

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République algérienne démocratique et populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique
جامعة عين تموشنت بلحاج بوشعيب
Université–Ain Temouchent- Belhadj Bouchaib
Faculté des Sciences et de Technologie
Département de Biologie



Projet de Fin d'Etudes
Pour l'obtention du diplôme de Master en : Microbiologie appliquée
Domaine : SNV
Filière : Sciences biologiques
Spécialité : Microbiologie appliquée
Thème

**Recherche des activités biologiques de *Bacillus sp* isolées à partir
des intestins des volailles**

Présenté Par :

- 1) Melle.BESSAYAH Zineb
- 2) Melle.BENAISSA Manel
- 3) Mme.BOUANANI Rahma

Devant le jury composé de :

Pr.ZIANE.M	Professeur UAT.B.B (Ain Temouchent)	Président
Dr.LACHACHI.M	MCA UAT.B.B (Ain Temouchent)	Examinatrice
Dr.CHERIF.N	MCA UAT.B.B (Ain Temouchent)	Encadrant

Année Universitaire 2023/2024

Remerciement

*Au terme de ce travail, nous remercions **ALLAH** de nous avoir donné son aide et la détermination, ainsi que la patience pour pouvoir franchir toutes les épreuves afin d'arriver à ce stade.*

*Notre profonde gratitude et sincères remerciements vont à notre promoteur monsieur **CHERIF Nadjib** Maitre De Conférences A à l'université BELHADJ Bouchaib de Ain Temouchent, d'avoir accepté de nous encadrer, et surtout pour nous avoir permis de travailler sur un thème de recherche aussi novateur, riche et passionnant et pour nous avoir su donner les bonnes directions à ces travaux ce qui nous avoir permis d'obtenir les résultats présentés ici, sa patience dans la correction de ce mémoire.*

*Nous exprimons nos sincères remerciements à monsieur **ZIANE.M** professeur à l'université BELHADJ Bouchaib, de nous fait l'honneur de présider le jury de notre mémoire.*

*Nous tenons aussi à remercier madame **LACHACHIM** Maitre De Conférences A à l'université BELHADJ Bouchaib de Ain Temouchent, pour avoir accepté d'examiner ce modeste travail.*

Nos vifs remerciements vont à tous les enseignants du département de Biologie, particulièrement à ceux ayant contribué à notre formation, ainsi qu'aux techniciens et ingénieurs des laboratoires de microbiologie.

*Finalement, nous remercions tous ceux ou celles qui ont contribué de près ou de loin à l'accomplissement de ce mémoire. Avous tous, **un grand Merci**.*

Dédicace

Au nom d'ALLAH le Tout-Puissant qui nous a éclairées sur les chemins de la connaissance et de la sagesse, Je dédie ce modeste travail à :

Mes très chers parents à qui je dois ce que je suis

Mes grands parents, qui sont partis trop tôt

Ma très chère sœur : Nour Elhouda

Mes très chers frères : Djillali Oualid & Mohammed Ismail

Mes anges : Rayhane & Imrane

Mes chères collègues: Rahma & Manel

Mes chers amis (es)

Mes proches et tous ceux que j'aime

Tous les gens de ma promotion 2024 enseignants et étudiants de microbiologie appliquée

Merci.

Zineb.

Dédicace

Je me dédie ce mémoire, pour reconnaître tous les efforts, la persévérance et les sacrifices que j'ai faits tout au long de cette aventure académique. Ce travail est le fruit de nombreuses nuits blanches, de défis relevés et d'une volonté de fer. Je suis fier(e) de moi-même pour avoir tenu bon et pour être arrivé(e) jusqu'ici, malgré toutes les difficultés.

À mes chers parents, pour leur soutien inconditionnel et leur amour indéfectible tout au long de mes études. Leur encouragement constant a été une source inestimable de motivation.

À mes chères sœurs, Radia et Soundous, et le fils de ma sœur AMIR YUCEF dont l'amour, le soutien et la présence ont été une source inestimable de force et de motivation. Merci pour tout ce que vous êtes et pour tout ce que vous faites. Ce travail est le reflet de votre influence positive dans ma vie.

À mes collègues Zineb et Rahma pour leur amitié et leurs efforts dans la préparation de ce travail.

À mes professeurs et encadrant, dont les conseils avisés et l'expertise ont grandement contribué à l'aboutissement de ce travail.

À mes amis et collègues, pour leur camaraderie et leur soutien moral durant ces années de labeur.

Enfin, à tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce projet.

Manel.

Dédicace

Avant tout je tien à remercier Dieu, le tout puissant de m'avoir suffisamment de courage et surtout de patience pour réaliser ce modeste travail.

Je dédie ce modeste travail,

A celui qui a toujours été mon meilleur exemple dans la vie : mon très cher père, pour son soutien et tous les sacrifices qu'il a consentis pour mon éducation et mon avenir et son entière disponibilité

A ma chère mère, pour l'amour, la douceur, la patience et la tendresse qu'elle m'a toujours donnés

Je dédie mon marie, qui à toujours été à mes coté, surtout dans les moments les plus difficiles.

Et n'oublierai pas mes chers frères et sœurs et A tous les nombres de ma famille, grands et petits

*A mes chères collègues **Zineb** et **Manel**, qui m'ont toujours encouragé*

Enfin, à toutes les personnes qui comptent pour moi, et qui m'ont accompagnées et soutenues.

Rahma.

Résumé

Le genre *Bacillus sp* est parmi les microorganismes à intérêt industriel, il se caractérise par un pouvoir enzymatique important et une forte activité antimicrobienne contre plusieurs agents pathogènes. L'objectif de la présente étude est d'isoler et de sélectionner des souches de *Bacillus sp* à partir des intestins des volailles et du sol pour évaluer leurs activités enzymatique et antimicrobienne.

Après une série de dilution et un traitement thermique et l'ensemencement de plusieurs échantillons, 25 souches différentes ont été isolées : 16 souches d'origine des intestins, 9 souches d'origine du sol. L'observation macroscopique et microscopique permis de sélectionner 12 colonies : 8 d'origine des intestins, 4 d'origine du sol.

Ces douze souches ont été sélectionnées pour étudier leur pouvoir enzymatique amylolytique sur un milieu à base d'amidon, cellulolytique à base de cellulose et protéolytique à base de lait.

Ces isolats ont été également étudiés pour mettre en évidence leur activités antimicrobienne contre quatre souches pathogènes : *Enterococcus faecalis*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus* (MRSA) et *Enterococcus faecium* ; utilisant deux méthodes : l'ensemencement en spots et la culture des bouchons de gélose.

Sept souches possèdent une activité amylolytique et protéolytique, cinq souches ont une activité cellulolytique. Les isolats avec un pouvoir enzymatique important sont : 3, 3', 5', S2.

Parmi les douze souches, huit souches ont un pouvoir antimicrobien. Les souches 6' et 7 ont une activité antimicrobienne contre toutes les bactéries pathogènes testées. La meilleure activité a observée dans cette étude est : l'activité de la souche 8 contre *Staphylococcus aureus* (MRSA) avec une zone d'inhibition importante 28 mm de diamètre.

Mots clés: *Bacillus sp*, activités biologiques, activité enzymatique, activité antimicrobienne, les intestins des volailles.

Abstract

Bacillus sp is among the microorganisms of industrial interest, this type of bacteria is characterized by significant enzymatic power and great antimicrobial activity against several pathogenic agents. The objective of the present study is to isolate and select *Bacillus sp* strains from poultry intestines and soil to evaluate their enzymatic and antimicrobial activities.

After a series of dilution and heat treatment and seeding, 25 different strains were isolated: 16 strains of intestinal origin, 9 strains of soil origin. Macroscopic and microscopic observation allowed to select 12 colonies: 8 of intestinal origin, 4 of soil origin.

These twelve strains were selected to study their enzymatic power: amylolytic on a selective starch-based medium, cellulolytic based on cellulose and proteolytic based on casein.

These isolates were also studied to demonstrate their antimicrobial activities against four pathogenic strains: *Enterococcus faecalis*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus* (MRSA) and *Enterococcus faecium*; using two methods: seeding in spots and culture of agar caps.

Seven strains have amylolytic and proteolytic activity, five strains have cellulolytic activity. The isolates with significant enzymatic power are: 3, 3', 5', S2.

Of the twelve strains, eight strains have antimicrobial power.. Strains 6' and 7 have antimicrobial activity against all pathogenic bacteria tested. The best activity observed in this study is: the activity of strain 8 against *Staphylococcus aureus* (MRSA) with a significant zone of inhibition 28 mm in diameter.

Keywords: *Bacillus sp*, biological activities, antimicrobial activity, enzymatic activity, poultry intestines

الملخص

تعتبر *Bacillus sp* من بين الكائنات الحية الدقيقة ذات الأهمية الصناعية، يتميز هذا النوع من البكتيريا بنشاط إنزيمي و نشاط مضاد للميكروبات مرتفع ضد العديد من الكائنات المسببة للأمراض. الهدف من هذه الدراسة هو عزل و إختيار السلالات من *Bacillus sp* من أمعاء الدواجن و من التربة؛ لتقييم أنشطتها الإنزيمية و المضادة للميكروبات. بعد القيام بسلسلة من التخفيف و معالجة العينات حراريا ثم زرعها، تم عزل 25 سلالة مختلفة: 16 سلالة من أمعاء الدواجن و 9 من التربة. سمح الرصد العياني والمجهري باختيار 12 مستعمرة: 8 مستعمرات من أمعاء الدواجن و 4 مستعمرات من أصل التربة.

تم اختيار هذه السلالات الاثني عشر لدراسة طاقتها الإنزيمية الانحلالية على وسط قائم على النشا، تحلل السليلوز وتحلل البروتين القائم على الحليب.

تمت دراسة هذه المستعمرات أيضا لإظهار نشاطها المضاد للميكروبات ضد أربع بكتيريا مسببة

للأمراض *Enterococcus faecalis*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus* (MRSA)

Enterococcus faecium باستخدام طريقتين: تقنية البقع و طريقة أقراص الجيلوز .

سبع سلالات تمتلك نشاط إنزيمي لتحليل الأميليات و البروتين و خمس سلالات لها نشاط إنزيمي لتحليل

السيليلوز. العزلات الأكثر نشاطا هي: 3، 3، 5 و S2 .

من بين السلالات الاثني عشر، ثماني سلالات لها قوة مضادة للميكروبات؛ تتميز السلالتان 6 و 7 بنشاط مضاد

للميكروبات ضد كل البكتيريا المسببة للأمراض التي تم إختبارها. أفضل نشاط لوحظ في هذه الدراسة : هو نشاط السلالة 8 ضد البكتيريا *Staphylococcus aureus* (MRSA) بمنطقة تثبيط يبلغ قطرها حوالي 28 ملم.

الكلمات المفتاحية: *Bacillus sp*: الأنشطة البيولوجية, النشاط المضاد للبكتيريا, النشاط الإنزيمي, أمعاء الدواجن.

Table de matières

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction1

Chapitre I : Etude bibliographique

I. Le tube digestif des volailles2

I.1. Description de tube digestif du poulet2

I.2. Le microbiote intestinal des volailles3

I.3. Le rôle de microbiote intestinal4

I.3.1. Rôle nutritionnel4

I.3.1.1. Digestion des glucides4

I.3.1.2. Digestion des protéines4

I.3.2. Rôle sur la santé de l'hôte5

I.3.2.1. Protection contre les agents pathogènes5

II. Description de genre *Bacillus*5

II.1. Les caractéristiques morphologiques5

II.2. Les caractéristiques physiologiques6

II.3. L'habitat de *Bacillus*6

II.4. Classification de *Bacillus*.....7

II.4.1. Groupe 18

II.4.1.1. Le sous groupe A8

II.4.1.2. Le sous groupe B8

II.4.2. Groupe 28

II.4.3. Groupe 3	8
II.4.3.1. Le groupe <i>Bacillus cereus</i>	8
II.4.3.2. Le groupe de <i>Bacillus subtilis</i>	9
II.5. Certain genre de <i>Bacillus</i>	9
II.5.1. <i>Bacillus licheniformis</i>	9
II.5.2. <i>Bacillus anthracis</i>	10
II.5.3. <i>Bacillus thuringiensis</i>	10
II.5.4. <i>Bacillus megaterium</i>	10
II.6. Le pouvoir pathogène de <i>Bacillus</i>	11
II.6.1. Le mode de transmission de <i>Bacillus cereus</i>	11
III. Les activités biologiques de <i>Bacillus</i>	12
III.1. La production des enzymes par <i>Bacillus</i>	12
III.1.1. La production de l'amylase par <i>Bacillus</i>	12
III.1.2. La production de protéase par <i>Bacillus</i>	13
III.1.3. La production de lipase et estérase	14
III.1.4. La production de cellulase	14
III.2. La production des composés antimicrobiens par <i>Bacillus</i>	16
III.2.1. Production des antibiotiques	16
III.2.1.1. Activité antagonisme	16
IV. L'application de <i>Bacillus</i>	17
IV.1. L'application de <i>Bacillus</i> comme probiotique	17
IV.2. L'application de <i>Bacillus</i> comme biocontrôle	17
IV.3. L'application de <i>Bacillus</i> comme des biofertilisants	17
IV.4. L'application de <i>Bacillus</i> dans la bioremédiation des métaux lourds	18

IV.4.1. La biosorption	18
IV.4.2. Bioaccumulation	19
IV.4. L'application de <i>Bacillus</i> dans la phytostimulation	20
IV.4.1. Production d'hormones de croissance	20

Chapitre II : Matériel et méthode

L'objectif de travail	22
Présentation de travail	22
Protocol expérimental	22
I. Prélèvement et échantillonnage	23
I.1.Echantillon de sol	23
I.2.Echantillon des intestins	23
II. Isolement	24
II.1.Préparation des dilutions	24
II.2.Ensemencement et purification	24
II.3.Criblage primaire des souches de <i>Bacillus sp</i>	25
III. Criblage secondaire des souches à activités biologiques	26
III.1.Recherche du pouvoir amylolytique	26
III.2.Recherche du pouvoir cellulolytique	26
III.3.Recherche du pouvoir protéolytique	27
III.4.Recherche du pouvoir antimicrobien des isolats	28
III.4.1.L'ensemencement en spot	29
III.4.2.Culture des bouchons de gélose	29

Chapitre III : Résultats et discussion

I. Isolement des souches <i>Bacillus sp</i>	31
---------------------------------------------------	----

II. Sélection et purification des souches de <i>Bacillus</i> à activités biologiques	33
II.1.Criblage primaire	33
II.2. Criblage secondaire	34
II.2.1.Criblage de l'activité enzymatique	35
II.2.1.1.L'activité amylolytique	35
II.2.1.2.L'activité cellulolytique	36
II.2.1.3.L'activité protéolytique	37
II.2.1.4. Les souches ciblées avec une productivité enzymatique importante.....	37
II.2.2.Etude de l'activité antimicrobienne des isolats	38
Discussion	42

Conclusion et perspectives

Références bibliographiques

Annexes

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
1	Bilan des familles bactériennes détectées dans le contenu digestif de poulet de chair.	3
2	Listes des espèces de <i>Bacillus</i> productrices des enzymes.	15
3	Les souches de <i>Bacillus</i> obtenues à partir de criblage première et secondaire avec leurs codes.	35
4	Les souches sélectionnées présentant l'activité enzymatique	39
5	Illustration des résultats de l'effet antibiotique des souches isolées par la culture des bouchons de gélose	41

Listes des figures

Figure	Titre	Page
1	Anatomie du tube digestif de poulet	2
2	Présentation schématique de protocole expérimental de notre étude.	22
3	Présentation des prélèvements effectués à partir des intestins	24
4	Préparation des dilutions et traitement thermique	25
5	Les étapes d'ensemencement et d'incubation des échantillons dilués	26
6	Les étapes d'étude de pouvoir enzymatique	29
7	Technique de l'étude de l'effet antibactérien par l'ensemencement en spot	30
8	Technique de l'étude de l'effet antibactérien par la culture des bouchons de gélose	31
9	Résultats d'isolement des échantillons des intestins	32
10	Résultats d'isolement des échantillons du sol	33
11	Présentation des pourcentages d'isolement des échantillons du sol et des intestins	33
12	L'observation microscopique des isolats	34
13	Résultats de repiquage des souches pures	35
14	L'activité amylolytique des <i>Bacillus sp</i>	36
15	Diagramme comparatif des souches amylolytiques obtenues des échantillons étudiés	36
16	L'activité cellulolytique des isolats	37
17	Diagramme comparatif des souches cellulolytiques	37
18	L'activité protéolytique des isolats	38

19	Diagramme comparatif des souches protéolytique	38
20	Résultats d'étude de l'effet antibactérien par l'ensemencement en spot.	40
21	Résultats d'étude de pouvoir antibactérien par la culture des bouchons de gélose	40
22	Diagramme à barre présente les diamètres des zones d'inhibition des bactéries pathogènes	42

Liste des abréviations

% : pour cent

AIA : acide indole acétique

ARNr : acide ribonucléique ribosomique

B : *Bacillus*

cm : centimètre

°C : degré Celsius

DO : densité optique

DM : dilution mère

E : Echantillon

g : Gramme

H : heure

LB: Luria-Bertani

MRSA: ou (**SARM**) *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline

mm: millimètre

MH: Muller Hinton

min: minute

ml: millilitre

NaCl : Chlorure de sodium

nm : nanomètre

pH: potentiel d'Hydrogène

sp: espèce non précisée

SA : Sol de la zone A

SB : Sol de la zone B

SC : Sol de la zone C

SM: Solution Mère

UHT: Ultra Haute Température

Introduction :

Les bactéries du genre *Bacillus* sont présentes dans une grande variété de conditions environnementales, comme le sol et les intestins des volailles. Elles sont largement réparties dans des niches écologiques spécifiques, grâce à la résistance de leurs spores à la chaleur et aux agents chimiques. (Cano et Borucki, 1995 ; Cortezzo et Setlow, 2005 ; Setlow, 2006).

Le tube digestif des volailles comprend une population microbienne très abondante et variée tels que les bactéries et les champignons, parmi ces bactéries, les entérocoques, les lactobacilles, les coliformes, et le genre *Bacillus* (Wielen et al., 2000).

Les bactéries de genre *Bacillus* ont la capacité de produire plusieurs métabolites tels que les enzymes et les antibiotiques. Parmi ces enzymes on distingue l'amylase, la protéase, la cellulase et la lipase. Ce genre est réputé par la production des antibiotiques contre les bactéries et les champignons. La synthèse de ces substances inhibitrices est décrite par différentes espèces, telles que *Bacillus subtilis*, *Bacillus polymixa*, *B.amyloliquefaciens* (Whipps, 2001 ; Stein, 2005). Et grâce à leur capacité à produire ces métabolites, ils ont été utilisés comme des espèces probiotiques dans le domaine d'aviculture, ce probiotique est utilisé comme un supplément alimentaire microbien vivant qui a un impact positif sur la santé de l'animal en améliorant son équilibre intestinal (Geert et al., 2013).

Les genres *Bacillus spp* ont également la capacité d'agir comme des biofertilisants ou des biostimulateurs, en favorisant l'absorption de certains nutriments de l'environnement (fixation d'azote, solubilisation du phosphate) ou par la biosynthèse des hormones végétales (Borriss R et al., 2015).

L'objectif du présent travail est l'évaluation de l'activité enzymatique et antimicrobienne de certaines souches de *Bacillus sp*, par la réalisation des manipulations suivantes :

- Isolement des espèces de genre *Bacillus* à partir des intestins des volailles.
- Criblage des souches productrices des enzymes tels que les protéases, cellulase et amylase.
- Évaluation de l'activité antibactérienne des souches isolées.

I. Le tube digestif des volailles**I.1. Description de tube digestif du poulet**

Le système digestif du poulet se compose de deux sections principales : l'intestin grêle et le gros intestin. L'intestin grêle est principalement responsable de la digestion et de l'absorption des nutriments.

Duodénum : il s'agit de la partie la plus basse de l'intestin dans la cavité abdominale, avec un diamètre moyen compris entre 0,8 et 2 cm chez la poule. (Salminen S et Gony M, 2002).

Jéjunum : c'est la partie la plus étendue de l'intestin chez la poule, mesurant 120 cm de longueur, avec un diamètre variant entre 0,6 et 1 cm. (Thomson A.B.R et al., 2004).

L'iléum c'est le dernier segment de l'intestin grêle est impliqué dans l'absorption de l'eau et des minéraux. Des études ont révélé que l'iléon peut également jouer un rôle significatif dans la digestion et l'absorption de l'amidon chez les poulets de chair à croissance rapide. (Svihus B, 2014).

Le gros intestin représente seulement quelques centimètres par les deux caeca qui constituent une caractéristique morphologique distinctive chez le poulet. Leur fonction principale est d'absorber l'eau et les électrolytes restants après la digestion et l'absorption qui ont lieu dans l'intestin grêle. Ils agissent également comme une barrière, empêchant la contamination de l'intestin grêle par les bactéries du côlon. (Thomas D, 1982).

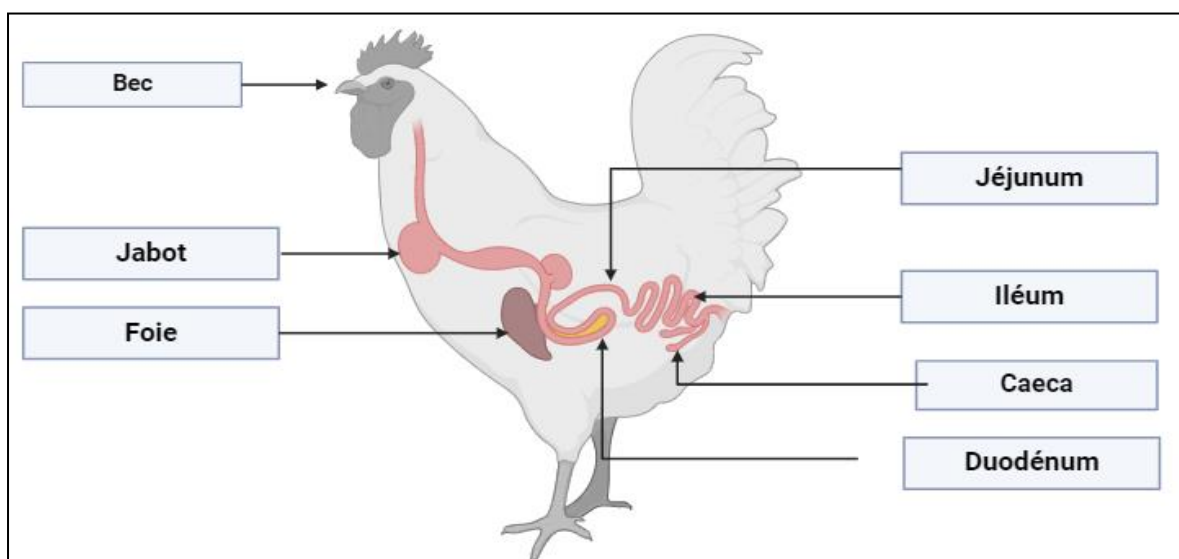


Figure 1 : Anatomie du tube digestif du poulet.

