.
29. Kim, H. Y., Heo, D. Y., Park, H. M., Singh, D., & Lee, C. H. (2016). Metabolomic and Transcriptomic Comparison of Solid-State and Submerged Fermentation of *Penicillium expansum* KACC 40815. *PLoS ONE*, 11(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149012>.
30. Kim, S. K. (2013). Marine biomaterials : characterization, isolation and applications. CRC press.
31. Klouche Khelil, N., Aissaoui, N., Nas, F., Cayol, J. L., & Ghellai L. (2013). A novel halotolerant bacterium isolated from El Goléa Lake in Algeria and antimicrobial potential of this strain. *Journal of Agricultural Science and Technology A*. 3: 825-834.
32. 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>.
33. Kumar, V., Ahluwalia, V., Saran, S., Kumar, J., Patel, A. K., & Singhania, R. R. (2021). Recent developments on solid-state fermentation for production of microbial secondary metabolites: Challenges and solutions. *Bioresource technology*, 323, 124566. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124566>.
34. Logan, N. A., Berge, O., Bishop, A. H., Busse, H. J., De Vos, P., Fritze, D., Heyndrickx, M., Kämpfer, P., Rabinovitch, L., Salkinoja-Salonen, M. S., Seldin, L., & Ventosa, A. (2009). Proposed minimal standards for describing new taxa of aerobic, endospore-forming bacteria. *International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology*, 59 (8), 21142121. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.013649-0>.
35. MacElroy, R. D. (1974). Some comments on the evolution of extremophiles. *Biosystems*, 6 (1), 74-75.
36. Mahlapuu, M., Håkansson, J., Ringstad, L., et Björn, C. (2016). Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 6, 194.
37. McKenney, P. T., Driks, A., & Eichenberger, P. (2013). The *Bacillus subtilis* endospore:

- assembly and functions of the multilayered coat. *Nature reviews. Microbiology*, 11(1), 33–44. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2921>
38. **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.
39. **Mesbah, N. M., Cook, G. M., & Wiegel, J. (2009).** The halophilic alkalithermophile *Natranaerobius thermophilus* adapts to multiple environmental extremes using a large repertoire of Na(K)/H antiporters. *Molecular microbiology*, 74(2), 270–281. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06845.x>.
40. **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>.
41. **Naor A, Yair Y, Gophna U. (2013).** A halocin-H4 mutant *Haloferax mediterranei* strain retains the ability to inhibit growth of other halophilic archaea. *Extremophiles*. 17(6):973 <https://doi.org/10.1007/s00792-013-0579-8>.
42. **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 Sebkhah of Oran. *International Microbiology*, 24(3), 455–470. <https://doi.org/10.1007/s10123-02100185-x>.
43. **Pardhi, D. S., Panchal, R. R., Raval, V. H., Joshi, R. G., Pocza, P., Almalki, W. H., & Rajput, K. N. (2022).** Microbial surfactants: A journey from fundamentals to recent advances. *Frontiers in microbiology*, 13, 982603. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.982603>.
44. **Pardo-Esté, C., Cortés, J., Castro-Severyn, J., Pérez, V., Henriquez-Aedo, K., Cuadros, F., Yañez, C., Cuadros-Orellana, S., Molina, V., Jeffrey, W. H., Pozo, P. A., et Hengst, M. B. (2024).** Secondary metabolites with antimicrobial activity produced by thermophilic bacteria from a high-altitude hydrothermal system. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1477458. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1477458>
45. **Patidar, P., & Prakash, T. (2022).** Decoding the roles of extremophilic microbes in the anaerobic environments: Past, Present, and Future. *Current research in microbial sciences*, 3, 100146. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2022.100146>.