I.2. Le microbiote intestinal des volailles :

Le poulet a un intestin grêle composé à 92 % de bactéries, principalement des espèces telles que le *Lactobacillus* et l'*Enterococcus*, qui produisent de l'acide lactique

Les caeca sont majoritairement peuplés de bactéries, représentant jusqu'à 98 % de leur composition. Le microbiote intestinal subit des changements tout au long de la vie de l'animal. Pendant la jeunesse, les bactéries productrices d'acide lactique comme le *Lactobacillus* et les Bactéroides prédominent. À mesure que les poulets vieillissent, les bactéries fermentatives telles que Clostridia et Bactéroides deviennent dominantes.. (Lu J et al., 2003).

Tableau: Bilan des familles bactériennes détectées dans le contenu digestif de poulet de chair.

Localisation	Iléon		Caeca			
Références	Lu et al.,2003	Bjerrum et al.,2006	Lu et al.,2003	Zhu et al.,2002	Bjerrum et al.,2006	Lan et al.,2002
Familles	Identifications (en%)					
<i>Bifidobactérium</i>	0.2					
<i>Bactéroides</i>	0.6		5	2.2	4.4	4.0
<i>Flavobactérium</i>			0.2			
<i>Bacillus</i>	0.7		1.5			3.0
<i>Enterococcus</i>	6.4	0.7	1.0		1.3	
<i>Lactobacillus</i>	67.6	93.8	7.8	3.9	5.3	24
<i>Staphylococcus</i>	1.0	0.7				
<i>Streptococcus</i>	6.6	3.5	0.7		0.9	
<i>Weisella</i>	1.1		0.5			
<i>Clostridium</i>	9.7		39.3	9.5	62.4	55
<i>Eubactérium</i>	0.7		9.9		15.5	
<i>Faecalibactérium</i>	0.7		13.9			

I.3. Le rôle de microbiote intestinal :

Le microbiote intestinal des poulets de chair joue un rôle crucial dans plusieurs aspects de leur santé et de leur croissance.

I.3.1 Rôle nutritionnel

Le microbiote digestif améliore la disponibilité des nutriments et des minéraux essentiels en modulant leur absorption par l'épithélium intestinal. Grâce à leurs enzymes, les bactéries participent au catabolisme des composants alimentaires que l'hôte digère difficilement (**Manuel, 2013**).

I.3.1.1. Digestion des glucides

Chez les volailles, les lactobacilles sont indispensables pour la digestion de l'amidon, qui ne peut pas être réalisée uniquement par l'amylase endogène de l'animal. De plus, la salive sécrétée dans le jabot des poulets ne contient pas d'enzymes digestives. Cependant, les populations bactériennes du microbiote de cet organe peuvent sécréter des amylases et initier la digestion de l'amidon dès le jabot. Les glucides complexes non digestibles sont fermentés par la microflore principalement au niveau des caeca (**Guardia, 2011**). La présence de ces bactéries fibrolytiques, cellulolytiques et amylolytiques (*Prevotella ruminicola*, *Ruminococcus amylophilus*, *R. albus*, *R. flavefaciens*, *Streptococcus bovis*, ...) assure un apport en énergie et la production de substrats disponibles (**Florian, 2013**).

I.3.1.2. Digestion des protéines

L'effet de la microflore sur la digestibilité des protéines varie, probablement en raison des différences de composition des régimes alimentaires. Le microbiote digestif améliore la digestion des protéines de mauvaise qualité, mal hydrolysées par l'hôte. Cependant, pour les protéines fortement dénaturées par la chaleur, même la microflore ne peut les hydrolyser. En général, avec une alimentation composée de protéines très digestibles, la microflore a peu d'effet (**Gabriel et al., 2005**).

I.3.2. Rôle sur la santé de l'hôte**I.3.2.1. Protection contre les agents pathogènes**

Le phénomène d'effet barrière pourrait s'expliquer par une compétition entre les bactéries pour les sites spécifiques d'attachement de la muqueuse intestinale. Cette compétition mucosale repose sur la capacité de la microflore indigène à occuper ces sites, réduisant ainsi l'adhésion et la colonisation des agents pathogènes. Il a été démontré que certaines espèces de lactobacilles ont une plus grande affinité pour les glycoprotéines de la muqueuse comparativement à des sérovars de *Salmonella* et *E. coli*. De plus, il a été montré que l'inoculation de spores de *Bacillus subtilis* est efficace pour réprimer la colonisation de *Salmonella enteritidis* et *C.perfringens* chez les poulets (Mathieu, 2008).

En plus d'occuper les sites d'attachement de la muqueuse, la microflore intestinale empêche l'implantation de bactéries pathogènes par la compétition pour les nutriments essentiels, la libération de composés antimicrobiens dans l'écosystème intestinal, tels que des acides gras à chaîne courte et des bactériocines, et la stimulation du système immunitaire (Gabriel et al., 2005).

II. Description de genre *Bacillus* :**II.1. Les caractéristiques morphologiques :**

Sur la base des caractères morphologique, Les espèces de genre *Bacillus* sont des bactéries en forme bâtonne ou bacille avec une taille variable de (de 0,5 à 1,2 µm de diamètre et une longueur de 2,5 à 10 µm), qui peuvent se rencontrer isolées, en paires, ou en chaînes. Elles sont aérobies ou aéro-anaérobies Facultatifs mais quelques espèces sont anaérobies strictes. (Paul Vos et al., 2011)

La coloration de gram montre que les *Bacillus* sont des bacilles à Gram positive ou à Gram variable (généralement, la coloration de Gram n'est positive que pour les cultures très jeunes), en mouvement grâce à une ciliature péritriche (à l'exception de *B.anthraxis* et *B.mycoïdes* qui sont immobiles). (Paul Vos et al., 2011).

Parfois des espèces peuvent former des capsules tels que (*B.anthraxis*, *B.licheniformis*, *B.megaterium* et *B.subtilis*) peuvent produire une capsule composée d'un polymère d'acide glutamique, tandis que *B. megaterium* peut également produire une capsule comprenant à la fois un polysaccharide et un polypeptide. La plupart des espèces présentent

une catalase positive, ce qui leur donne une réponse variable au test de l'oxydase. (Paul Vos et al., 2011).

Les *Bacillus* ont la capacité de produire des spores dans des conditions environnementales défavorables. Ces endospores donnent à la bactérie une résistance et peuvent rester viables pendant une longue période. (Dragana Miljaković et al., 2020)

Il existe une grande variabilité dans la morphologie des colonies, la composition de milieu de culture et d'autres conditions d'incubation exercent une forte Influence sur cette morphologie. Malgré cette diversité, les colonies de *bacillus* ne sont généralement pas difficiles à reconnaître sur les milieux de culture (Paul Vos et al., 2011).

II.2. Les caractères physiologiques :

Les différentes espèces de *Bacillus* présentent plusieurs caractères physiologiques. Elles ont la capacité de décomposer la majorité des substrats organiques provenant d'animaux ou des végétaux, tels que la cellulose, l'amidon, les protéines, l'agar, ... (Paul Vos et al., 2011).

Ainsi, ces bactéries ont la capacité de synthétiser des métabolites extracellulaires tels que des antibiotiques, des hydrolases de la paroi cellulaire et des sidérophores, ce qui est connu sous le nom d'activité antagoniste de *Bacillus*. De plus ce sont des bactéries capables de fixer l'azote et solubiliser le phosphate et produire de phytohormone (Dragana Miljaković et al., 2020)

Ces microorganismes sont des chimiolithotrophes facultatifs, acidophiles, alcalophiles, psychrophiles, thermophiles, halotolérants, ou halophiles. A cause de cette diversité physiologique, nos connaissances sur l'écologie du *Bacillus* sont très insignifiantes (Stanley et al., 2006).

II.3. L'habitat de *Bacillus* :

En raison de leur large capacité physiologique et de leur capacité à former des endospores. *Bacillus spp* ont un large éventail d'habitats, y compris le sol (*Bacillus* représentent les bactéries prédominantes du sol et de la rhizosphère, où elles représentent jusqu'à 95 % des populations bactériennes à Gram positif) (Dragana Miljaković et al., 2020)

Elles peuvent être présentes dans l'eau et des environnements naturels, domestiques, industriels et hospitaliers. Leur large distribution est due à la Longévité extraordinaire de leurs endospores, qui montrent une résistance contre les agents Physiques et chimiques, tels que la

chaleur, le froid, la dessiccation, les désinfectants, les Antibiotiques et autres agents toxiques (Paul Vos et al., 2011).

II.4. Classification de genre *Bacillus* :

Le genre *Bacillus* a été créé en 1872 par Cohn et comprend plus de 200 espèces et sous-espèces décrites appartenant au phylum *Firmicutes* (Logan NA et al.,2009)

- Domaine : *Bactéries*
- Phylum : *Firmicutes*
- Classe III : *Bacilles*
- Ordonne I : *Bacillaires*
- Famille I : *Bacillacées*
- Genre I : *Bacillus* (Dagmar Fritzé et al., 2004)

Le genre *Bacillus* est un groupe diversifié qui regroupait de nombreuses espèces importantes (Blackwood et al., 2004 ; Liu et al., 2013). La majorité des espèces sont des saprophytes courants, mais certaines sont pathogènes notamment *B.anthraxis*, *B.cereus*, *B.circuliens*, *B.licheniforme*, et *B.subtilis* .

La méthode moderne de classification repose sur l'analyse comparative des séquences d'ARNr 16 S. et des recherches récentes utilisant cette analyse ont confirmé des niveaux élevés d'hétérogénéité phylogénétique dans ce genre (Garveba et al.,2003)

Le genre *Bacillus* regroupe un grand nombre d'espèces très répandues dans la nature. Et de nouveaux genres multiples ont été créés grâce aux caractéristiques génotypiques et phénotypiques complémentaires des espèces du genre *Bacillus* sélectionnées :

Amphibacillus , *Alicyclobacillus* , *Paenibacillus* , *Aneurinibacillus* et *Brevibacillus* , *Virgibacillus* , *Gracilibacillus* , *Salibacillus*, *Filobacillus* , *Geobacillus* , *Ureibacillus* , *Jeotgalibacillus* et *Marinibacillus*.

Par conséquent, la taxonomie finale du genre *Bacillus* est encore loin d'être définie, car de nombreuses espèces décrites initialement comme *Bacillus* ont été transférées vers des genres voisins. Cependant, *Bacillus* est un genre bactérien qui compte plus de 200 espèces et est l'un des plus importants. (Logan et al.,2007).

Anciennement, le genre *Bacillus* était divisé en trois grands groupes, en fonction de la forme de la spore et du sporange.

II.4.1. Le premier groupe : comprendre deux sous-groupes :

II.4.1.1. Le sous-groupe A :

Il se compose de : *B.anthraxis*, *B.cereus*, *B.mycoides*, *B.megaterium*, et *B.thuringiensis*.

Les caractéristiques de sous-groupe A

- Les bactéries présentent de grandes cellules dont la largeur dépasse ou égale à 1µm.
- Bacilles à coloration de Gram positif.
- Production des spores ellipsoïdes ou cylindriques. Spores centrales ou terminales, qui ne dilatent pas les sporanges.

II.4. 1. 2. Le sous-groupe B :

Il se compose de : *B.subtilis*, *B.pumilis*, *B.licheniformis*, *B.coagulans*, et *B.firmus*.

Les caractéristiques de sous-groupe B : Bactéries à petites cellules (Diamètre inférieur à 1µm)

II.4.2. Le deuxième groupe :

Il se compose de *B.alvei*, *B.brevis*, *B.circulans*, *B.larvae*, *B.lentimorbus*, *B.macerans*, *B.polymyxa*, *B.popillae* et *B.stearothermophilus*.

- La coloration de Gram pour ce groupe est variable, et ont des Sporanges gonflés avec des spores ellipsoïdes centrales ou terminales.

II.4.3. Le troisième groupe :

Il se compose de *B.sphaericus*, *B.globisporus* et *B.insolitus*.

Elles sont des espèces hétérogènes à coloration de Gram variable. Les sporanges sont gonflés, avec des spores sphériques terminales ou subterminales. **(Dromigny, 2008).**

Au cours des dernières années, une évolution taxonomique a été observée où le genre *Bacillus* était généralement divisé en deux groupes d'organismes. Le groupe *B. subtilis* et le groupe *B. cereus* **(UK Standards for Microbiology Investigations, 2015).**

II.4.3.1. Le groupe *Bacillus cereus* :

Le groupe *Bacillus cereus*, également connu sous le nom de *B.cereus sensu lato* ou « *Bacillus cereus* présomptif », ce sont des bacilles à Gram positif sporulant en forme de bâtonnet, généralement isolés du sol et d'autres matrices environnementales et alimentaires.

Le groupe *Bacillus cereus* comprend huit espèces officiellement reconnues : *B.cereus sensu stricto*, *B.anthraxis*, *B.thuringiensis*, *B. weihenstephanensis*, *B.mycoides*, *B.pseudomycoides*, *B.cytotoxicus* et *B.toyonensis* **(Jean-Pierre FACON, et Isabelle DESFORGES, 2022)**

Les génomes des espèces du groupe *B.cereus* sont très conservés, avec des tailles de 5,2 à 5,9 Mo et séquences génétiques d'ARNr 16S très similaires.

B.cereus a été isolé pour la première fois de l'air dans une étable et a été caractérisé comme une bactérie très mobile, apparaissant généralement sous forme de cellules uniques mais formant parfois des fils plus longs et provoquant une liquéfaction rapide de la gélatine.

Dans la seconde moitié du XXe siècle, *B.cereus* a été identifié comme un agent pathogène alimentaire fréquent qui cause deux types d'intoxication. *B.cereus* est de plus en plus reconnu comme un agent responsable d'infections localisées des plaies et des yeux ainsi que d'infections systémiques (**Monika Ehling-Schulzet *et al.*, 2019**)

II.4.3.2. Le groupe de *Bacillus subtilis*:

C'est une bactérie en forme de bâtonnet, qui produit des endospores permettant la survie dans des conditions environnementales extrêmes, notamment la chaleur et la dessiccation Dans le sol (**Elisabeth Härtig *et al.*, 2012**)

Ce groupe comprend : *B.spizizenii*, *B.mojavensis*, *B.vallismortis*, *B.clausii*, *B.atrophaeus*, *B.amyloliquefaciens*, *B.licheniformis*, *B.sonorensis*, *B.firmus*, *B.lentus* et *B.sporothermodurans*. (**UK Standards for Microbiology Investigations, 2015**).

BacillusSubtilis a été l'un des principaux organismes utilisés pour l'étude de la transformation génétique (**DAVID DUBNAU, 1983**)

Elle joue un rôle essentiel dans les recherches sur la physiologie et le métabolisme. En outre, en raison de son système très efficace de sécrétion de protéines et de son métabolisme adaptable, il a été largement employé comme usine cellulaire pour la fabrication microbienne de produits chimiques, d'enzymes et de matériaux antimicrobiens pour l'industrie, l'agriculture et la médecine. (**Yuan Su *et al.*, 2020**).

II.5. Certain genre de *Bacillus* :

I.5.1. *Bacillus licheniformis* :

B. licheniformis se retrouve principalement dans le sol et les plantes (**Sneath *et al.*, 1986**), Cette espèce a la capacité de provoquer parfois des intoxications alimentaires et des infections oculaires.

Certaines souches de *B.liecheniformis* possèdent un pouvoir dénitrifiant (élimination des nitrates). Cette propriété est très intéressante, elle est utilisée dans la dépollution de l'environnement (**Alexander, 1977**). Ainsi dans le secteur industriel où elle est utilisée pour la production à grande échelle de coenzymes (**Schallmey *et al.*,2004**) et particulièrement de

protéases pour les industries du textile et des détergents (**Erickson, 1976**). Et dans le secteur agricole Cette bactérie est employée pour lutter contre certains microorganismes fongiques pathogènes qui attaquent les récoltes de maïs. Et elle attire l'attention du domaine médical par sa capacité à produire de L'acide polyglutamique et la proticine (**Neyra et al., 1996**).

II.5.2. *Bacillus anthracis* :

B.anthraxis est un autre membre du groupe cereus au sens large. Elles sont des bactéries non hémolytiques, non mobiles, sporulant, aérobies, sensibles à la pénicilline et encapsulées. Elle est responsable de la maladie du charbon ou anthrax. Cette maladie est une zoonose (maladie animale contagieuse) touchant principalement les mammifères (y compris l'homme). Il existe des souches de *B.anthraxis* extrêmement virulentes et sont perçues comme des armes biologiques. (**Mock et Fouet, 2001 ; Jernigan et al., 2002**)

Les spores de *B.anthraxis* présentent une grande résistance à la sécheresse, à la chaleur, aux rayons ultra-violet, aux rayons gamma et à de nombreuses substances désinfectantes.

II.5.3. *Bacillus thuringiensis* :

Cette bactérie fait partie du groupe cereus (**Joung et Côté, 2001**). *Bacillus thuringiensis* a été isolé en 1901 à partir du ver à soie. On le retrouve dans l'air, l'eau, le feuillage des végétaux et dans les sols. Il se distingue des autres *Bacillus* du groupe *cereus* par sa capacité de produire des cristaux composés de plusieurs protéines. Ces dernières présentent certaines propriétés insecticides pour certains lépidoptères, coléoptères et diptères. Ces protéines sont responsables de la destruction des cellules de l'intestin moyen de la larve de l'insecte. *Bacillus thuringiensis* pathogène des insectes, a une importance économique considérable car certaines souches de cette espèce sont employées dans la lutte biologique contre les insectes.

II.5.4. *Bacillus megaterium* :

La bactérie *B.megaterium* était décrite par De Bary (1884), Elle se distingue par sa taille pommose, qui provient de la langue grecque « gros animal ». Cette bactérie du sol est également trouvée dans divers environnements : l'eau de mer ; les sédiments ; les poissons ; les rizières et même dans le miel d'abeille (**Vary, 1994**). C'est l'une des plus grosses bactéries rencontrées dans le sol ; sa taille dépasse 5 µm avec un volume d'environ 100 fois celle de *E. coli*. Et elle est capable de survivre dans des environnements extrêmes comme les déserts

grâce à sa capacité de sporuler. *B. megaterium* est impliqué dans le cycle du phosphore et la minéralisation microbienne du phosphore organique nécessaire pour les végétaux

II.6. Le pouvoir pathogène de *Bacillus* :

Le genre de *Bacillus* représente un groupe hétérogène qui comprenait de nombreuses espèces importantes (**Blackwood et al., 2004 ; Liu et al., 2013**). La plupart sont des saprophytes largement répandus, mais certains sont pathogènes, notamment *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. circulians*, *B. licheniforme*, et *B. Subtilis* (**Logan et Turnbull, 2003**).

La pathogénicité de la bactérie du groupe *B. cereus* est associée, en dehors de la maladie potentiellement mortelle du charbon et de certaines maladies apparentées causées par *B. anthracis* et quelques souches de *B. cereus*, à deux maladies gastro-intestinales invalidantes, les syndromes émétiques et diarrhéiques.

Bacillus cereus peut toucher une grande variété d'aliments, y compris les viandes, le lait, les légumes et le poisson, et la consommation de ces aliments provoque des intoxications alimentaires de type diarrhéique. Et Le syndrome émétique qui est causé par la toxine céréulide produite par le *B. cereus sensu lato*

Le céréulide étant généralement préformé dans les aliments, il entraîne une apparition rapide de vomissements (15 min à 6 h) après l'absorption des aliments contaminés (**Jean-Pierre FACON et Isabelle DESFORGES, 2021**)

II.6.1. Le mode de transmission des *Bacillus cereus* :

L'intoxication au *Bacillus cereus* peut être due soit à l'ingestion d'un grand nombre de cellules bactériennes et/ou de spores dans des aliments contaminés (type diarrhéique), soit à l'ingestion d'aliments contaminés par une toxine préformée (type émétique). Elle est transmise par la consommation d'aliments contaminés (par la spore, la bactérie ou ses toxines).

Le sol et les organismes associés au sol, notamment les plantes, les insectes, les nématodes et les amibes, constituent les principaux réservoirs d'acquisition de spores. Les bactéries sont transmises aux humains par les produits agricoles, notamment les aliments et les textiles d'origine animale, et pénètrent chez les humains et d'autres mammifères par ingestion, inhalation et lésions cutanées. (**Monika Ehling-Schulz et al., 2019**)

III. Les activités biologiques de genre *Bacillus* :**III.1. La production des enzymes par *Bacillus* :**

Les enzymes sont des protéines de grande taille (10 000 à 100 000 daltons) composées de longues chaînes d'acides aminés reliées par des liens peptidiques, et qui font partie de la catégorie des protéines globulaires. On les retrouve dans les cellules de tous les êtres vivants, où elles jouent un rôle crucial en régulant les mécanismes métaboliques visant à convertir les nutriments en énergie et en matériaux cellulaires. Autre fonction importante, les enzymes sont responsables de la dégradation des molécules complexes en molécules plus facilement assimilables.

Les enzymes jouent un rôle clé en catalysant diverses réactions chimiques. L'une des principales caractéristiques des enzymes réside dans leur grande capacité à stimuler des réactions chimiques spécifiques. Et De façon générale, la majorité des réactions enzymatiques peut être représentée de la façon suivante (Meunier, 1999) :



Au niveau industriel, la classe d'enzyme la plus importante est la classe des hydrolases ou enzymes hydrolytiques. (Rao et al., 1998). Les *Bacillus* représentent une source d'enzymes industrielles telles les amylases, utilisées dans L'industrie du pain, ou encore des protéases et cellulases, dans l'industrie des détergents (Cho et al., 2011)

III.1.1. La production de l'amylase par *Bacillus* :

L'alpha amylase est une enzyme ubiquitaire, synthétisée dans tous les genres de la vie (Janecek 1994, 1997). Elle appartient à la famille des glycosides hydrolases et regroupant maintenant plus de 1700 enzymes (Coutinho et Henrissat, 1999).

Elle hydrolyse les liaisons osidiques de l'amylose, de l'amylopectine, de l'amidon, du glycogène et d'autres polysaccharides contenant plus de trois liaisons α (1,4) D-Glucose (Keating et al., 1998 ; Dauter et al., 1999 ; Franco et al., 2000). En effet, elle attaque les chaînes de l'amylose en coupant les liaisons α (1,4) tous les 6 glucoses, maltose et surtout d' α -dextrines (Francoet al., 2000).

- **L'alpha amylase d'origine microbienne :**

Ce type d'enzyme est obtenu principalement par fermentation de *Bacillacées*(Milneret al., 1997).

Des alpha-amylases microbiennes sont maintenant industriellement produites, par des espèces de *Bacillus*, *Aspergillus* et *Rhizopus*, par fermentation submergée ou semi solide (Niehaus et al., 1999 ; Bel'en et al., 2006). Et Historiquement la première enzyme a été produite à partir de souches de *Bacillus amyloliquefaciens*, *B.licheniformis* (Bousseboua, 2002) ou *B.subtilis*(Mctigue et al., 1995).

III.1.2. La production de protéase par *Bacillus* :

Les protéases sont des enzymes qui catalysent hydrolyse des protéines, en scindant la liaison peptidique qui lie deux acides aminés dans une chaîne peptidique. Les protéases sont divisées en deux groupes selon leur site d'action, soit les protéases intracellulaires et extracellulaires. (Kalisz, 1988).

Les protéases intracellulaires sont essentielles pour divers processus cellulaires et métaboliques tels que la sporulation et la différenciation, la maturation des hormones et des enzymes, ainsi que la préservation du stock de protéines cellulaires. Ce genre de protéase est moins intéressant à exploiter dans le domaine industriel, car l'extraction de ces enzymes implique une phase de lyse cellulaire (Kalisz, 1988).

L'excrétion de protéases extracellulaires joue un rôle crucial dans l'hydrolyse des protéines dans l'environnement externe de la cellule, ce qui permet à la cellule d'absorber et d'utiliser les produits de cette hydrolyse. (Kalisz, 1988)

Les protéases se trouvent dans plusieurs microorganismes tels que les protozoaires, les bactéries, les levures et les champignons.

Les protéases constituent 60 à 65% du marché industriel mondial et parmi les diverses protéases, les protéases bactériennes sont plus importantes que les protéases animales et fongiques. (Banerjee et al.,1999 ;Ellaiahet al.,2003)

Et parmi les protéases bactériennes, il s'agit essentiellement de la subtilisine ou subtilase, une protéase produite par *Bacillus subtilis* et quelques genres apparentes, c'est un enzyme très stable et résiste bien à l'action des détergents, par ailleurs, elle est naturellement excrétée dans le milieu, ce qui facilite sa purification (Calk et al., 2000 ; Fraizer ,1967).

Le genre *Bacillus* représente la principale source, car ils ont la capacité de produire une grande quantité de protéines et ayant une activité protéolytique et une stabilité importante à des températures et un pH élevé. (Joo H S et al.,2003)

Bacillus subtilis est l'une des bactéries les plus largement utilisées pour la production des produits chimiques spécifiques et des enzymes industrielles et également une source majeure d'enzymes d'amylase et de protéase

Les protéases de *Bacillus* sont des enzymes qui se produisent dans le milieu extracellulaire. Il arrive que leurs productions soient réprimées par l'ajout d'un hydrolysat de protéines ou d'un mélange d'acides aminés dans le milieu de culture (**Arnaud et Guiraud, 1993**). Elles sont parmi les enzymes les plus anciennement connues et sécrétées par la plupart des espèces de *Bacillus* telles que : *Bacillus megaterium* et *Bacillus subtilis* (**Sastry et Mathur, 1979**).

III.1.3. La production des Lipases et estérases :

Les estérases sont des enzymes hydrolysant les esters carboxyliques sont ubiquistes et ont été trouvées dans les trois domaines du vivant. Ces enzymes peuvent agir en tant qu'hydrolases qui catalysent l'hydrolyse des triglycérides en acides gras et en glycérol (**Schreck et Grunden, 2014**). Elles ont la capacité de provoquer une réaction inverse ou une transestérification dans un solvant organique. Ils sont largement utilisés comme biocatalyseurs en raison de leur capacité à produire des composés purs

Leur différence avec les lipases réside dans leur préférence pour les chaînes carbonées courtes. Elles ont été largement utilisées dans les secteurs médicaux, agroalimentaires, de production d'énergie, grâce à leurs propriétés en synthèse organique (d'arômes, de détergents et de biodiesel notamment) (**Raddadi et al., 2015**).

III.1.4. La production de cellulase :

La cellulase est l'une des enzymes les plus utiles dans l'industrie (**Jutur et al. 2014**).

Les champignons, les bactéries ou les actinomycètes sont responsables de sa production. Les cellulases commerciales sont principalement d'origine fongique, mais les bactéries ont également été perçues comme des producteurs d'enzymes solides et polyvalents en raison de leur taux de croissance élevé, de leur stabilité dans des conditions extrêmes et de la présence de complexes multi-enzymatiques. Parmi les bactéries, les espèces de *Bacillus* peuvent produire plusieurs enzymes extracellulaires hydrolysantes de polysaccharidiques.

Jusqu'à récemment, l'analyse de la cellulase de *Bacillus* était en retard par rapport à celle des enzymes fongiques. Cela s'explique principalement par le fait que la majorité des

cellulases de *Bacillus* hydrolysent la carboxyméthylcellulose synthétique. Cependant, ils ne réduisent guère la forme cristalline de la cellulose. (Arifin et al., 2006)

Tableau 2 : Liste des espèces de *Bacillus* utilisées pour la production d'enzymes.

Classe d'enzymes	Enzymes	Espèces de <i>Bacillus</i>
Polymers de sucres	a-Amylase, b-Amylase, Arabinase, Cellulase, Chitinase, Chitosanase, Dextranase, Galactanase, b-1,3-glucanase, b-1,6-glucanase, Isoamylase, Lichenase, Levansucrase, Maltase, Mannanase, Pactate lysase, Phosphomannase, Pullulanase, Xylanase, Glucose isomerase	<i>B.coagulans</i> , <i>B.subtilis</i> , <i>B.licheniformis</i> , <i>B.amyloliquifaciens</i> , <i>B.cereus</i> , <i>B.megaterium</i> , <i>B.caldolyticus</i> , <i>B.polymyxa</i> , <i>B.pumilus</i> , <i>B.circulans</i> , <i>B.firmus</i> , <i>B.brevis</i> , <i>B.macerans</i> , <i>B.stearothermophilus</i>
Protéase	Aminopeptidase, Esterase, metal proteases, Serine proteases	<i>B.subtilis</i> , <i>B.cereus</i> , <i>B.licheniformis</i> , <i>B.amyloliquifaciens</i> , <i>B.megaterium</i> , <i>B.polymyxa</i> , <i>B.thermoproteolyticus</i> , <i>B.thuringiensis</i> , <i>B.pumilus</i>
Lipase	Phospholipase C, Thiaminase	<i>B.licheniformis</i> , <i>B.cereus</i> , <i>B.anthraxis</i> , <i>B.thuringiensis</i> , <i>B.thiaminolyticus</i>
Nucléases	Doxyribonuclease, Ribonucleases, 3-nucleotidases, 5-nucleotidases	<i>B.amyloliquifaciens</i> , <i>B.subtilis</i> , <i>B.cereus</i> , <i>B.megaterium</i> , <i>B.pumilus</i>
Phosphatase	Alkaline phosphatase	<i>B.amyloliquifaciens</i> , <i>B.subtilis</i> , <i>B.cereus</i>
Autres	Beta-lactamase..	<i>B.subtilis</i> , <i>B.cereus</i> , <i>B.anthraxis</i> ..

III.2. La production des composés antimicrobiens par *Bacillus* :

Le genre *Bacillus* a le potentiel de produire plus de 45 molécules antimicrobiennes, Certains de ces composés possèdent une utilisation clinique, tandis que d'autres sont testés in vitro pour surveiller les maladies des plantes et pour préserver les aliments.

Ces métabolites sont classés en deux catégories selon leur voie de biosynthèse : la première classe comprend les peptides ribosomiques synthétisés, y compris les bactériocines, et la seconde classe comprend les petits peptides synthétisés par voie enzymatique ou par des voies non ribosomiques. (Stein, 2005)

III.2.1. Production des antibiotiques :

Face au problème de l'émergence de la résistance aux antibiotiques des bactéries pathogènes, Les bactéries qui offrent une grande production de ces molécules sont celles qui appartiennent au genre *Bacillus* (Pinchuk et al.,2001)

Ce genre est réputé par la production des antibiotiques contre les bactéries, les champignons et les levures. La synthèse de ces substances inhibitrices est décrite par différentes espèces, telles que *Bacillus subtilis*, *Bacillus polymixa*, *B.amyloliquefaciens*, *B.Stearothermophilus*, *B.brevis*, *B.thuringiensis*, *B.megaterium*, *B.circulans* et *B.licheniformis*(Whipps ,2001 ; Stein, 2005) et sont généralement produites au début de la sporulation (Schallmey et al., 2004).

III.2.1.1 Activité antagoniste :

Parmi les antagonistes présents dans les sols riches en microflore équilibrée pour l'environnement et le biotope, on rencontre presque toujours des espèces du genre *Pseudomonas* et *Bacillus* (Nautiyal, 2001)

Dans le domaine de la lutte biologique, quelques bactéries ou champignons auxiliaires peuvent être employés afin de prévenir la propagation de maladies causées par des microorganismes, en utilisant différentes modes d'action :

- L'antibiose : formation de substances toxiques pour l'agent pathogène
- L'occupation de la même niche écologique : c'est l'utilisation des souches très faiblement virulentes qui peuvent occuper la même niche que les souches pathogènes et virulentes
- La compétition pour les éléments nutritifs
- L'induction de résistance chez la plante hôte
- La fixation d'azote et la solubilisation de phosphate (Fernandes, 2005).

IV. L'application de genre *Bacillus* :**IV.1. L'application de *Bacillus* comme probiotique :**

L'utilisation de *Bacillus* comme probiotique dans l'alimentation des poulets de chair offre de nombreux avantages, notamment une meilleure digestion, une réduction des pathogènes intestinaux, une stimulation du système immunitaire et une amélioration de la performance de croissance. Ces effets bénéfiques rendent les *Bacillus subtilis* et *Bacillus licheniformis* des candidats prometteurs pour améliorer la santé et la productivité dans l'élevage avicole (**Cutting, S.M, 2011**).

IV.2. L'application de *Bacillus* comme des biocontrôles :

Les espèces de *Bacillus* font partie des agents de biocontrôle les plus étudiés, ce sont de biopesticides qui favorisent la lutte contre les agents pathogènes des plantes grâce à leur antagonisme et/ou leur compétition. Les mécanismes impliqués dans l'inhibition de la croissance des agents pathogènes par *Bacillus spp.* comprennent la compétition pour les nutriments et l'espace, la production d'antibiotiques, d'enzymes hydrolytiques, de sidérophores (Les sidérophores sont sécrétés pour solubiliser le fer de leur environnement environnant, formant un complexe ferrique-sidérophore qui peut se déplacer par diffusion et être renvoyé à la surface cellulaire (**Andrews et al., 2003**)) et/ou l'induction d'une résistance systémique. (**Beneduzi A et al., 2012**)

Les principaux agents de biocontrôle, *B.subtilis* et *B.amyloliquefaciens*, consacrent respectivement 4 à 5 % et 8,5 % de leur capacité génétique totale à la production de métabolites secondaires, avec la capacité de produire plus de deux douzaines de composés antimicrobiens de différentes structures. (**Antibiotiques Stein T et al., 2005 ; Chen XH et al., 2009**)

IV.3. L'application de *Bacillus* comme des biofertilisants :

La bactérie de genre *Bacillus sp* a également la capacité d'agir comme des biofertilisants ou des biostimulateurs, soit en favorisant l'absorption de certains nutriments de l'environnement (fixation de l'azote, solubilisation du phosphate) soit en apportant à la plante un composé (biosynthèse d'hormones végétales) (**Borriss R et al., 2015**)

La mise en œuvre de biofertilisants contenant des *Bacillus spp* qui fixent de l'azote et/ou solubilisent le Phosphate est une méthode raisonnable pour minimiser les effets néfastes des engrais synthétiques sans compromettre la sécurité nutritive. Et pour favoriser directement la croissance et le rendement des plantes. (Souza R et al.,2015 et Bhattacharyya PN et al., 2016)

Ainsi, ils ont utilisé dans la biofertilisation des milieux aquatiques, pour minimiser les antibiotiques et les médicaments se fait via les probiotiques. Plusieurs espèces de probiotiques appartenant au genre *Bacillus* sont actuellement utilisées. *Bacillus subtilis* est l'un de ces probiotiques très largement utilisés en aquaculture. Ils ont de nombreux effets positifs tels que la croissance, la nutrition, l'immunité et la résistance aux maladies des espèces aquatiques.(Sukanta K. Nayak, 2020)

IV.4. L'application de *Bacillus* dans la bioremédiation des métaux lourds :

Les métaux lourds sont un groupe de métaux et de semi-métaux qui se distinguent par leur densité élevée et leurs propriétés fréquemment toxiques. Parmi tous les métaux lourds présents dans l'environnement, les quantités dangereusement accrues de Cd et de Pb constituent la plus grande préoccupation, c'est-à-dire des éléments de ballast totalement inutiles pour les organismes vivants (Monika Wróbel et al., 2023)

Le terme "bioremédiation" est dérivé de la combinaison des mots "bio", qui se réfère à la vie et aux organismes vivants, et "remédiation", qui signifie résoudre un problème (Banerje et al., 2013). L'approche de la bioremédiation consiste à utiliser des micro-organismes, comme des bactéries, des champignons ou des plantes, afin de dégrader, modifier ou éliminer ces polluants, ce qui permet de rétablir la qualité du sol. (Banerje et al., 2013)

Différentes méthodes peuvent être employées par les micro-organismes afin de supprimer les métaux lourds présents dans l'environnement.

IV.4.1.La biosorption :

La biosorption est une méthode physico-chimique qui absorbe les métaux lourds sans être liée au métabolisme, basé sur les membranes cellulaires. Il agit grâce à des substances à charge négative qui se trouvent dans les membranes cellulaires. Plusieurs paramètres influencent principalement l'efficacité de cette stratégie, tels que les caractéristiques de surface, le pH, la température ou les interactions électrostatiques. (Monika Wróbel et al., 2023)

Parmi les mécanismes de biosorption, on peut distinguer les processus suivants :

- le changement d'ions (est une réaction chimique réversible qui consiste à échanger des ions contre d'autres ions de même quantité).
- La complexation (consiste à lier les ions de métaux lourds aux groupes fonctionnels des membranes cellulaires).
- l'adsorption physique (est causée par des interactions entre les molécules, y compris les forces de Van der Waals). (Monika Wróbel et al., 2023)

Certaines souches de *Bacillus* spp peut également avoir la capacité de biosorber quelques métaux lourds. Par exemple *B.thuringiensis* qui est capable d'absorber une concentration très élevée de nickel (94 %) et le genre de *Bacillus immobile cereus* qui est capable de biosorber le mercure (Monika Wróbel et al., 2023)

IV.4.2. Bioaccumulation :

Contrairement à la biosorption, la bioaccumulation est un processus cellulaire dépendant de l'énergie mené par des micro-organismes métaboliques actifs. Et par rapport à la biosorption, La bioaccumulation des métaux lourds prend plus de temps car elle dépend des caractéristiques biochimiques, de la structure interne microbienne, de la capacité génétique et physiologique et des conditions environnementales affectées par l'activité de bioaccumulation (Monika Wróbel et al., 2023)

De plus, La bioaccumulation a également été influencée par les caractéristiques de la surface cellulaire, en particulier les variations de charge. Aussi, la température (une température plus élevée peut perturber considérablement l'activité métabolique d'une cellule bactérienne). Il est probable que le mécanisme de bioaccumulation le plus connu soit basé sur la fixation des métaux lourds par métallothionéines (les métallothionéines sont des protéines riches en cystéine) (Monika Wróbel et al., 2023)

Plusieurs recherches confirment la capacité des *Bacillus*spp et des bactéries similaires à accumuler les métaux lourds dans leur organisme. Par exemple, la production de métallothionéine a été détectée chez *Bacillus*spp par exemple *B.cereus* et *B.megaterium*.

IV.4. L'application de *Bacillus* dans la Phytostimulation:

La phytostimulation c'est l'amélioration de la croissance des plantes Par la production de phytohormones.

IV.4.1. Production d'hormones de croissance :

Les hormones sont responsables de la régulation de plusieurs étapes de la croissance et du développement des plantes, comme l'élongation et la division cellulaire, la différenciation tissulaire et la dominance apicale. De nombreuses phytohormones sont produites par *Bacillus*, ils sont responsables sur la production d'hormones telles les auxines, les cytokinines, les acides gibbérelliques et l'abaissement du taux d'éthylène chez la plante (**Costacurta et Vanderleyden ,1995 ; Glick, 1995 ; Lucy et al., 2004**)

- **Acide indole acétique (AIA) :**

Il fonctionne comme une molécule signal importante dans la régulation du développement des plantes (**Ryu et Patten, 2008**). Leur rôle dans la Stimulation de la croissance est obtenu en imitant l'effet de la bactérie par l'application directe de l'AIA sur les racines. (**Narula et al., 2006**).

Plusieurs espèces bactériennes sont capables de synthétiser de l'AIA. Il est produit par une grande partie (80 %) des bactéries vivant dans la rhizosphère (**Loper et Schroth, 1986**).

Cependant, la croissance des plantes est améliorée grâce à la colonisation racinaire avec des espèces de *Bacillus* et *Paenibacillus* qui produisent des AIA.

- **Cytokinines et gibbérellines :**

Les cytokinines, qui sont des aminopurines N6 substituées, jouent un rôle essentiel dans de nombreux processus physiologiques, tels que la division cellulaire des plantes, l'activation de la germination des graines, la promotion de la ramification, la croissance des racines, l'accumulation de la chlorophylle (**Salisbury et Ross, 1992**).

Nombreuses bactéries tels que les *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Rhizobium*, *Bacillus* et *Pseudomonas spp.* sont productrices de cette hormone (**Nieto et Frankenberger 1989 ; Timmusk et al., 1999**)

Les gibbérellines sont des acides diterpénoïques constitués de résidus isopréniques, Elles jouent un rôle dans la division et l'expansion cellulaire et participent à divers processus de développement tels que la germination des graines et la floraison.

Elles sont synthétisées par les plantes supérieures, les champignons et les bactéries (MacMillan, 2002), tels que : *Azotobacter*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Acinetobacter* (Mitter *et al.*, 2002; Tsakelova *et al.*, 2006; Joo *et al.*, 2009).

L'objectif

L'objectif principal du travail est d'isoler des souches bactériennes du genre *Bacillus* à partir des intestins des volailles et du sol, et de rechercher leurs activités biologiques telles que l'activité antimicrobienne et l'activité enzymatique.

Présentation de travail

Notre travail de recherche a été réalisé entre le 18 février 2024 et le 21 mars 2024 au niveau des laboratoires pédagogiques de la faculté des sciences et de la technologie, département de biologie à l'université d'Ain Temouchent BELHADJ Bouchaib.

Protocole expérimental

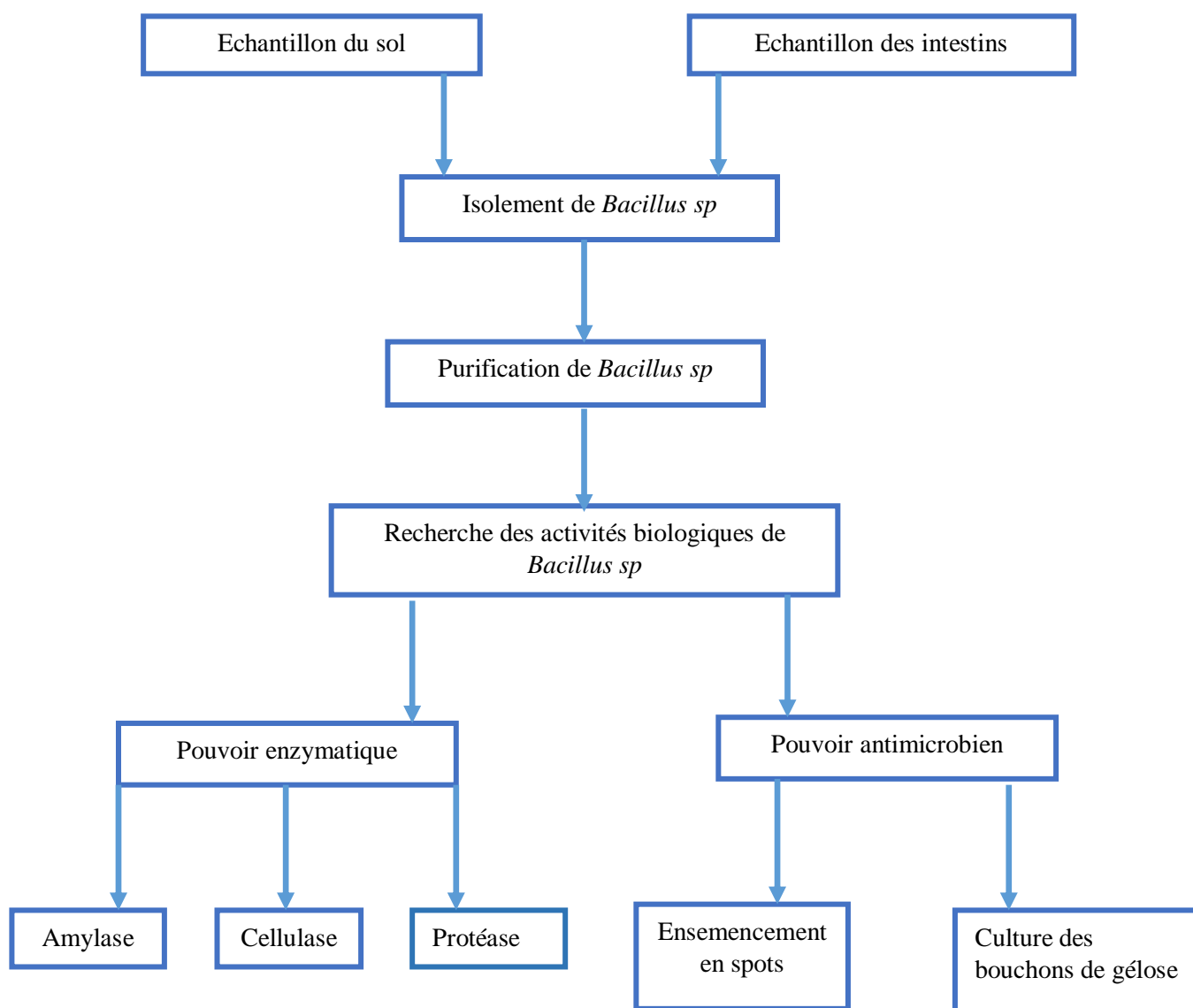


Figure 2 : Présentation schématisée de protocole expérimental de notre étude.