46. Phillips, K., Zaidan, F., Elizondo, O. R., & Lowe, K. L. (2012). Phenotypic characterization and 16S rDNA identification of culturable non-obligate halophilic bacterial communities from a hypersaline lake, La Sal del Rey, in extreme South Texas (USA). *Aquatic biosystems*, 8(1), 5. <https://doi.org/10.1186/2046-9063-8-5>.
47. Pradhan, A. K., Pradhan, N., Mall, G., et Adhikari, B. B. (2013). Application of lipopeptide biosurfactant isolated from a halophile: *Bacillus tequilensis* CH for inhibition of biofilm. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 171(6), 1362–1375.
48. Public Health England. (2014). Oxidase Test. UK Standards for Microbiology Investigations. 26 Issue 2.3.
49. Rahman, S. S., Siddique, R., & Tabassum, N. (2017). Isolation and identification of halotolerant soil bacteria from coastal Patenga area. *BMC research notes*, 10 (1), 531. <https://doi.org/10.1186/s13104-017-2855-7>.
50. Rawat, M., Chauhan, M., & Pandey, A. (2024). Extremophiles and their expanding biotechnological applications. *Archives of microbiology*, 206(6), 247. <https://doi.org/10.1007/s00203-024-03981-x>
51. Reang, L., Bhatt, S., Tomar, R. S., Joshi, K., Padhiyar, S., Bhalani, H., Kheni, J., Vyas, U. M., & Parakhia, M. V. (2024). Extremozymes and compatible solute production potential of halophilic and halotolerant bacteria isolated from crop rhizospheric soils of Southwest Saurashtra Gujarat. *Scientific reports*, 14(1), 15704. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-63581-z>.
52. Rizvi, H., Singh, V., & Ashish. (2024). Screening and characterization of biosurfactantproducing strains in contaminated soil. *Journal of Pure & Applied Microbiology*, 18(2), 1074–1084. <http://doi.org/10.22207/JPAM.18.2.24>.
53. 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>.
54. 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.

55. Saibi, A. N. E., Nas, F., Arab, M., Aissaoui, N., Boukeroui, Y., & Klouche-Khelil, N. (2022). Antimicrobial and Enzymatic Profiling of Halophilic and Halotolerant Bacteria from a Hypersaline Lake The Great Sebkh of Oran, Northwestern Algeria, *Geomicrobiology Journal*, 39 (9), 816–831.  
<https://doi.org/10.1080/01490451.2022.2079777>.
56. Salwan, R., & Sharma, V. (2020). Overview of extremophiles. Physiological and Biotechnological Aspects of Extremophiles. 3-11. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12818322-9.00001-0>.
57. Sayed, A. M., Hassan, M. H. A., Alhadrami, H. A., Hassan, H. M., Goodfellow, M., & Rateb, M. E. (2020). Extreme environments: microbiology leading to specialized metabolites. *Journal of applied microbiology*, 128(3), 630–657.  
<https://doi.org/10.1111/jam.14386>.
58. Scheffer, G., & Gieg, L. M. (2023). The Mystery of Piezophiles : Understudied Microorganisms from the Deep, Dark Subsurface. *Microorganisms*, 11(7), 1629.  
<https://doi.org/10.3390/microorganisms11071629>.
59. Sinha, A., Sinha, R., Khare, S.K. (2014). Heavy Metal Bioremediation and Nanoparticle Synthesis by Metallophiles. In: Parmar, N., Singh, A. (eds) *Geomicrobiology and Biogeochemistry. Soil Biology*, vol 39. Springer, Berlin, Heidelberg.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-642-41837-2\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-642-41837-2_6).
60. Sun, Y., Liu, W. C., Shi, X., Zheng, H. Z., Zheng, Z. H., Lu, X. H., Xing, Y., Ji, K., Liu, M., & Dong, Y. S. (2021). Inducing secondary metabolite production of *Aspergillus sydowii* through microbial co-culture with *Bacillus subtilis*. *Microbial cell factories*, 20(1), 42. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01527-0>.
61. Sysoev, M., Grötzinger, S. W., Renn, D., Eppinger, J., Rueping, M., & Karan, R. (2021). Bioprospecting of Novel Extremozymes From Prokaryotes-The Advent of Culture-Independent Methods. *Frontiers in microbiology*, 12, 630013.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.630013>.
62. Yadav, A. N., & Saxena, A. K. (2018). Biodiversity and biotechnological applications of halophilic microbes for sustainable agriculture. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, 6 (1), 48-55.
63. Yang, S.C., Lin, C.H., Sung, C.T., Fang, J.Y. (2014). Antibacterial activities of bacteriocins. *Frontiers in Microbiology*, 5:241.