I. Prélèvement et échantillonnage**I. 1. Echantillon de sol**

Les échantillons ont été prélevés au niveau de trois différents sites de la wilaya d'Ain Temouchent (selon l'habitat). A l'aide d'une spatule stérile, ces échantillons ont été prélevés aléatoirement après l'élimination de 15 cm du sol de surface dans des points différents, puis les échantillons ont été mis dans des boîtes stériles puis transportés au laboratoire.

Les zones de prélèvement sont comme suite :

A : sol d'une forêt à Béni saf (SA)

B : sol d'un jardin à UATBB (SB)

C : sol d'un terrain agricole des haricots verts à Oualhaça (SC)

I.2. Echantillon des intestins

Le prélèvement a été effectué par notre promoteur à partir de quatre poulets sains et avec un poids normal et des différents âges :

- L'échantillon 1 âgé de 37 jours (E1/37) et de 46 jours (E1/46) ;
- L'échantillon 2 (E2) et l'échantillon 3 (E3), de 48 jours.

Après l'abattage, la peau des poulets a été désinfectée pour limiter la contamination microbienne. Après l'autopsie, le tube digestif de chaque poulet a été isolé de manière aseptique.

Les procédures de prélèvement ont été effectuées avec des matériaux stériles dans un endroit inoffensif, à l'aide d'un ciseau entièrement métallique et stérile, les intestins ont été incisés longitudinalement pour extraire leur contenu. Le mucus a été prélevé de différents segments (le jéjunum, l'iléon et caeca), sachant que Le mucus fournit un environnement favorable pour les bonnes bactéries de la flore intestinale, qui sont essentielles pour la digestion et la santé globale de l'animal.



Figure 3 : Présentation des prélèvements effectués à partir des intestins.

II. Isolement

II.1. Préparation des dilutions

Par la suite et à partir d'une dilution mère (DM) de 1g du sol et des mucus des intestins dilué dans 9 ml d'eau physiologique stérile, une série de dilution décimale successive (10^{-1} , 10^{-2} et 10^{-3}) a été réalisée pour chaque échantillon séparément.

Les séries des dilutions préparées ont été traitées thermiquement dans un bain-marie à 80°C pendant 10 min, ce qui permet d'isoler les formes sporulant et d'éliminer les formes végétatives.

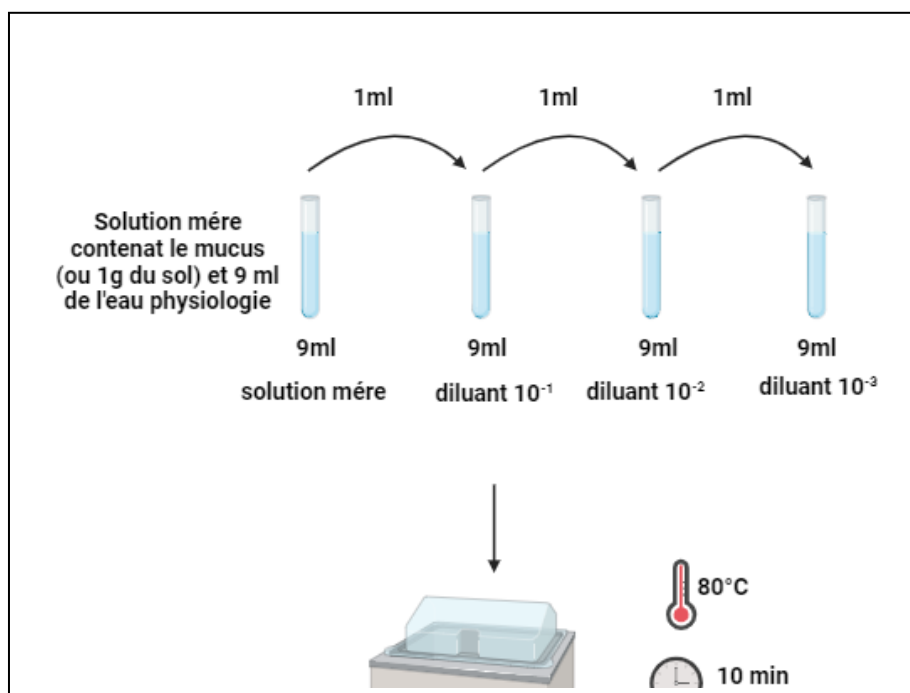


Figure 4 : Préparation des dilutions et le traitement thermique

II.2. Ensemencement et purification

Pour revivifier nos isolats de *Bacillus sp*, les dilutions appropriées ($DM - 10^{-1} - 10^{-2} - 10^{-3}$) de divers échantillons : (E1/37) - (E1/46) ; (E2) ; (E3) et (SA) ; (SB) ; (SC) ont ensuite été ensemencées sur la gélose LB (Luria-Bertani) pour favoriser la croissance des bactéries du genre *Bacillus*. De chaque dilutions, un volume de 0,01 ml a été prélevé par une micropipette puis étalé sur la surface des boîtes de Pétri contenant la gélose LB à l'aide d'un râteau stérile en verre. Les boites ensemencées ont été incubées à une température de 37 °C pendant 24 à 48 heures.

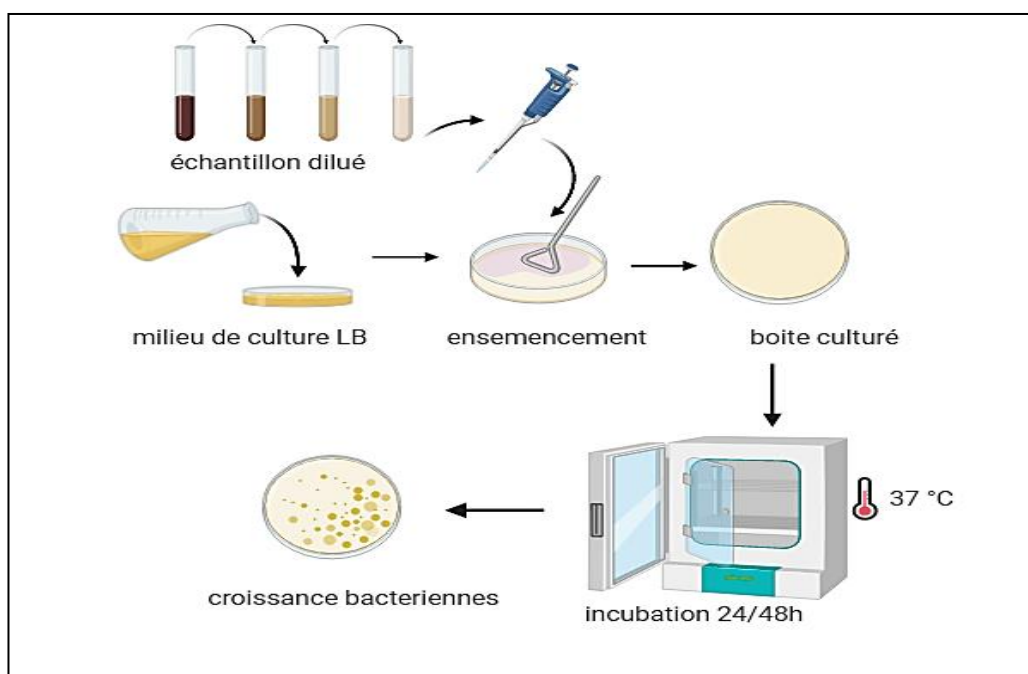


Figure 5: Les étapes d'ensemencement et incubation d'échantillons dilués

II.3. Criblage primaire des souches de *Bacillus*

Différentes formes de colonies ont été obtenues après 48 heures d'incubation. La purification se base sur l'observation des colonies à l'échelle macroscopique (forme, taille, couleur) et à l'échelle microscopique (méthode de coloration).

Le criblage primaire a été déjà fait par le traitement thermique (choc thermique) afin d'isoler le genre bactériens *Bacillus*, une confirmation par l'observation microscopique des colonies ayant l'aspect de la souche recherchée a été effectuée.

Les colonies sélectionnées ont été repiquées par la technique des quadrants sur la gélose LB pour obtenir des cultures pures.

III. Criblage secondaire des souches à activités biologiques

Le criblage des souches c'est une étape essentielle dans le processus de sélection de *Bacillus sp*, ayant des caractéristiques particulières, telles que des capacités métaboliques spécifiques, ou des propriétés enzymatiques...etc. Plusieurs critères de sélection ont été étudiés sur les isolats (recherche des amylases, des cellulases, protéase et pouvoir antibactériens).

III .1. Recherche du pouvoir amylolytique :

Pour évaluer l'activité amylolytique d'une souche de *Bacillus sp*, plusieurs étapes ont été établies.

- **Préparation de milieu :** Un milieu de culture spécifique a été préparé en combinant le milieu LB avec 1% d'amidon (gélose à l'amidon), puis stérilisé à l'autoclave à 120 °C pendant 20 minutes. Cela permet à un substrat à base d'amidon d'être fourni aux *Bacillus sp* pour la production de l'amylase.
- **Ensemencement et incubation :** L'ensemencement a été faite dans les boites pétri contenant la gélose précédent. Les souches purifiées sont ensemencées à la surface de ce milieu de culture par la méthode des spots à l'aide d'une pipette pasteur. L'incubation est faite dans des conditions favorables à la l'activité bactérienne à 37°C pendant 24 heures.
- **Lecture des résultats :**La présence d'activité amylolytique a été évaluée en effectuant une lecture par inondation de la boîte de pétri avec le Lugol pendant une minute, puis rincée avec de l'eau distillé. Le Lugol permet de réagir avec l'amidon pour former un complexe bleu. L'apparition d'une zone de décoloration autour des colonies bactériennes indique que l'amidon a été dégradé par l'amylase produite par la souche de *Bacillus sp*. Cette méthode permet ainsi de détecter et d'évaluer l'activité amylolytique des souches bactériennes testées.

III.2. Recherche du pouvoir cellulolytique:

Cette étape permet de détecter l'activité de cellulose de *Bacillus sp* par un test de coloration au Lugol.

- **Préparation de milieu :** Ce milieu (gélose à la cellulose) a été préparé de la même manière et selon les mêmes étapes que la gélose à l'amidon, mais cette fois-ci, il est à base de cellulose plutôt que d'amidon.
- **Ensemencement et incubation :** L'ensemencement a été réalisé à la surface en utilisant la méthode des spots par une pipette pasteur. Les boîtes de Pétri sont incubées à 37°C pendant 24 heures.
- **Lecture des résultats :** Après l'incubation, les boîtes de Pétri ont été examinées en utilisant une inondation par le Lugol pendant 1min, après, un rinçage par l'eau distillé nous permettre de détecter le pouvoir de *Bacillus sp* à dégrade la cellulose. Un changement de couleur a été observé lors de la lecture. La cellulose, imprégnée de réactif, gonfle et prend une couleur bleue intense. Ce changement de couleur montre la capacité de *Bacillus sp* à produire le cellulase.

III .3. Recherche du pouvoir protéolytique :

Le processus de dégradation des protéines par *Bacillus sp* est connu sous le nom d'activité protéolytique. On étudie souvent cette activité de la façon suivante :

- **Préparation de milieu :** Une gélose au lait a été préparée en ajoutant 5 ml de lait écrémé UHT chauffé au bain-marie pendant 5 minutes à 100 ml de gélose LB en surfusion dans des conditions aseptiques avant de remplir dans les boites Pétri.
- **Ensemencement et incubation :** Les mêmes souches purifiées sont ensemencées à la surface sur ce milieu gélosé par la méthode des stries. Les boîtes de Pétri sont incubées à 37°C pendant 24 heures.
- **Lecture des résultats :** La lecture des résultats a été effectuée directement pour détecter la capacité protéolytique de *Bacillus sp*. Cela a été réalisé après avoir remarqué la présence d'un halo clair autour de la culture, qui indique une hydrolyse de la protéine (test positif).

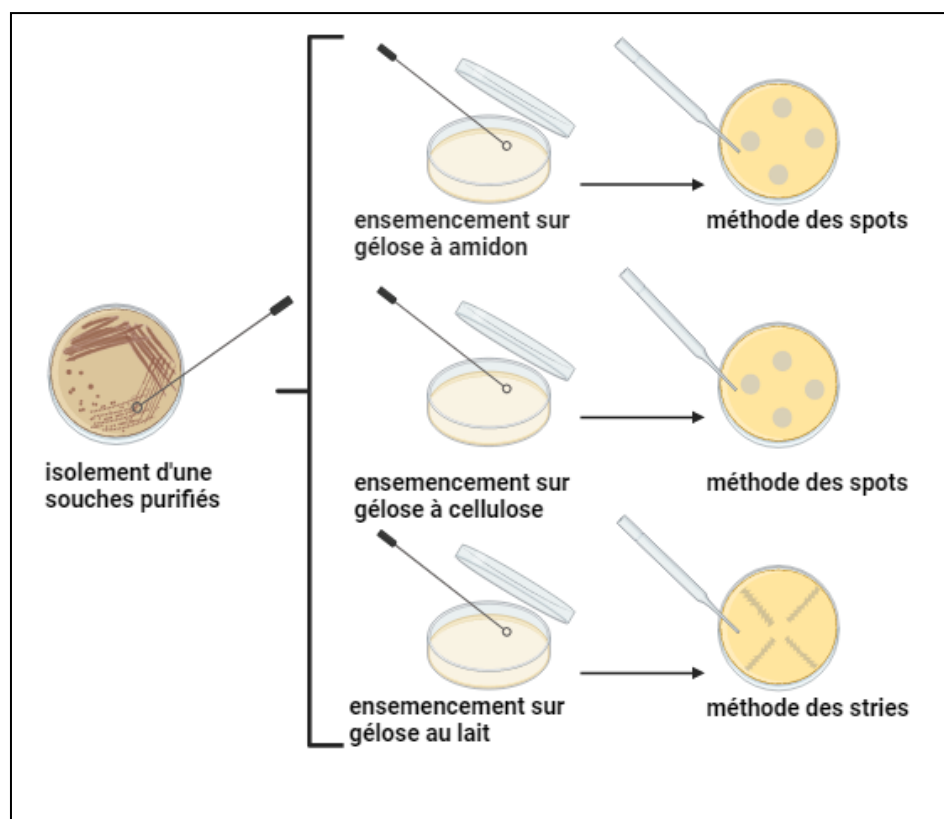


Figure 6 : Les étapes d'étude de pouvoir enzymatique (amidon ; cellulose ; protéase) de

Bacillus sp

III.4. Recherche du pouvoir antimicrobien des isolats :

Le genre de *Bacillus* produit un certain nombre de substance ayant un effet antimicrobien, y compris des antibiotiques. La diffusion des molécules antimicrobiennes sur un milieu de culture gélosé permet de révéler cette activité en inhibant la croissance des souches obtenus après le criblage primaire ont été sélectionnées et testées sur quatre souches pathogènes.

- *Enterococcus faecalis*
- *Acinetobacter baumannii*
- *Staphylococcus aureus* (MRSA)
- *Enterococcus faecium*

Dans un bouillon LB, les suspensions bactériennes des souches pathogènes ont été préparées et incubées à 37°C pendant 18h puis ajusté à une densité optique DO de 0.1 pour

une longueur d'onde de 620 nm. La suspension a été ensemencée sur une gélose MH (Mueller-Hinton) et l'activité antibactérienne a été testée par deux méthodes :

III.4.1. L'ensemencement en spot. C'est un dépôt des pré-cultures des souches obtenues en spots sur la gélose MH préalablement ensemencé par les souches pathogènes puis incubé à 37°C pendant 24h.

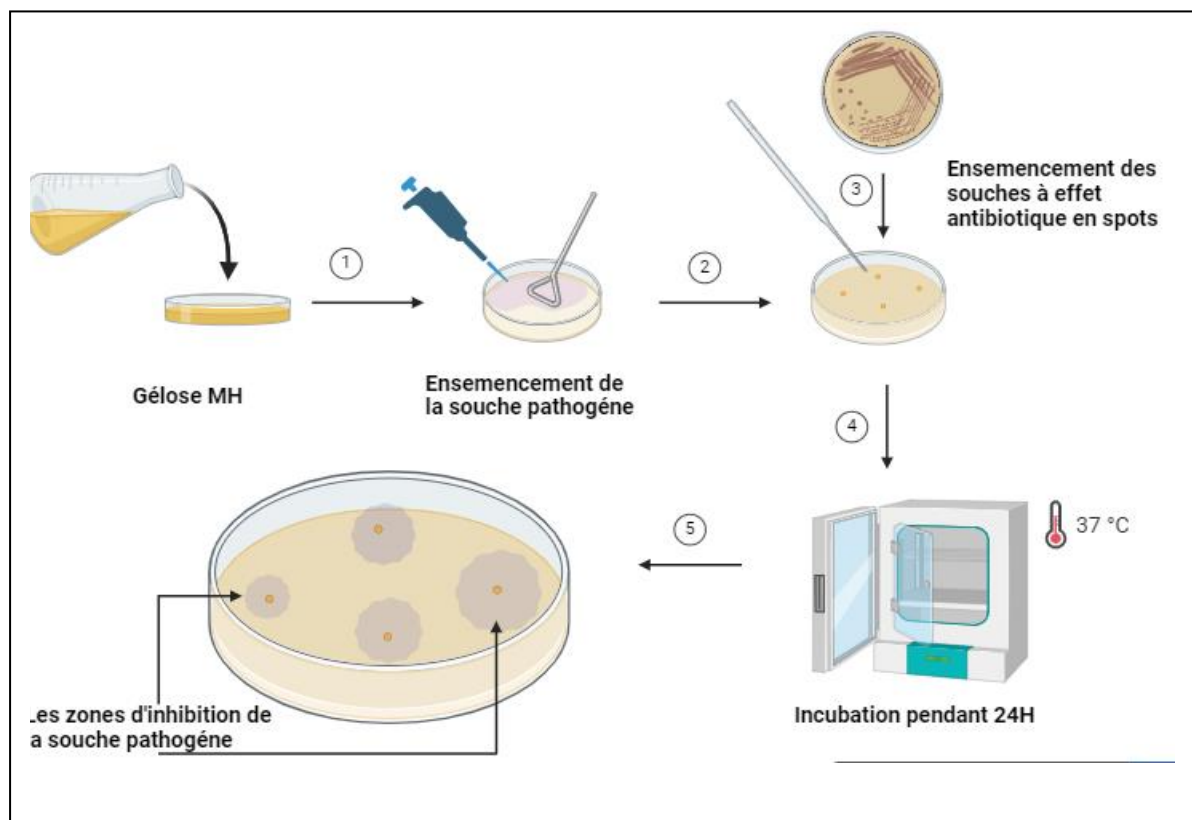


Figure 7 : Technique de l'étude de l'effet antibactérien par l'ensemencement en spot.

III.4.2. Culture des bouchons de gélose. La méthode de diffusion par les bouchons de gélose a été utilisée pour mettre en évidence l'antagonisme entre les micro-organismes, et la procédure est similaire à celle utilisée dans la méthode de diffusion des disques. Elle consiste à réaliser une culture en gélose de la souche sélectionnée par des stries serrées sur la surface. Au cours de leur croissance, les cellules microbiennes sécrètent des molécules qui diffusent dans le milieu gélosé. Après incubation, un cylindre d'agar a été découpé aseptiquement avec le bout d'une pipette Pasteur stérile puis déposé sur la surface la gélose MH préalablement inoculée par le micro-organisme test. Les substances diffusent du bouchon cylindrique vers le

milieu MH. Ensuite, l'activité antimicrobienne des molécules sécrétées par le micro-organisme a été détectée par l'apparition de la zone d'inhibition autour du bouchon d'agar (Fig.8).

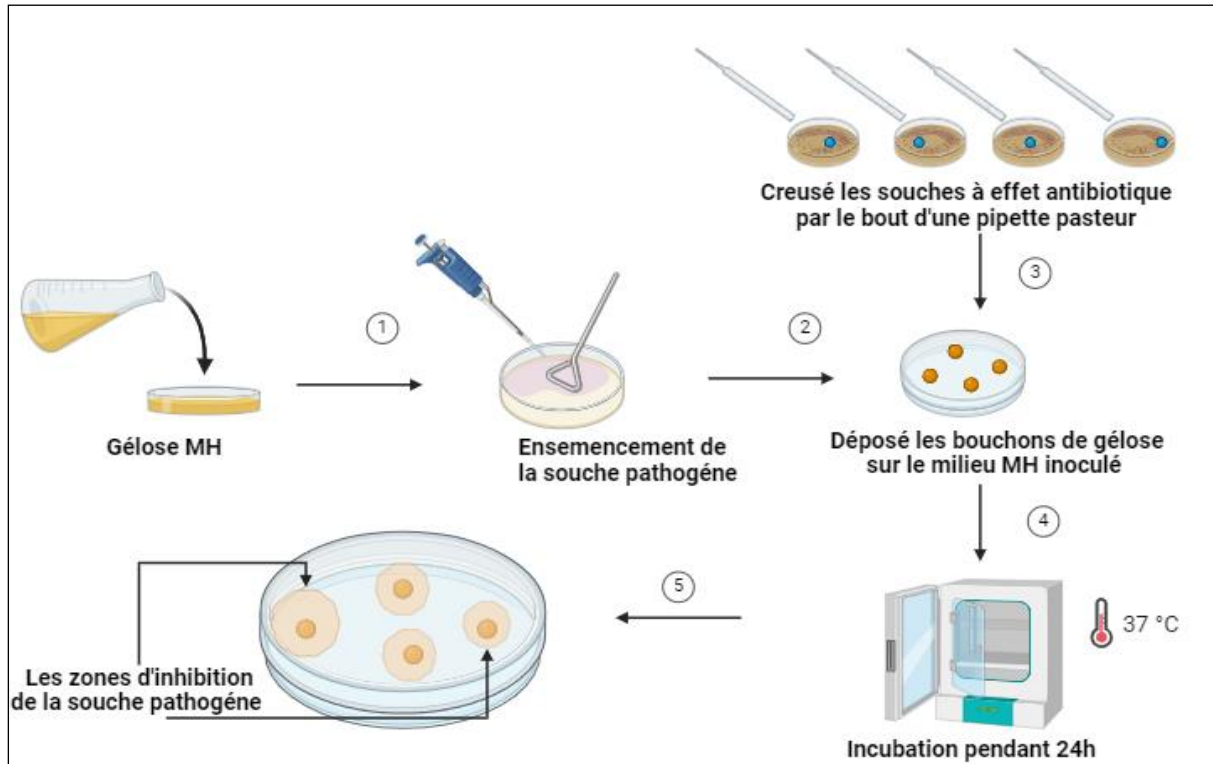


Figure 8 : Technique d'étude de l'effet antibactérien par la culture des bouchons de gélose

I. Isolement des souches de *Bacillus* :

Dans ce travail, les souches étudiées sont d'origine des deux échantillons :

- Des intestins des volailles de différents âge de 37 et 46 jours, pour l'objectif de rechercher et d'isoler des microorganismes du genre *Bacillus* ayant une activité antimicrobienne et activité enzymatique.
- Des sols collectés à partir des zones différentes de la wilaya d'Ain Temouchent.

La préparation des solutions mères a été réalisée à partir du sol d'une part et d'une bonne quantité de mucus prélevé à partir de différents segments des intestins tel que l'iléon, jéjunum et caeca d'autre part.

Les solutions mères et leurs dilutions décimales (10^{-1} , 10^{-2} et 10^{-3}) ont été traitées thermiquement à 80°C pendant 10 minutes dont le but est d'isoler la bactérie ciblée du genre *Bacillus*, puisqu'elle a la capacité à se sporuler dans les conditions défavorables. Ce traitement nous a permis d'isoler 25 souches de différents aspects macroscopiques, et les résultats sont présentés dans les **Figure 9 et 10**.

Voici les résultats d'isolement des échantillons des intestins des volaillesensemencées sur une gélose LB après 48h d'incubation à 37°C dans la figure suivante (Fig.9).

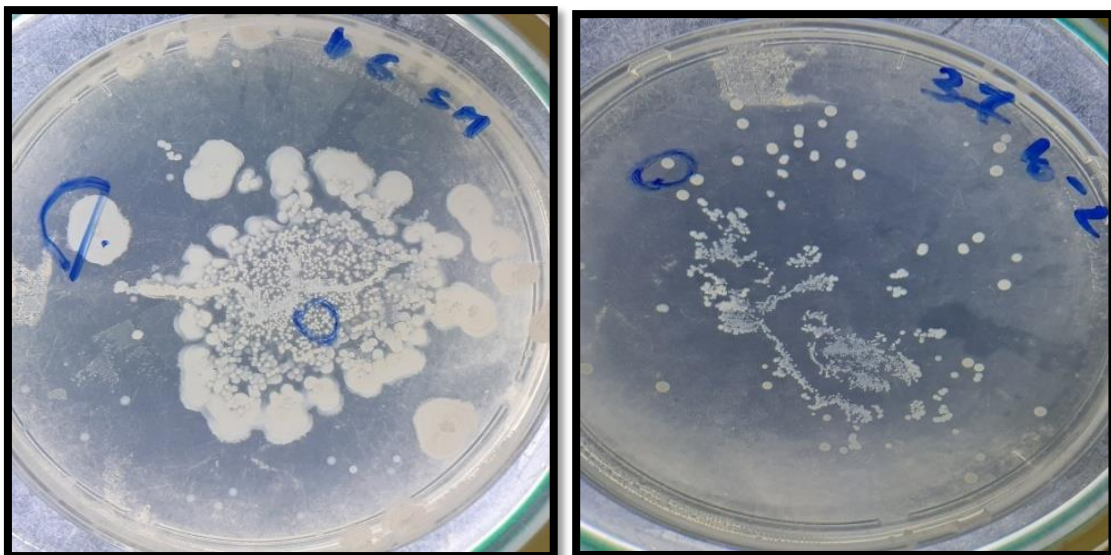


Figure 9 : Résultats d'isolement des échantillons des intestins

La figure suivante (Fig.10) représente le résultat d'isolement des échantillons du sol ensemençé sur gélose LB après 48h d'incubation à 37°C

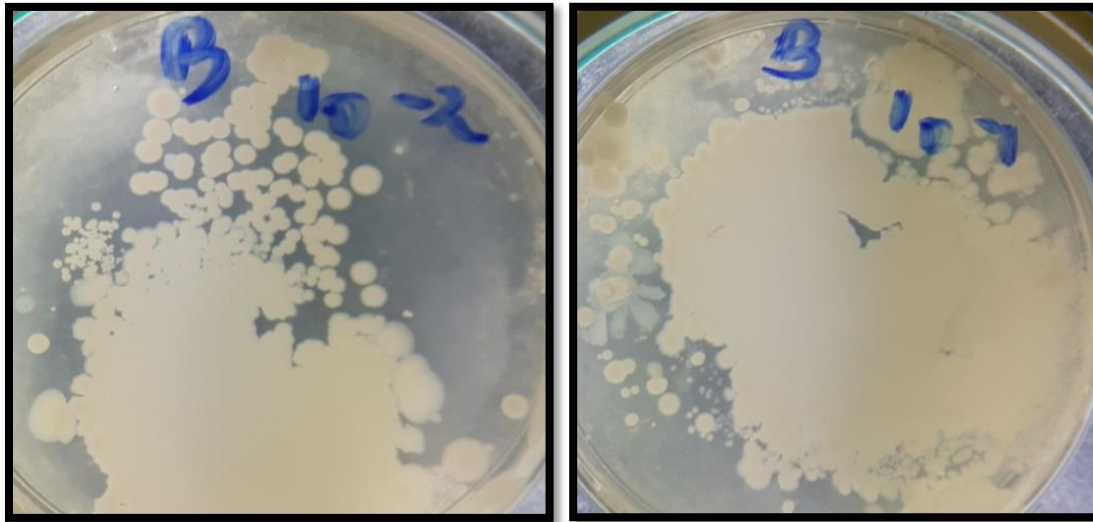


Figure 10 : Aspect macroscopique de quelques colonies du sol.

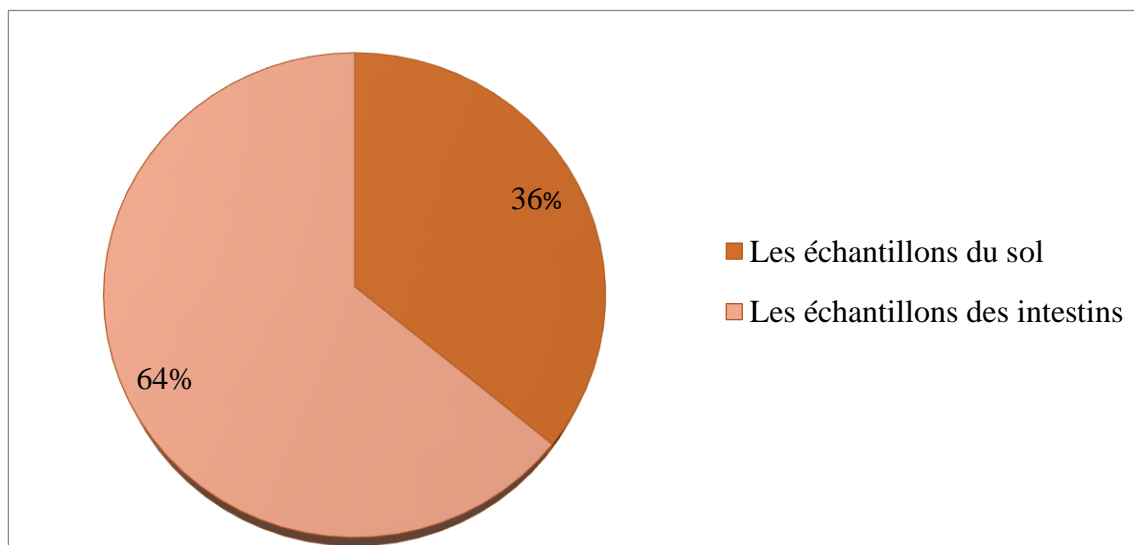


Figure 11 : Présentation des pourcentages d'isolement des échantillons du sol et des intestins.

D'après le secteur du pourcentage des résultats d'isolement, un pourcentage de (64%) est observé dans les échantillons des intestins des volailles, ce qui présente une valeur élevée par rapport les échantillons du sol (36%).

II. Sélection et purification des souches de *Bacillus sp* à activités biologiques

Cela a été faite afin de criblé les souches bactériennes qui présentent les caractéristiques de genre *Bacillus* qui produisent des enzymes qui ils sont représentés dans l'activité amylolytique, cellulolytique et protéolytique avec un effet antibactérien.

II.1. Criblage primaire :

12 souches ont été obtenues (8 souches d'intestin et 4 souches de sol) à partir de criblage primaire qui a été basé sur le traitement thermique et l'observation microscopique. Ce type de criblage a permis d'obtenir des souches du genre *Bacillus sp* et qui ont une structure des bâtonnets ; allongé avec la présence des spores...etc.

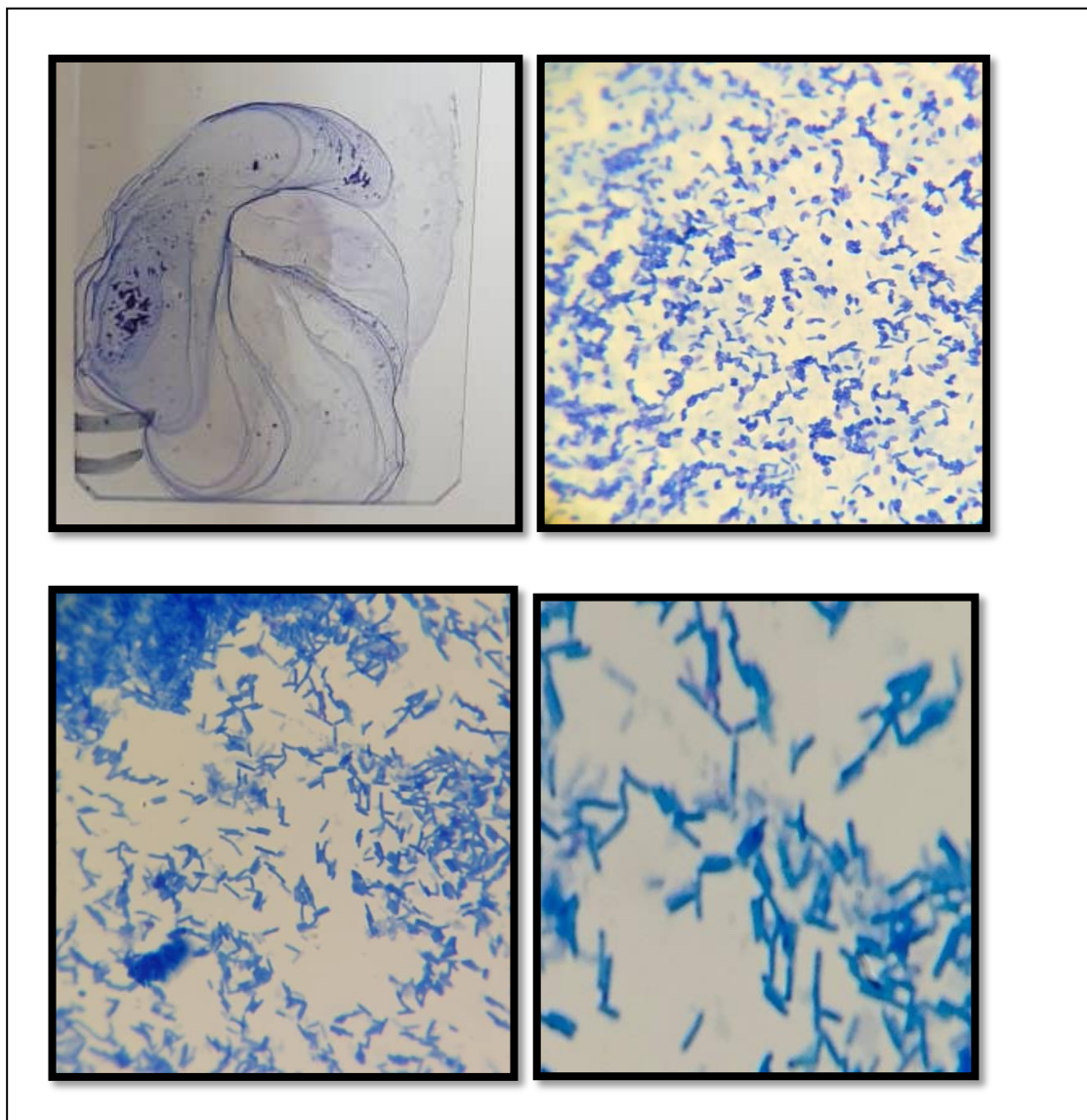


Figure 12: l'observation microscopique selon la méthode de coloration de *Bacillus sp*

II.2.Criblage secondaire :

08 souches ont été obtenues à partir de 2eme criblage qui a été fait pour sélectionner les souches du genre Bacillus qui possèdent une activité biologique (enzymatique et antibactérienne).

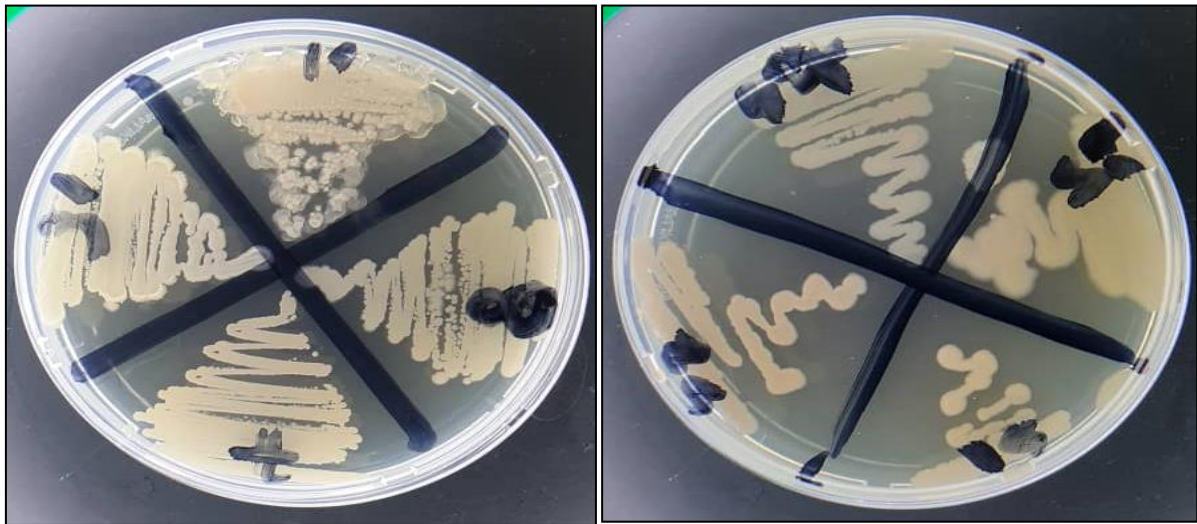


Figure 13 : Résultat de repiquage des cultures pures.

Tableau 3 : Les souches obtenues à partir du criblage primaire et secondaire

Les codes sont dans l'annexe 02

Les souches obtenues à partir du 1 ^{er} criblage	les souches obtenues à partir du 2 ^{eme} criblage
1',3 , 3',5', 6, '6, 8 ,7 S2, S4, S5, S6	3, 3', 5', 6, 6', 7, 8, S2

II.2.1. criblage de l'activité enzymatique

II.2.1.1. les bactéries amylolytique

Une activité amylolytique de *Bacillus spa* été évaluée par un ensemencement à la surface de la gélose LB à base d'amidon par la méthode des spots. Cela permet d'isoler 07 souches amylolytiques à partir des deux échantillons « intestin et sol ». La formation d'une zone claire autour des colonies après traitement par le lugol signifie l'absence d'amidon résultant par l'activité de l'enzyme amylase. Dans ce cas l'amidon a été hydrolysé par la bactérie. Cela prouve que *Bacillus sp* produite l'enzyme d'amylase.



Figure 14 : L'activité amylolytique des souches de *Bacillus sp.*

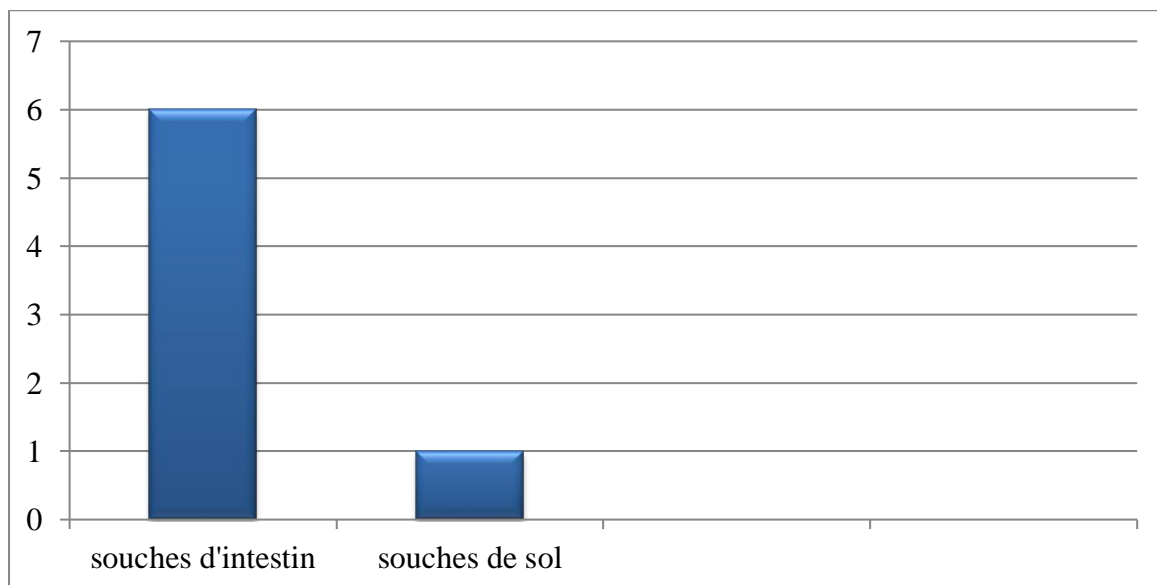


Figure 15: Diagramme comparatif des souches amylolytiques obtenues des échantillons étudiés.

II.2.1.2.L'activité cellulolytique

Une activité cellulolytique de *Bacillus spa* été évaluée par un ensemencement à la surface de gélose LB à base de la cellulose par la méthode des spots. Cela permet d'isoler 05 souches cellulolytique à partir des deux échantillons « intestin et sol »;la formation d'une zone claire autour des colonies signifie que la souche est cellulase positive. L'absence de coloration autour de la culture veut dire l'absence de cellulose. Dans ce cas la cellulose a été hydrolysée par le cellulase de la bactérie, cela prouve que *Bacillus sp* produit l'enzyme de cellulase.

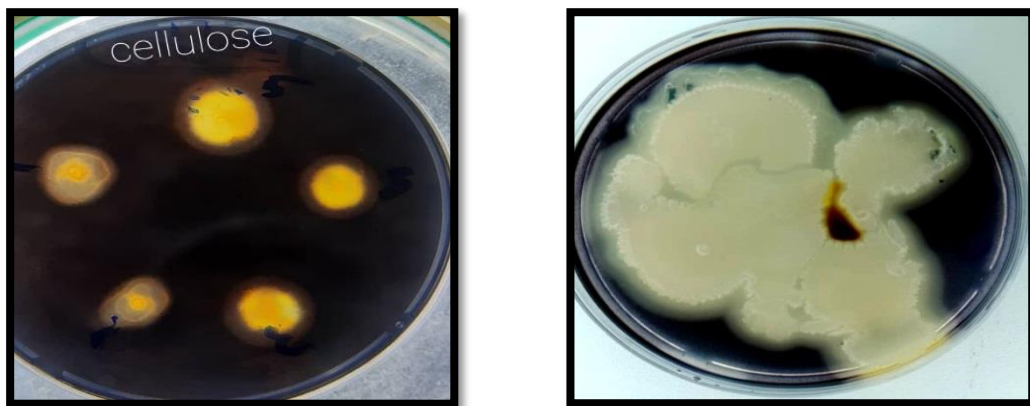


Figure 16 : L'activité cellulolytique des souches de *Bacillus sp*

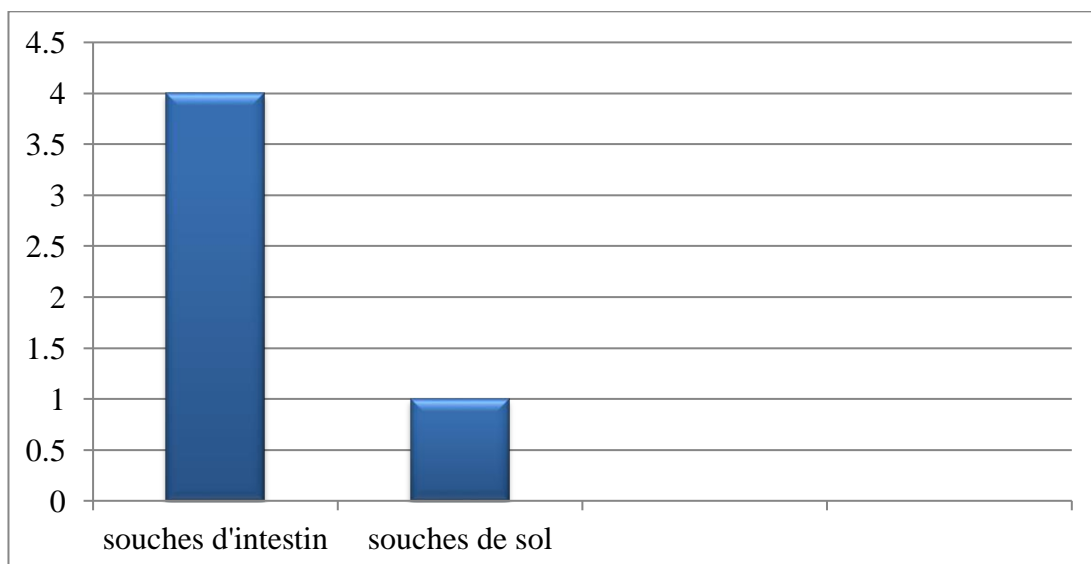


Figure 17 : Diagramme comparatif des souches cellulolytiques obtenues des échantillons étudiés

II.2.1.3.L'activité protéolytique

Une activité protéolytique de *Bacillus spa* été évaluée par un ensemencement à la surface de gélose LB à base de protéine de lait « la caséine » par la méthode des stries. Cela permet d'isoler 07 souches protéolytiques à partir des deux échantillons « intestin et sol »; et qui ont représentées par une formation d'une zone claire autour des colonies ce qui signifie un test positif ; car l'absence de coloration autour de la culture veut dire l'absence de protéine. Dans ce cas la caséine a été hydrolysée par la bactérie .Cela prouve que les *Bacillus sp* produite l'enzyme de protéase.