## ***Références bibliographiques***

## *Annexes*

**Composition des milieux de culture et solutions**

**❖ Gélose nutritive (pH = 6,8 a 7,4)**

|                    |         |
|--------------------|---------|
| Peptone            | 05 g    |
| Extrait de viande  | 10 g    |
| Extrait de levure  | 02g     |
| Chlorure de sodium | 05g     |
| Agar               | 20g     |
| Eau distillée      | 1000 ml |

**❖ Gélose Mueller- Hinton ( pH = 7,4)**

|                            |         |
|----------------------------|---------|
| Infusion de viande de bœuf | 300g    |
| Hydrolysate de caséine     | 17,5g   |
| Amidon                     | 01,5g   |
| Agar                       | 17g     |
| Eau distillée              | 1000 ml |

**❖ Bouillon Nutritif (pH = 7,2 ± 0,2)**

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

**❖ Gélose Sabouraud (pH = 7)**

|               |         |
|---------------|---------|
| Glucose       | 40 g    |
| Peptone       | 10 g    |
| Agar          | 15 g    |
| Eau distillée | 1000 mL |

Catalogue analytique de plaque API® 20<sup>E</sup>

| Tests            | Composants actifs                  | Réactions - enzymes                                       | Résultats                                              |                           |
|------------------|------------------------------------|-----------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|---------------------------|
|                  |                                    |                                                           | Négatif                                                | Positif                   |
| ONPG             | 2-nitrophényl-βD-galactopyranoside | β-galactosidase (Ortho NitroPhényl-βDGalactopyranosidase) | Incolore                                               | Jaune                     |
| ADH              | L-arginine                         | Arginine DiHydrolase                                      | Jaune                                                  | rouge - orangé            |
| LDC              | L-lysine                           | Lysine DéCarboxylase                                      | Jaune                                                  | rouge - orangé            |
| ODC              | L-ornithine                        | Ornithine DéCarboxylase                                   | Jaune                                                  | rouge - orangé            |
| CIT              | trisodium citrate                  | utilisation du CITrate                                    | vert pâle - jaune                                      | bleu-vert - bleu          |
| H <sub>2</sub> S | sodium thiosulfate                 | production d'H <sub>2</sub> S                             | incolore - grisâtre                                    | dépôt noir - fin liseré   |
| URE              | Urée                               | UREase                                                    | Jaune                                                  | rouge - orangé            |
| TDA              | L-tryptophane                      | Tryptophane DésAminase                                    | TDA-immédiat<br>Jaune Marron-rougeâtre                 |                           |
| IND              | L-tryptophane                      | production d'INDole                                       | JAMES-immédiat<br>Incolore-vert pâle-jaune rose        |                           |
| VP               | sodium pyruvate                    | production d'acétoïne                                     | VP 1 + VP 2 / 10 min incolore - rose pâle rose - rouge |                           |
| GEL              | Gélatine (origine bovine)          | Gélatinase (GELatine)                                     | non diffusion                                          | diffusion du pigment noir |
| GLU              | D-glucose                          | fermentation - oxydation (GLUcose)                        | bleu - bleu-vert                                       | jaune - jaune gris        |
| MAN              | D-mannitol                         | fermentation – oxydation (MANnitol)                       | bleu - bleu-vert                                       | jaune - jaune gris        |
| INO              | Inositol                           | fermentation – oxydation (INOsitol)                       | bleu - bleu-vert                                       | jaune - jaune gris        |
| SOR              | D-sorbitol                         | fermentation – oxydation (SORbitol)                       | bleu - bleu-vert                                       | jaune - jaune gris        |
| RHA              | L-rhamnose                         | fermentation – oxydation (RHAmnose)                       | bleu - bleu-vert                                       | jaune - jaune gris        |
| SAC              | D-saccharose                       | fermentation – oxydation (SACcharose)                     | bleu - bleu-vert                                       | jaune - jaune gris        |
| MEL              | D-melibiose                        | fermentation – oxydation (MELibiose)                      | bleu - bleu-vert                                       | jaune - jaune gris        |
| AMY              | Amygdaline                         | fermentation – oxydation (AMYgdaline)                     | bleu - bleu-vert                                       | jaune - jaune gris        |
| ARA              | L-arabinose                        | fermentation – oxydation (ARABinose)                      | bleu - bleu-vert                                       | jaune - jaune gris        |

## ملخص

يتناول هذا العمل دراسة سلالة بكتيرية متعددة التحمل للظروف القاسية Polyextremophile تسمى LMB3093، تم عزلها من السبخة الكبرى لوهران (الجزائر)، بهدف تقييم قدرتها على إنتاج مستقلبات ذات نشاط مضاد للميكروبات. بعد إحياء السلالة ودراسة خصائصها المظهرية، تم تقييم نشاطها المضاد للميكروبات باستخدام تقنية أسطوانات الأغار من المزارع النامية على الوسط الصلب، وتقنية الأبار باستعمال الراشح الفوقي للمزارع السائلة تجاه سلالات مرجعية من الكائنات الدقيقة. بعد ذلك، تم استخلاص المستقلبات المنتجة باستعمال مذيبين مختلفي القطبية هما الإيثانول وأسيئات الإيثيل، ثم تم تحديد فعاليتها المضادة للميكروبات. أظهرت النتائج أن السلالة عبارة عن عصية موجبة الغرام، متحركة، وقادرة على النمو ضمن مجال واسع من الملوحة ودرجات الحرارة وقيم الأس الهيدروجيني، مما يؤكد طبيعتها متعددة التحمل للظروف البيئية القاسية.