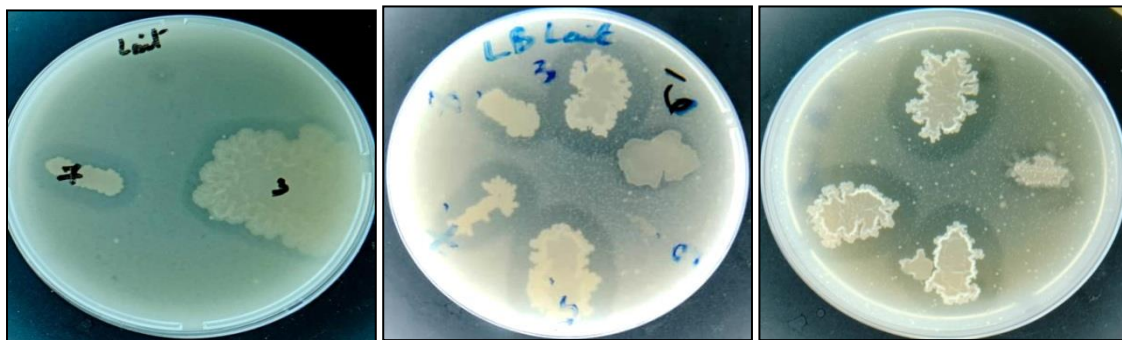


Figure 18 : L'activité protéolytique des souches de *Bacillus sp*

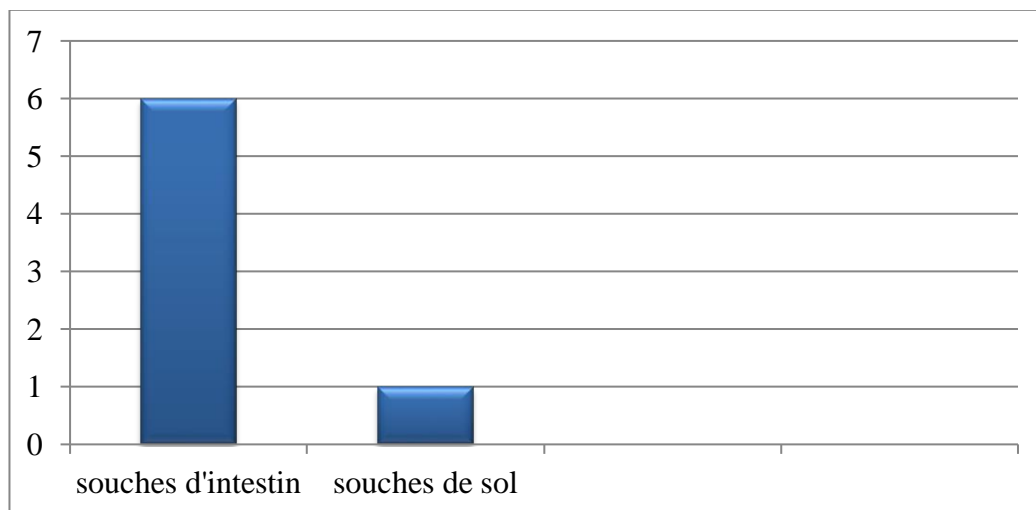


Figure 19 : Diagramme comparatif des souches protéolytiques obtenues des échantillons étudiés.

II.2.1.4. Les souches criblées avec une productivité enzymatique important

Ce tableau montre les 04 souches qui ont un pouvoir enzymatique important parmi les 08 souches criblés. Et parmi les 25 isolats précédents.

Tableau 4 : les souches sélectionnées présentant les activités enzymatiques

Souches	Activité amylolytique	Activité cellulolytique	Activité protéolytique
3	+	+	+
6	-	-	-
3'	+	+	+
6'	+	-	+
5'	+	+	+
7	-	+	+
S2	+	+	+
8	+	-	+

(+) : activité enzymatique

(-) : pas d'activité enzymatique.

II.2.2. Etude de l'activité antimicrobienne des isolats :

Dans cette étude, le pouvoir antimicrobienne a été déterminé par deux méthodes ; l'ensemencement en spot et la méthode de culture des bouchons de gélose. Douze souches à effet antibiotique ont été sélectionnées et testées sur quatre souches pathogènes (*Enterococcus faecalis*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus* (MRSA) et *Enterococcus faecium*).

La première méthode a été effectuée par l'ensemencement des souches à effet antibiotique en spots sur une gélose MH inoculée par les souches pathogènes.

Après 24h d'incubation à 37°C, l'observation d'une zone claire autour des spots indique l'inhibition des souches pathogènes donc l'existence de l'activité antimicrobienne.

La deuxième méthode a été réalisée à l'aide du bout d'une pipette pasteur stérile, les souches sélectionnées à effet antibiotique ont été creusées sous forme de cylindre d'agar et déposées sur la gélose MH inoculée par les souches pathogènes. Après 24h d'incubation à 37°C, l'apparition des zones claires autour des bouchons de gélose témoigne que les souches pathogènes ont été inhibées.

- ✓ Concernant les cultures déposées sous forme des spots, l'activité antibactérienne a été détectée chez quelques souches contre les souches pathogènes mais avec un faible potentiel.

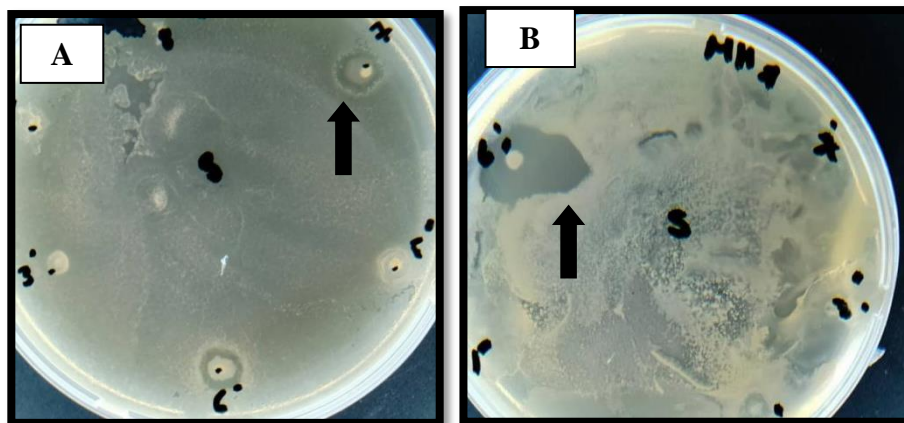


Figure 20 : Résultat d'étude de l'activité antimicrobienne par l'ensemencement en spots.

A : Le pouvoir antimicrobien de quelques isolats contre *Enterococcus faecalis*.

B : Le pouvoir antimicrobien de quelques isolats contre *Staphylococcus aureus* (MRSA).

- ✓ En revanche, les résultats de la méthode des disques de gélose, la croissance des souches pathogènes ont été empêchées avec un fort potentiel, les zones d'inhibition ont été mesurées et présentées dans **le tableau 5**.

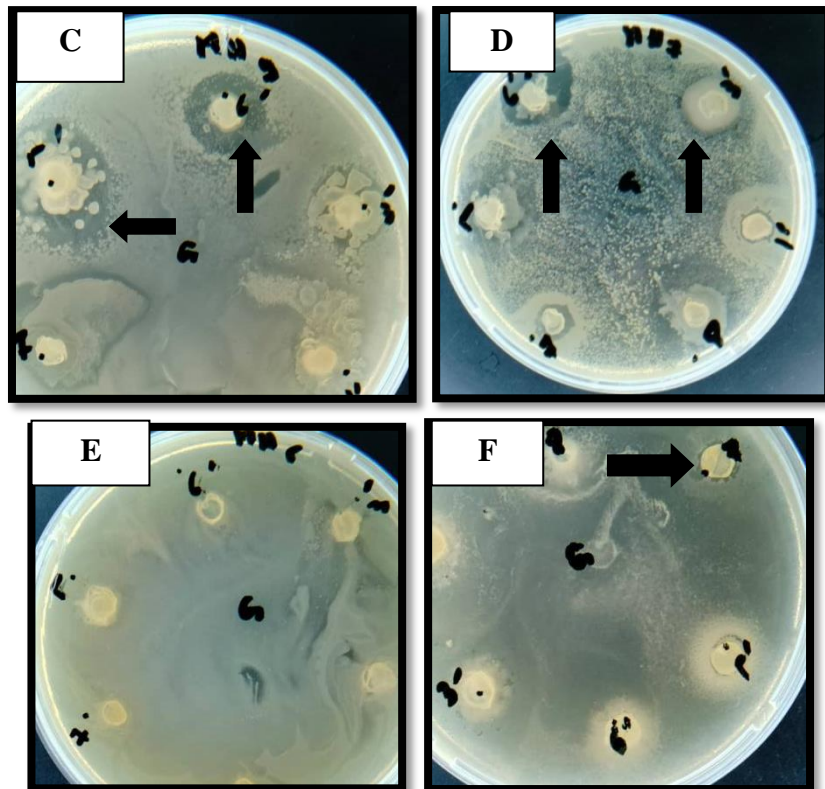


Figure 21 : Résultat d'étude de l'effet antibiotique par la culture des bouchons de gélose.

C : le pouvoir antimicrobien de quelques isolats contre *Enterococcus faecium*.

D : le pouvoir antimicrobien de quelques isolats contre *Staphylococcus aureus* (MRSA).

E : le pouvoir antimicrobien de quelques souches isolats contre *Acinetobacter baumannii*.

F : le pouvoir antimicrobien de quelques isolats contre *Enterococcus faecalis*.

La flèche : indique la zone d'inhibition.

Tableau 5 : Illustration des résultats de l'effet antibiotique des souches isolées par la culture des bouchons de gélose.

S.P <i>Bacillus</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> (3)		<i>Acinetobacter baumannii</i> (5)		<i>Staph.aureus</i> MRSA (7)		<i>Enterococcus faecium</i> (9)	
	Zone d'inhb	Diamètre	Zone d'inhb	Diamètre	Zone d'inhb	Diamètre	Zone d'inhb	Diamètre
S:3	-	/	++	10mm	-	/	++	11mm
S:3'	-	/	-	/	++	11mm	++	10mm
S:5'	-	/	+	8mm	-	/	+++	19mm
S:6	+	9mm	-	/	-	/	+++	17mm
S:6'	++	11mm	-	/	++++	20mm	++	12mm
S:7	+	8mm	-	/	++	13mm	+	8mm
S:8	-	/	-	/	++++	28mm	++	10mm
S:s2	-	/	-	/	-	/	+++	20mm

+ : présence d'une zone d'inhibition. - : absence d'une zone d'inhibition.

S : souches. S.P : souches pathogènes

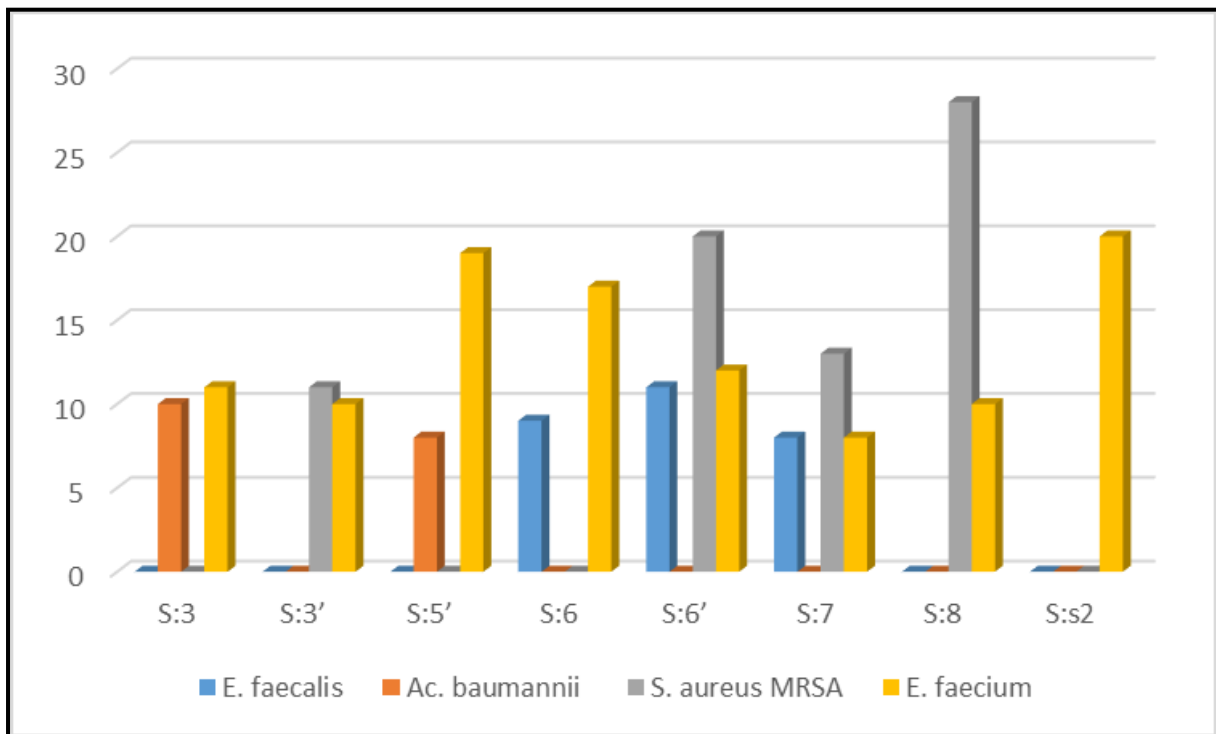


Figure 22 : Histogramme à barre présente les diamètres des zones d'inhibition des bactéries pathogènes.

- ✓ *Enterococcus faecalis* a été inhibée par ces trois souches (S6, S6' et S7).
- ✓ Les souches à effet antibiotiques (S3 et S5) ont été empêchées la croissance d'*Acinetobacter baumannii*.
- ✓ *Staphylococcus aureus* (MRSA) a été inhibée par quatre souches de *Bacillus* mais avec un grand diamètre chez (S6' et S8).
- ✓ L'effet antibactérien contre la bactérie *Enterococcus faecium* a été détecté chez toutes les souches mais avec un fort potentiel chez (Ss2 et S5').

Discussion :

L'objectif du présent travail est l'évaluation de l'activité enzymatique et antimicrobienne de certaines souches de *Bacillus sp.*

Les bactéries du genre *Bacillus* sont présentes dans une grande variété de conditions environnementales, comme le sol et les intestins des volailles. Elles sont largement réparties dans des niches écologiques spécifiques, grâce à la résistance de leurs spores à la chaleur et aux agents chimiques. (Cano et Borucki, 1995 ; Cortezzo et Setlow, 2005 ; Setlow, 2006).

La flore digestive des volailles diffère selon les segments du tractus digestif (Chafai, 2006). *Bacillus sp* présente dans l'intestin grêle (jéjunum et iléon) à partir de 21 jours après l'éclosion avec un pourcentage de 2,6% à 4%. Et dans le caeca à partir de 14 jours après l'éclosion avec un pourcentage de 1,8% jusqu'à 4% (Lu et al., 2003).

La présence de ce genre de bactérie contribue à l'immuno-stimulation des volailles avec l'effet inhibiteur sur la croissance des bactéries pathogènes ; *Bacillus spa* un rôle très important dans la digestion grâce à son pouvoir enzymatique (Cribson et Roberfroid, 1995).

Notre étude est prouvée que *Bacillus sp* elles ont une activité amylolytique .comme il été mentionné dans la littérature ; *Bacille* les espèces produisent une grande variété d'enzymes extracellulaires, telles que les amylases, (Cordeiro CAM, 2003).

Notre travail a été permis d'isoler 06 souches productrices d'amylase .alors que (Xavier et al., 2017) ont trouvé cinq colonies productrices d'amylase et 5 colonies non productrices ont été sélectionnées pour cette étude.

La capacité de production d'amylase a été vérifiée grâce à la formation d'un halo autour des colonies après coloration de la boîte avec une solution d'iode. les colonies ont présenté différents halos de croissance (Xavier et al., 2017b).c'est la même remarque que nous avons trouvée dans notre présente étude ; une formation d'une zone claire autour des colonies; et c'est pareille au (PK et al., 2012) qui ont montrés que la présence d'une zone claire autour de la colonie indiquait la présence d'une activité amylase .

Nos souches ont montrés l'absence de coloration autour de la culture c'est ce qu'il nous a montré (**PK et al., 2012**) que la production d'amylase par *Bacillus sp* a été détecté par la disparition de la couleur bleue dans le milieu gélose à l'amidon autour des colonies microbiennes après incubation.

Nous avons trouvés aussi que ce genre de bactéries ils ont une activité cellulolytique .ceci est confirmé par (**Watzlawick H et al.,2019**) qui ont indiqués que nombreuses enzymes ont été exprimées avec succès dans *B. subtilis* , notamment les amylases, les xylanases, la lichenase, la β -galactosidase , les cellulases (**Lan Thanh Bien T et al.,2014**) , les sérine protéases alcalines (**Wang JP et al.,2006**) et bien d'autres.

Les espèces de *Bacillus* ont été étudiées pour la production hétérologue de protéases à partir d'autres micro-organismes, y compris différentes espèces de *Bacillus*(**Cui et al., 2018**). Aussi les bacilles isolés de *Rhynchocyprislagowskii* sont trois souches produisaient des enzymes lipase , amylase et protéase .Les souches ont également montré une activité hydrolytique (**Elsadek et al., 2023**). Donc cela confirme notre étude qui prouve que *Bacillus sp* produite l'enzyme de protéase

Notre étude a été intéressé par les activités enzymatique de *Bacillus sp* et plusieurs études confirmes ça : parmi les, l'étude qui dit que *Bacillus spp* synthétisent un grand nombre d'enzymes (**Elchinger et al.,2015**) et l'étude de **Frias et al.,(2021)**qui ont trouvé que six des 24 isolats de *Bacillus sp* démontré différents taux d'activité fibrinolytique. Et l'étude qui dit que les micro-organismes du genre *Bacillus* sont considérés comme des bio-usines dotées d'une excellente capacité de production d'enzymes hydrolytiques. (**Schallmey et al., 2004 ; Kiran et al., 2015 ; Dash et al., 2015 ; Ghazala et al., 2016 ; Ma et al., 2016**).

L'activité enzymatique surtout dans les intestines et le sol c'est parmi nos intérêts. Pour cette activité dans les intestines ; En quelques années, le microbiote intestinal a fait l'objet de nombreuses études (**Kaoutari et al., 2014**).

Lescuyer, (2021) a été trouvé que pour bien digérer, notre organisme a besoin d'avoir une activité enzymatique élevée. En plus ; il a dit que une production insuffisante d'enzymes digestives peut entraîner d'autres problèmes de santé .Même il a recensé trois grandes catégories d'enzymes digestives : Les enzymes protéolytiques (protéases) qui transforment les protéines en acides aminés et peptides ; les enzymes glycolytiques (amylase, maltase, saccharase et lactase) qui transforment les glucides en glucose et les enzymes lipolytiques (lipase) qui transforment les lipides en acides gras.

Su et al., (2020)ils ont découvert que *B.subtilis* peut améliorer l'équilibre de la flore intestinale et a le potentiel d'améliorer la santé intestinale et l'efficacité de l'absorption des aliments .Aussi les probiotiques à base de *Bacillus* peuvent effectivement améliorer la santé digestive en renforçant la barrière intestinale et en limitant les réponses inflammatoires et que ces propriétés dépendent de la souche. **(Rhayat et al., 2019)**

Concernant la production des enzymes dans le sol ; **Del Rey, (2023)**a été mentionné que l'activité enzymatique du sol est un mécanisme de plus dans le système complexe des êtres vivants qui habitent le sol.

Les micro-organismes excrètent des enzymes qui restent libres dans le sol et s'associent aux parois cellulaires des racines. **(Gianfreda, 2015)** ou peuvent être absorbés par les complexes argilo-humiques. Ils jouent un rôle fondamental dans l'oxygénation des sols (Au-dessus de la catalase), dans l'oxydation des tissus morts (Enzyme Peroxydase) ou jouant un rôle fondamental dans le mouvement et la biodisponibilité des nutriments dans le sol. Parmi ces derniers, l'azote, par exemple, est régi par la loi sur la qualité de l'air mentionnée ci-dessus. Uréase y Protéase le phosphore avec ce qui précède Phosphatase ou du carbone avec ce qui précède B-glucosidase. **(Del Rey, 2023)**

Sans enzymes, les sols seraient beaucoup plus statiques et la dégradation des tissus et le mouvement des nutriments seraient beaucoup plus lents, car le cycle des particules n'aurait pas d'accélérateur enzymatique **(Balota et Chaves, 2010)**.