كما كشف التحري الأولي عن نشاط مضاد للميكروبات ملحوظ خاصة ضد الأنواع *Bacillus cereus* و *Micrococcus luteus* و *Staphylococcus aureus*. وتبين أن التخمر على الوسط الصلب أكثر ملاءمة لإنتاج المستقلبات المضادة للميكروبات مقارنة بالتخمر في الوسط السائل.

وقد أظهر المستخلص الإيثانولي أفضل نشاط ضد الأنواع التابعة لجنس *Bacillus*، في حين أظهر مستخلص أسيئات الإيثيل طيفاً أوسع من النشاط المضاد للميكروبات. وتبرز هذه النتائج الإمكانات البيوتكنولوجية الواعدة للعزلة LMB3093 كمصدر محتمل لإنتاج جزيئات مضادة للميكروبات ذات أهمية كبيرة.

**الكلمات المفتاحية:** الكائنات الحية الدقيقة المحبة للظروف القاسية، النشاط المضاد للميكروبات، المستقلبات الثانوية، التخمر الصلب، التخمر السائل، الاستخلاص بالمذيبات.

## Abstract

This work focuses on the study of a polyextremophilic bacterial strain, designated LMB3093, isolated from the Great Sebkha of Oran (Algeria), with the aim of evaluating its potential for the production of antimicrobial metabolites. Following the revival and phenotypic characterization of the strain, its antimicrobial activity was assessed using the agar cylinder technique from solid cultures and the well diffusion method using culture supernatants against reference microorganisms.

The produced metabolites were subsequently extracted using two solvents of different polarities, ethanol and ethyl acetate, and their antimicrobial activities were evaluated. The results revealed that the strain is a Grampositive, motile rod capable of growing over a wide range of salinity, temperature, and pH conditions, confirming its polyextremophilic nature.

Primary screening demonstrated significant antimicrobial activity, particularly against *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus*, and *Staphylococcus aureus*. Solid-state fermentation proved to be more favorable for the production of antimicrobial metabolites than liquid fermentation.

The ethanolic extract exhibited the highest activity against *Bacillus* species, whereas the ethyl acetate extract showed a broader spectrum of antimicrobial activity. These findings highlight the biotechnological potential of the LMB3093 isolate as a promising source of valuable antimicrobial molecules.

**Keywords :** extremophilic microorganisms, antimicrobial activity, secondary metabolites, solid-state fermentation, liquid fermentation, solvent extraction.

## Résumé

Ce travail porte sur l'étude d'une souche bactérienne polyextremophile, nommée LMB3093, isolée de la Grande Sebkha d'Oran (Algérie), afin d'évaluer son potentiel de production de métabolites antimicrobiens. Après la revivification et la caractérisation phénotypique de la souche, l'activité antimicrobienne a été évaluée par la technique des cylindres d'agar des cultures sur milieu solide et par la technique des puits du surnageant vis-à-vis des germes de référence. Les métabolites produits ont ensuite été extraits à l'aide de deux solvants de polarités différentes, l'éthanol et l'acétate d'éthyle, puis leurs activités antimicrobiennes ont été déterminées. Les résultats ont montré que la souche est un bâtonnet à Gram positif, mobile, capable de croître dans une large gamme de salinité, de température et de pH, confirmant son caractère polyextremophile. Le screening primaire a révélé une activité antimicrobienne particulièrement importante contre *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus*. La fermentation sur milieu solide s'est avérée plus favorable à la production des métabolites antimicrobiens que la fermentation liquide. L'extrait éthanolique a présenté la meilleure activité contre les espèces du genre *Bacillus*, tandis que l'extrait d'acétate d'éthyle a montré un spectre d'activité plus large. Ces résultats soulignent le potentiel biotechnologique de l'isolat LMB3093 comme source prometteuse de molécules antimicrobiennes importantes.

**Mots clés :** microorganismes extrêmophiles, activité antimicrobienne, métabolites secondaires, fermentation solide, fermentation liquide, extraction par solvants.