Selon Nautiyal,(2001)*Bacillus sp* a une grande capacité à produire des substances antimicrobiennes.

Ce genre de bactérie est capable de synthétiser plus de douzaines d'antibiotiques avec une variété de structures et activités (Stein, 2005).

Dans notre travail, les méthodes utilisées pour étudier le pouvoir antimicrobien sont : l'ensemencement en spot et la culture des bouchons de gélose.

Parmi les autres méthodes utilisées pour détecter l'activité antimicrobienne, la méthode des puits, c'est une méthode de diffusion sur gélose par les puits. A l'aide d'un poinçon stérile et sur un milieu MH inoculé par la suspension de bactérie pathogène, les puits ont été créés et remplis par la suspension ou le surnageant de la bactérie testée. Après l'incubation l'apparition d'une zone claire autour des puits indique la bactérie a un effet antibiotique (Andraw.J.M ,2001).

Ensuite la méthode de double cultures décrite par Knaak et al ; (2007), c'est une technique utilisée pour évaluer le pouvoir antimicrobien de différentes souches bactérienne. La souche à tester et la souche de référence sont inoculées sur une plaque de culture de manière à être en contact ou proche. Après l'incubation, l'observation d'une zone inhibitrice indique une activité antimicrobienne.

La technique des disques stériles de papier Wattman ou la méthode de Kirby-Bauer, ces papiers sont imprégnés avec des quantités précises de la substance bactérienne à tester puis ces disques déposent directement sur un milieu gélose MH inoculé par la bactérie pathogènes. Après 18-24h d'incubation la présence d'une zone claire autour des papiers témoigne la bactérie synthétise des substances antimicrobiennes (Andraw.J.M ,2001).

Nos résultats confirment que les isolats les plus actives étaient : la souche 6' et la souche 7, ces deux souches sont d'origine des intestins des volailles. Ces deux isolats sont capables d'inhiber *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* (MRSA) et *Enterococcus faecium*, et les résultats sont décrits en détails dans le **tableau 5**.

Nos résultats indiquent que le pouvoir antibactérien de la souche 7 d'origine intestinale contre la bactérie *Staph.aureus* (MRSA) est le plus fort potentiel avec une zone d'inhibition de 28 mm de diamètre.

Conclusion et perspectives

Bacillus spp sont couramment utilisées comme espèces probiotiques dans l'industrie de l'alimentation animale (**Larsen et al., 2013**). Ce type des probiotiques ont été largement associés à une amélioration de la santé humaine et animale de différentes manières. (**Ding S. et al., 2021 ; Savitri, 2021**).

Plusieurs genres de *Bacillus sp* sont réputés pour une utilisation comme suppléments probiotiques dans l'alimentation animale en raison de leur capacité à résister aux conditions défavorables lors des processus de fabrication.. Leur stabilité thermique et leur capacité à survivre au faible pH de la barrière gastrique représentent un avantage par rapport aux autres micro-organismes probiotiques (**Mingmongkolchai & Panbangred, 2018**).

Les caractéristiques idéales d'un probiotiques spécifique pour le bétail comprennent l'augmentation de la productivité et de la santé des animaux (**Bajagai et al., 2016**).

Le pouvoir d'autres souches de *Bacillus sp* varie en fonction de leurs utilisations. Par exemple : *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis* ...etc. Cela démontre l'importance d'utilisation des bactéries de genre *Bacillus* dans différents secteurs ; industriels, médicaux et même agricoles.

Dans ce travail, parmi les 25 souches isolées, 12 isolats ont été sélectionnées lors du premier criblage et 08 isolats lors du second criblage. Les tests enzymatiques ont révélé que les souches criblées ont la capacité à produire différents types des enzymes ; 07 pour l'hydrolyse de l'amidon, 05 pour la dégradation de la cellulose, et 07 pour la protéolyse des protéines. Parmi ces derniers, les souches avec les codes 3, 3', 5', et S2 ont montrés une activité enzymatique significative. De plus, les tests antibiotiques ont également montré que ces isolats possèdent une activité antimicrobienne. Les souches avec les codes 6'et 7 ont démontré un effet antibiotique très important parmi les 08 souches qui possèdent une activité antimicrobienne variée.

En perspective, des recherches approfondies doivent être ajoutées à ce travail, tel que :

- ✓ Identification biochimique et moléculaire des espècesde *Bacillus sp* plus approfondies.
- ✓ Identification des enzymes et d'antibiotiques produits par les souches obtenus.
- ✓ Essai in vivo des isolats à activités biologique.

- ✓ Utilisation industrielles de ces espèces et ces activités biologique

Références bibliographiques

- Alexander., (1977). Journal de bactériologie Vol. 132, n° 1. Mutants de l'acide ribonucléique polymérase résistant à la lipiarmycine de *Bacillus subtilis*
- Andrews, J. M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 48(suppl_1), 5-16.
- AneliseBeneduzi., Adriana Ambrosini., Luciane M P Passaglia (2018) Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents
- Arnaud A., Guiraud J. P., (1993). Le métabolisme microbien. Dans Biotechnologie. SCRIBAN R. [éd.], Technique et Documentation- Lavoisier, Londres, New York, Paris, 904 p.
- Bajagai, YS, Klieve, AV, Dart, PJ et Bryden, WL (2016). Les probiotiques en nutrition animale : production, impact et régulation. Rome : FAO.).
- Balota, E. L., & Chaves, J. C. D. (2010). Enzymatic activity and mineralization of carbon and nitrogen in soil cultivated with coffee and green manures. Revista Brasileira de Ciência do Solo, 34, 1573-1583.
- Banerje.Uttam, Chand., RajeshKumar Sani., Wamik Azmi., Raman Son.(i1999). Therm ostable alkaline protease from *Bacillus brevis* and its characterization as a laundry detergent additive
- Bernardeau M., VernouxJP., Gueguen M., Smith DG, Corona-Barrera E., (2009). Antaginic activities of two *Lactobacillus* strains against *Brachyspira*. Vet Microbiol. 138(1-2) ; 184-190.
- Bhattacharyya, P. N., Goswami, M. P., Bhattacharyya, L. H. (2016). Perspective of beneficial microbes in agriculture under changing climatic scenario: a review. *Journal of Phytology*. 8(2), 26-41. Doi: 10.19071/ jp.2016.v8.3022
- *BioRender*. (s. d.). <https://app.biorender.com/user/signin>.
- Blackwood, KS, Turenne, CY, Harmsen, D. et Kabani1, AM (2004) Réévaluation des cibles basées sur la séquence pour l'identification des espèce *Bacille*, *J. Clin. Microbiol.* 42 (4) : 1626-1630.
- Borriss R. (2015). "Towards a new generation of commercial microbial disease control and plant growth promotion products," in *Principles of Plant-Microbe Interactions. Microbes for Sustainable Agriculture*, ed. Lugtenberg B. (Berlin: Springer;), 329–337.

- Bousseboua H. (2002). Eléments de Microbiologie Générale. Programmes de graduation. Editions de l'Université Mentouri. Constantine Algérie p.230-231.
- Cano, R. J., & Borucki, M. K. (1995). Revival and identification of bacterial spores in 25-to 40-million-year-old Dominican amber. *Science*, 268(5213), 1060-1064.
- Chafai, S. 2006. Effet de l'addition de probiotiques dans les régimes alimentaires sur les performances zootechniques du poulet de chair. Mémoire de magister en nutrition. Université Hadj Lakhdar Batna. 97p. Characterization of Probiotics—Advisory Report of the Working Group “8651 Probiotics” of the Belgian Superior Health Council (SHC). 1479–1504.
- Cordeiro CAM, Martinas MLL et Lucaino A. 2003. Production et propriétés de l'alpha amylase à partir de Bacilles espèces. *Braz. J. Microbiol.*, 33:1-3.
- Cortezzo, D. E., & Setlow, P. (2005). Analysis of factors that influence the sensitivity of spores of *Bacillus subtilis* to DNA damaging chemicals. *Journal of applied microbiology*, 98(3), 606- 617.
- Coutinho et Henrissat. (1999). Carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach.
- Cui, W., Han, L., Suo, F., Liu, Z., Zhou, L. et Zhou, Z. (2018). Exploitation de *Bacillus subtilis* en tant que bête de somme robuste pour la production de protéines hétérologues et au-delà. *Monde J. Microbiol. Biotechnologie*. 34 : 145
- Dash BK, Rahman MM and Sarker PK (2015). Molecular identification of a newly isolated *Bacillus subtilis* BI19 and optimization of production conditions for enhanced production of extracellular amylase. *BioMed Res. Int.* 2015: 859805..
- DAVID DUBNAU, (1983). CHAPTER 3 - Molecular Cloning in *Bacillus subtilis*
- Del Rey, I. (2023, août 14). *La actividad enzimática del suelo*.
- Ding, S., Yan, W., Ma, Y., and Fang, J. (2021). The impact of probiotics on gut health via alternation of immune status of monogastric animals. *Anim. Nutr.* 7, 24–30
- Dragana Miljaković., Jelena Marinković., Svetlana Balešević-Tubić. (2020). The Significance of *Bacillus* spp. in Disease Suppression and Growth Promotion of Field and Vegetable Crops
- DROMIGNY Eric. (2008). *Bacillus Cereus*. Lavoisier. 400 PAGES.
- Elchinger, PH, Delattre, C., Faure, S., Roy, O., Badel, S. et Bernardi, T. (2015). Immobilisation de protéases sur chitosane pour le développement de films aux propriétés anti-biofilm. *Int. J. Biol. Macromol.* 72, 1063-1068.

- Elisabeth Härtig, Dieter Jahn, in *Advances in Microbial Physiology*, (2012) *Advances in Bacterial Respiratory Physiology*
- Elsadek, M. M., Wang, S., Wu, Z., Wang, J., Wang, X., Zhang, Y., Yu, M., Guo, Z., Wang, Q., Wang, G., Chen, Y., & Zhang, D. (2023). Characterization of *Bacillus* spp. isolated from the intestines of *Rhynchocypris lagowskii* as a potential probiotic and their effects on fish pathogens. *Microbial Pathogenesis*, *180*, 106163.
- Erickson R. (1976). Industrial applications of the Bacilli: a review and prospectus, in *Microbiology*, ed Schlesinger D. (Washington, DC: American Society for Microbiology;), 406–419.
- Eun-Ah Cho , Eui-Joong Kim , Jae-Gu Pan . (2011). Adsorption immobilization of *Escherichia coli* phytase on probiotic *Bacillus polyfermenticus* spores
- Fernandes AR, et al. (2005) *Saccharomyces cerevisiae* adaptation to weak acids involves the transcription factor Haa1p and Haa1p-regulated genes. *BiochemBiophysRes Commun* *337*(1):95-103
- Franco O. L., Rigden D. J., Melo F. R., Bloch C., Silva J. C. P. et Crossi de Sa M. F.(2000). Activity of wheat amylase inhibitors towards bruchida-amylase and structural explanation of observed specificities. *Eu. J. Biochem.* *267* : 2166-2173
- Frank, B., (1889). *Über die pilzsymbiose der leguminosen.* *Berichte der DeutschenBotanischenGesellschaft* *7* : 332-346
- Frias, J., Toubarro, D., Fraga, A., Botelho, C., Teixeira, J., Pedrosa, J., & Simões, N. (2021). Purification and Characterization of a Thrombolytic Enzyme Produced by a New Strain of *Bacillus subtilis*. *Journal Of Microbiology And Biotechnology*, *31*(2), 327-337.
- Fritze, D. (2004). Taxonomie du genre *Bacille* et genres apparentés : Les bactéries aérobies formant des endospores. *Phytopathologie* *94* : 1245-1248.
- Garveba P., Van Veen L.A. and Van Elsas J.D., (2003). Predominant *Bacillus* spp. In: Agricultural soil under different management regimes via PCR-DGGE. *Microbial Ecology*; *45*:302- 31
- Geert Huys., Nadine Botteldoorn., Frank Delvigne., Luc De Vuyst., Marc
- Ghazala I, Haddar A, Romdhane MB and Ellouz-Chaanouni S (2016). Screening and Molecular Identification of New Microbial Strains for Production of Enzymes of Biotechnological Interest. *Braz. Arch. Biol. Technol.* *59*: e16150152. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2016150152>.

- Gianfreda, L. (2015). "Activité enzymatique du sol."
- Gibson GR and Roberfroid MB 1995. Dietary modulation of the human colonic Microbiota: introducing the concept of prebiotics. *American Institute of Nutrition* 22. 1401-1410.
- Heyndrickx., Bruno Pot., Jean-Jacques Dubois., et Georges Daube. (2013). Microbial
- HidayahAriffin. ,Norhafizah Abdullah., UmiKalsomMd Shah., Yoshihito Shirai.(2006) Production and characterization of cellulase by *Bacillus pumilus* EB3
- Irina.V, Pinchuk, Philippe Bressollier, Bernard Verneuil, Bernard Fenet, Irina B. Sorokulova, Francis Mégraud, Maria C. Urdaci. (2001) In Vitro Anti-*Helicobacter pylori* Activity of the Probiotic Strain *Bacillus subtilis* 3 Is Due to Secretion of Antibiotics
- Janecek S. (1994). Sequence similarities and evolutionary relationships of microbial, plant and animal -amylase. *Eur.J.Biochem.*, 224, p: 519-524. J. E. et Stutzenberger F. J. (1997). Amylolytic activity of *Thermomonosporafusca*. *World J. of Microbiol ET Biotechnol.* 13 (6) : 637-642
- Jean-Pierre FACON, et Isabelle DESFORGES.(2022) . groupe *Bacillus cereus* :microorganismes producteurs de toxines, persistants et nocifs dans l'industrie agroalimentaire
- Joo HS, Kuma CG, Park CG, Paik SR, Chang CS (2003). Oxidant and SDS-stable alkaline protease from *Bacillus clausii*I-52: production and some properties. *J. Appl. Microbiol.* 95: 267-272.
- K.-B. Jeune., J.-C. Côté. (2001). Analyse phylogénétique des sérotypes de *Bacillus thuringiensis* basée sur les polymorphismes de longueur des fragments de restriction du gène de l'ARNr 16S .*Journal of AppliedMicrobiology* , Volume 90, Numéro 1, 1er janvier 2001, Pages 115-122
- KALISZ H.M., 1988. Microbialproteinases. *Advances in Biochemistry and Engineering Biotechnology* 36: 1-65.
- Kaoutari, A. E., Armougom, F., Raoult, D., & Henrissat, B. (2014). Le microbiote intestinal et la digestion des polysaccharides. *MéDecine/Sciences/MS. MéDecine Sciences*, 30(3), 259-265.
- Kiran T, Asad W, Siddiqui S, Ajaz M, et al. (2015). Industrially important hydrolytic enzyme diversity explored in stove ash bacterial isolates. *Pak. J. Pharm. Sci.* 28: 2035-2040.

- Knaak, N., A.A. Rohr and L.M. Fiuza, 2007. In vitro effect of *Bacillus thuringiensis* strains and cry proteins in phytopathogenic fungi of paddy rice-field. *Braz. J. Microbiol.*, 38: 526-530.
- Lan Thanh Bien T, Tsuji S, Tanaka K, Takenaka S, Yoshida K. Sécrétion de cellulases thermostables hétérologues chez *Bacillus subtilis*. *J Gen Appl Microbiol.* 2014 ; 60 : 175-82.
- Larsen, N., Thorsen, L., Kpikpi, E. N., Stuer-Lauridsen, B., Cantor, M. D., Nielsen, B., Brockmann, E., Derkx, P. M. F., & Jespersen, L. (2013). Characterization of *Bacillus* spp. strains for use as probiotic additives in pig feed. *Applied Microbiology And Biotechnology*, 98(3), 1105-1118.
- Lescuyer, L. (2021, 22 novembre). Les enzymes digestives .
- Liu, Y., Lai, Q., Dong, C., Sun, F., Wang, L., Li, G. et Shao, Z. (2013) Diversité phylogénétique de la *Bacillepumilus* groupe et l'écotype marin révélé par analyse de séquence multilocus, *Plos Un8*(11):11.
- Long Liu, Yanfeng Liu, Hyun-dong Shin, Rachel R. Chen, Nam Sun Wang, Jianghua Li, Guocheng Du & Jian Chen (2013). Developing *Bacillus* spp. As a cell factory for production of microbial enzymes and industrially important biochemicals in the context of systems and synthetic biology. volume 97, page 6111-6127.
- Loper, J.E et M.N. Scroth (1986). Influence of bacterial sources on indole-3 acetic acid on root elongation of sugarbeet. *Phytopathology*, 76: 386-389.
- Lu J, Idris U, Harmon B, Hofacre C, Maurer JJ and Lee MD 2003. Diversity and succession of the intestinal bacterial community of the maturing broiler chicken. *Environmental Microbiology* 69. 6816-6824.
- Ma Y, Shen W, Chen X, Liu L, et al. (2016). Significantly enhancing recombinant alkaline amylase production in *Bacillus subtilis* by integration of a novel mutagenesis-screening strategy with systems-level fermentation optimization. *J. Biol. Eng.* 10: 13.
- Mac Millan, J (2002). Occurrence of gibberellins in vascular plants, fungi, and bacteria. *J. Plant GrowthRegul.* 20, 387-442
- Marcus Schallmey, Ajay Singh, and Owen P Ward (2004) *Canadian Journal of Microbiology* Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production
- Milner J.A., Martin D.J. et Smith A. (1997). Two-stage inoculate for the production of alphaamylase by *Bacillus amyloliquefaciens*. *Enzyme and MicrobialTechnology.* (21):382– 386.

- Mingmongkolchai, S., & Panbangred, W. (2018). Bacillusprobiotics : an alternative to antibiotics for livestock production. *Journal Of Applied Microbiology*, 124(6), 1334-1346.
- Mitter, N., AC. Srivastav, AS. Renu, AK. Sarbhoyet DK. Agarwal (2002). Characterization of gibberellins producing strains of *Fusariummoniliforme* based on DNA polymorphism. *Mycopathologia* 153: 187-193.
- Mock, M., and Fouet, A. (2001) Anthrax. *AnnuRevMicrobiol* 55: 647–671. 647–671. Analyse phylogénétique des sérotypes de *Bacillus thuringiensis* basée sur les polymorphismes de longueur des fragments de restriction du gène de l'ARNr 16S
- Monika Wróbel, (2023). Bioremediation of Heavy Metals by the Genus *Bacillus*
- Monika Ehling-Schulz, Didier Lereclus, TheresaM. Koehler (2019). The *Bacillus cereus* Group : *Bacillus* Species with Pathogenic Potential
- N. A. Logan, O. Berge, A. H. Bishop, H.-J. Busse, P. De Vos, D. Fritze, M. Heyndrickx, P. Kämpfer, L. Rabinovitch, M. S. Salkinoja-Salonen, L. Seldin and A. Ventosa.(2009). Proposed minimal standards for describing new taxa of aerobic, endospore-forming bacteria .
- Narula, N., A. Deubel, W. Gans, RK.Behlet W. Merbach (2006). Paranodules and colonization of wheat roots by phytohormone producing bacteria in soil. *Plant Soil Environ.*, 52: 119–129
- Nautiyal, C.S. (2001). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 170(1), 265-270.
- Nautiyal, CS et Mehta, S. (2001) Une méthode efficace pour le dépistage qualitatif des bactéries solubilisant les phosphates. *Microbiologie*, 43, 51-56.
- Neyra,C.A, and L. Sadasivan. (1996). US Patent Application Serial No. 08/268,922. Notice of allowance awaded. “*Bacillus licheniformis* producing antifungal agent and uses thereof for control of phytopathogenic fungi”
- Niehaus F., Bertoldo C., Kahler M. etAntranikian G. (1999). Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. *Applied Microbiology and Biotechnology*. (50),pp.711-729.
- Nieto K F et W T. Frankenberger (1989). Biosynthesis of cytokinins in soil. *Sci. Soc. Am. J.* 53(3): 735-740

- Noura Raddadi, Ameur Cherif., Daniele Daffonchio., Mohamed Neifar., Fabio Fava .(2015) Biotechnological applications of extremophiles, extremozymes and extremolytes
- P Kumar, RC Dubey, DK Maheshwari (2012). Microbiological research, Bacillus strains isolated from rhizosphere showed plant growth promoting and antagonistic activity against phytopathogens).
- P.S Vary. (1994). Prime time for Bacillus megaterium
- Paul Vos., George Garrity., Dorothy Jones., Noel R. Krieg., Wolfgang Ludwig., Fred A. Rainey., Karl-Heinz Schleifer., William B. Whitman. (2011). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes. 2^e édition. Volume 3. Springer Science & Business Media.
- PK, S., Uma, C., & P, S. (2012). Amylase Production by Bacillus sp. Using Cassava as Substrate. *ResearchGate*. https://www.researchgate.net/publication/320739098_Amylase_Production_by_Bacillus_sp_Using_Cassava_as_Substrate.
- Rao, MB et VV Deshpande. (1998) Protéases et leurs applications en biotechnologie. Dans A. Varna (éd.), *Microbes : pour la santé, la richesse et un environnement durable*, sous presse. Maison d'édition Malhotra, New Delhi, Inde.
- Rhayat, L., Maresca, M., Nicoletti, C., Perrier, J., Brinch, K. S., Christian, S., Devillard, E., & Eckhardt, E. (2019). Effect of Bacillus subtilis Strains on Intestinal Barrier Function and Inflammatory Response. *Frontiers In Immunology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00564>.
- Rocheli de Souza., Adriana Ambrosini., Luciane M P Passaglia .(2015) Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils
- Ryu, R. et C.L. Patten (2008). Aromatic amino acid-dependent expression of indole-3-pyruvate decarboxylase is regulated by 4TyrR in Enterobacter cloacae UW5. *Am. Soc. Microbiol.*, 19: 1-35.
- Sastry K., Mathure B., (1979). Studies on milk clotting enzyme from Bacillus megaterium K4. 1. Effect of some nutrients on enzyme production. *J. of food Sci. and techno.* 16. 1., 11-15.
- Savitri, L. P. (2021). "Probiotics for human health," in *Advances in Probiotics for Sustainable Food and Medicine. Microorganisms for Sustainability*, Vol. 21, eds G. Goel and A. Kumar (Berlin: Springer), 181–212. doi: 10.1007/978-981-15-6795-7_8).
- Schallmeyer M, Singh A and Ward OP (2004). Developments in the use of Bacillus species for industrial production. *Can. J. Microbiol.* 50: 1-17.

- Schreck, S. D., & Grunden, A. M. (2014). Biotechnological applications of halophilic 490 lipases and thioesterases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1011-1021
- Setlow, P. (2006). Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *Journal of applied microbiology*, 101(3), 514-525.
- Simon C Andrews., Andrea K Robinson., Francisco Rodríguez-Quñones. (2003) Bacterial iron homeostasis
- Simon O., (2005). Micro-organisms as Feed Additives – Probiotics. *Advances in Pork Production Volume 16*, p161
- Sneath, P.H., Mair, N.S., Sharpe, M.E. and Holt, J.G. (1986) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams & Wilkins, Baltimore, MD.
- Stanley Falkow., Eugene Rosenberg., Karl-Heinz Schleifer., Erko Stackebrandt. (2006). *The Prokaryotes: Vol. 4: Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria*. Illustrée edn. Volume 4. Springer Science & Business Media.
- Stein, AC., M. Sortino, C. Avancini, S. Zacchino et G. von Poser (2005). Ethnoveterinary medicine in the search of antimicrobial agents: Antifungal activity of *Pterocaulon* (Asteraceae). *J. Ethnopharmacol.*, 99: 211-214
- Stein, T. (2005). *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular microbiology*, 56(4), 845-857.
- Su, Y., Liu, C., Fang, H., & Zhang, D. (2020). *Bacillus subtilis* a universal cell factory for industry, agriculture, biomaterials and medicine. *Microbial Cell Factories*, 19(1).
- Sukanta K. Nayak, (2020) Multifaceted applications of probiotic *Bacillus* species in aquaculture with special reference to *Bacillus subtilis*.
- UK Standards for Microbiology Investigations. (2015). Identification of *Bacillus* Species..
- Wang JP, Yeh CM, Tsai YC. Production améliorée de subtilisine YaB chez *Bacillus subtilis* à l'aide de séquences de contrôle d'expression synthétiques modifiées. *J Agric Food Chem*. 2006 ;54 : 9405-10.
- Watzlawick H, Altenbuchner J. Intégration multiple du gène *ganA* dans le chromosome de *Bacillus subtilis* pour une production améliorée de bêta-galactosidase à l'aide du système CRISPR/Cas9. *AMB Express*. 2019;9:158.
- Whipps, JM. (2001). Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.* 52:487– 511.

- Wu L., Wu H.-J., Qiao J., Gao X., Borriss R. (2015). Novel routes for improving biocontrol activity of *Bacillus* based bioinoculants. *Front. Microbiol.* 2015;6:1395..
- Xavier, A. R. E. O., Lima, E. R., Oliveira, A. M. E., Cardoso, L., Santos, J., Cangussu, C. H. C., Leite, L. N., Quirino, M. C. L., Júnior, I. G. C., Oliveira, D. A., & Xavier, M. A. S. (2017b). Research Article Genetic diversity of *Bacillus* sp producers of amylase isolated from the soil. *Genetics And Molecular Research*, 16(3).
- Yang, H.C.; Fu, H.L.; Lin, Y.F.; Rosen, B.P.(2012) Pathways of arsenic uptake and efflux. *Curr. Top. Membr.* 2012, 69, 325–358.
- Yuan Su, Chuan Liu, Huan Fang & Dawei Zhang (2020) *Microbial Cell Factories* volume 19, Article number: 173 (2020). *Bacillus subtilis*: a universal cell factory for industry, agriculture, biomaterials and

Annexe 01 : Préparation des milieux de cultures utilisés

Gélose LB(Luria-Bertani)

- Tryptone.....10g
- NACL..... 10g
- Extrait de levure5g
- Agar20g
- Eau distillé1000ml
- Ph=6.8
- Agitation sur plaque chauffant à l'aide d'un barreau magnétique.
- Stérilisation à l'autoclave.

Bouillon LB(Luria-Bertani)

- Tryptone.....10g
- NACL10g
- Extrait de levure5g
- Eau distillé1000ml
- Ph=6.8
- Agitation sur plaque chauffant à l'aide d'un barreau magnétique.
- Stérilisation à l'autoclave.

Gélose à amidon

- Tryptone.....2.5g
- NACL 2.5g
- Extrait de levure1.25g
- Agar..... 5 g
- Eau distillé 250 ml
- Amidon..... 0.25 g
- Ph=6.8
- Agitation sur plaque chauffant à l'aide d'un barreau magnétique.
- Stérilisation à l'autoclave.

Gélose à cellulose

- Tryptone..... 2.5 g
- NACL2.5 g
- Extrait de levure..... 1.25 g
- Agar 5 g
- Eau distillé250 ml
- cellulose0.25 g
- Ph=6.8
- Agitation sur plaque chauffant à l'aide d'un barreau magnétique.
- Stérilisation à l'autoclave.

Gélose au lait

- Gélose LB 100 ml
- Lait UHT écrémé stérilisé.....5 ml
- Ph=6.8

MH (Mueller-Hinton)

- Agar 38 g
- Eau distillé 1000 ml
- Ph=6.8
- Agitation sur plaque chauffant à l'aide d'un barreau magnétique.
- Stérilisation à l'autoclave.

Annexe 02

Tableau 1 : Codification de toutes les souches isolées (les 25 souches)

Intestines				sol		
E1		E2	E3	Sa	Sb	Sc
E146 SM	E137 SM	E2 SM	E3 SM	Sa SM	Sb SM	Sc SM
E146 10 ⁻¹	E137 10 ⁻¹	E2 10 ⁻¹	E3 10 ⁻¹	Sa 10 ⁻¹	Sb 10 ⁻¹	Sc 10 ⁻¹
E146 10 ⁻²	E137 10 ⁻²	E2 10 ⁻²	E3 10 ⁻²	Sa 10 ⁻²	Sb 10 ⁻²	Sc 10 ⁻²
E146 10 ⁻³	E137 10 ⁻³	E2 10 ⁻³	E3 10 ⁻³	/	/	/

Clé :E1- E2-E3 :échantillon d'intestines numéro = 1-2-3.

Sa-Sb-Sc : échantillon du sol de zone a-b-c.

46 - 37 : âge d'intestines des volailles (par jours).

SM -10⁻¹-10⁻²-10⁻³ : série de dilution à partir de solution mère.

Tableau 2 : Codification de toutes les souches criblées

Les souches obtenues à partir du 1 ^{er} criblage	les souches obtenues à partir du 2 ^{eme} criblage
1' : E1 SM 46 2	3 :E1 SM 37 13
6' : E2 SM 6	3' :E1 SM 37 13
3 :E1 SM 37 13	6 : E2 SM 6
3' :E1 SM 37 13	7 :E2 10 ⁻³ 5
5' :E1 10 ⁻³ 46 4	6' : E2 SM 6
6 : E2 SM 6	5' :E1 10 ⁻³ 46 4
7 :E2 10 ⁻³ 5	8 :E3 10 ⁻¹ 3
8 :E3 10 ⁻¹ 3	S2 :B 10 ⁻²
S2 :B 10 ⁻²	
S4 :C 10 ⁻²	
S5 :B 10 ⁻¹	
S6 :C 10 ⁻²	

Clé : Numéro de colonie.

Annexe 03 : Méthode de Coloration


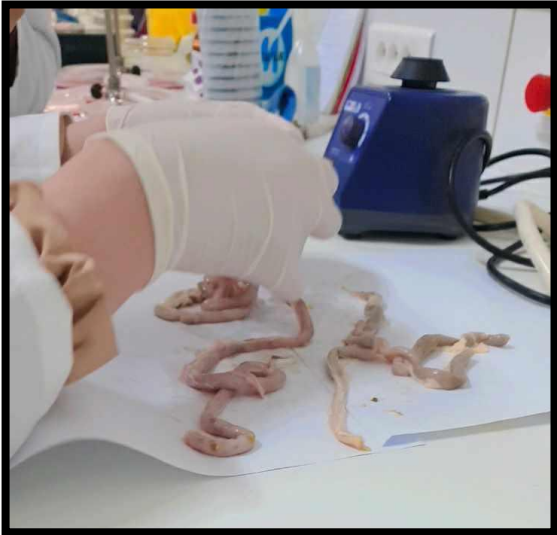


La technique de coloration au bleu de méthylène est une méthode couramment utilisée en microbiologie pour mettre en évidence certaines structures cellulaires. Selon ce fonctionnement :

- **Préparation de l'échantillon** : Une échantillon contenant les bactéries à observer est prélevé et déposé sur une lame de microscope qui contient l'eau distillée. Après séchage à bec benzène pour fixer les cellules, on passe à la suite.
- **Coloration** : Une goutte de la solution colorante (bleu de méthyle) est appliquée sur la lame contenant l'échantillon pendant 1 minute. Ensuite, un lavage et un séchage sont effectués pour la fixation. Le bleu de méthyle pénètre dans les cellules bactériennes et se lie aux structures ciblées.
- **Observation au microscope** : En observant sous le microscope ($\times 100$), les structures colorées en bleu de méthyle sont clairement repérées ce qui facilite leur visualisation et leur étude ; apparaissant sous forme de bâtonnets allongés et sporulé.

Cette méthode est très répandue dans le domaine de microbiologie afin d'analyser les bactéries grâce à sa capacité à offrir une visualisation nette et précise.

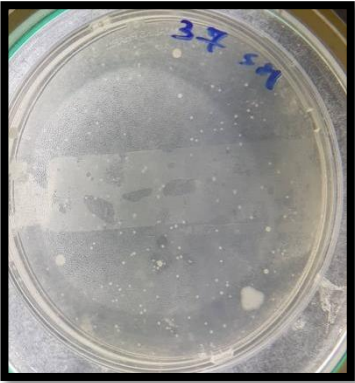
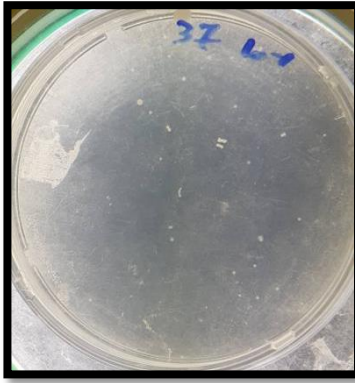

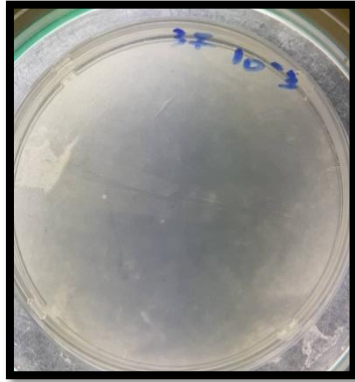
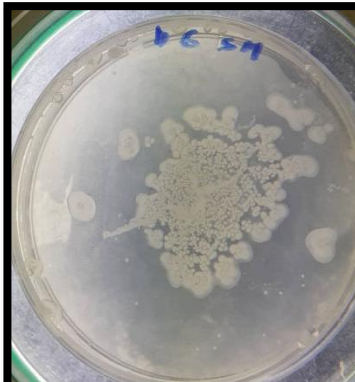
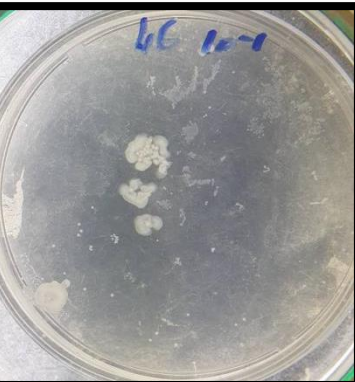
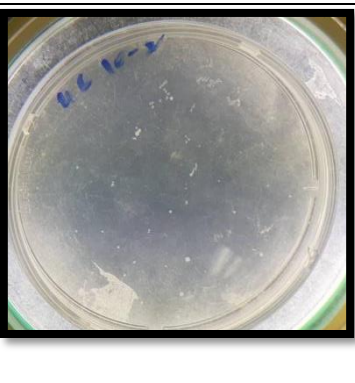
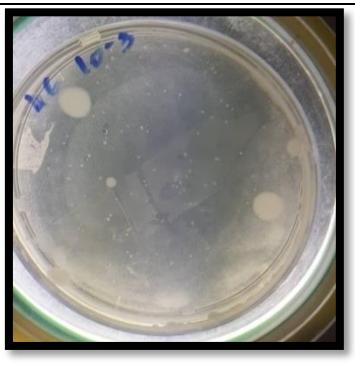
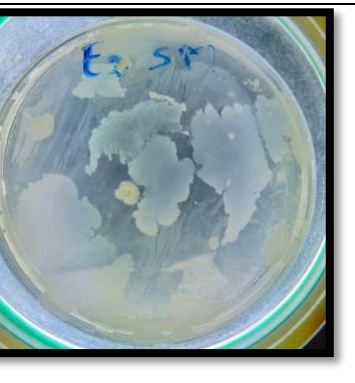
Annexe 04

Tableau 3 : Prélèvement et ensemencement des échantillons des intestins et du sol.

	
<p>Echantillon des intestins</p>	<p>Prélèvement des mucus</p>
	
<p>Pesée 1g de sol</p>	<p>Ensemencement sur milieu LB.</p>

Annexe 05

Tableau 4 : Quelques aspects des colonies isolées à partir des échantillons des intestins sur LB.

		
E1 37 SM	E1 37 10 ⁻¹	E1 37 10 ⁻²
		
E1 37 10 ⁻³	E1 46 SM	E1 46 10 ⁻¹
		
E1 46 10 ⁻²	E1 46 10 ⁻³	E2 SM

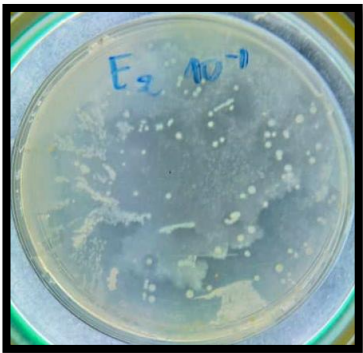
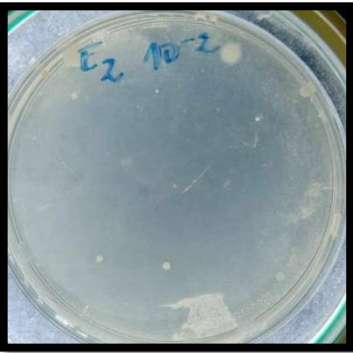
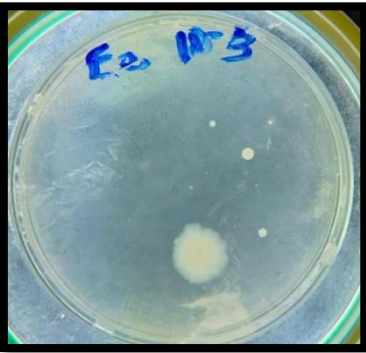

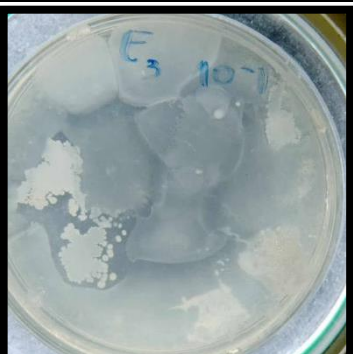


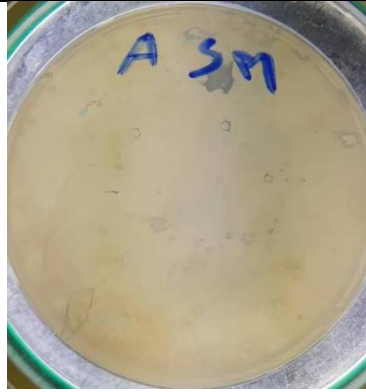
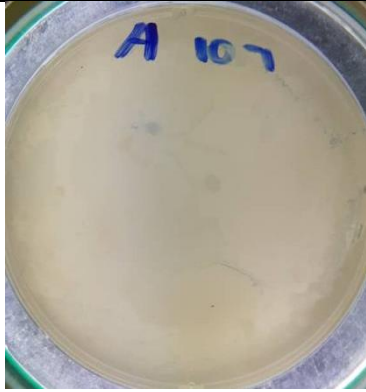



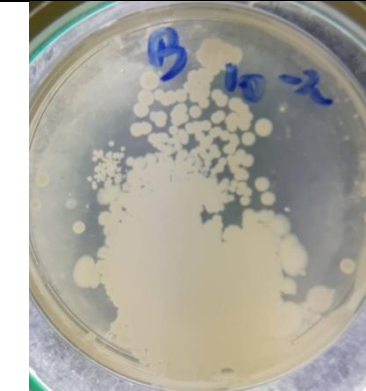
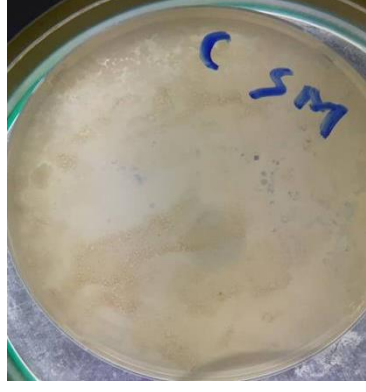
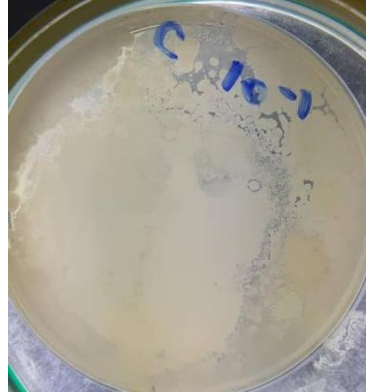
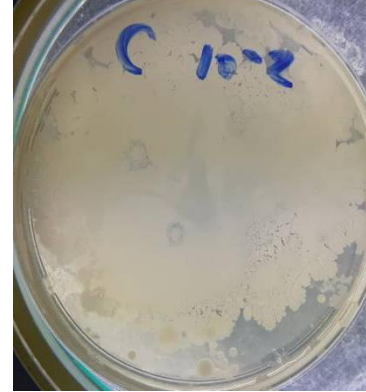

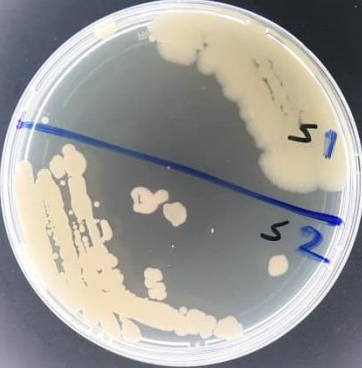

		
E2 10 ⁻¹	E2 10 ⁻²	E2 10 ⁻³
		
E3 SM	E3 10 ⁻¹	E3 10 ⁻²
		
E3 10 ⁻³		

Tableau 5 : Quelques aspects des colonies isolées à partir des échantillons du sol sur LB.

		
A SM	A 10 ⁻¹	A 10 ⁻²
		
B SM	B 10 ⁻¹	B 10 ⁻²
		
C SM	C 10 ⁻¹	C 10 ⁻²

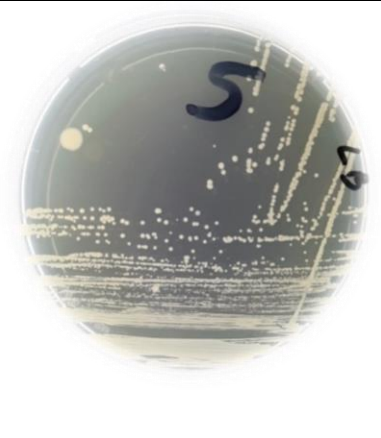

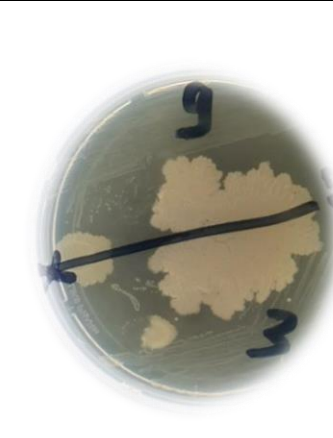
Annexe 06

Tableau 6 : Résultat de purifications des échantillons du sol.

		
<p>La souche 4</p>	<p>Les souches 1 et 2</p>	<p>Les souches 5 et 6</p>

Annexe 07

Tableau 7 : Résultats d'ensemencement des souches pathogènes sur LB.

		
<p><i>Acinetobacter baumannii</i></p>	<p><i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)</p>	<p>3 : <i>Enterococcus faecalis</i> 9 : <i>Enterococcus faecium</i></p>

Annexe 08

Tableau 8 : Résultat d'étude de l'activité antimicrobienne de quelques souches par la méthode d'ensemencement en spot.




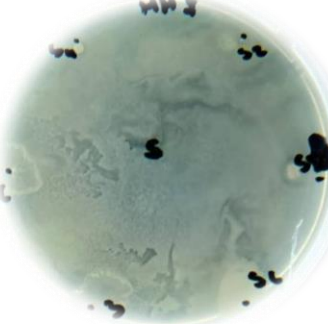
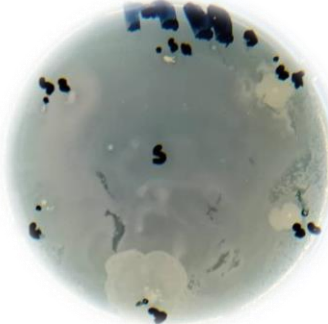

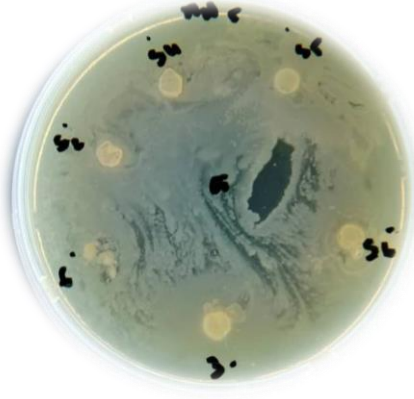


		
<p>le pouvoir antimicrobien contre <i>Enterococcus faecalis</i></p>	<p>le pouvoir antimicrobien <i>Acinetobacter baumannii</i></p>	<p>le pouvoir antimicrobien contre <i>Enterococcus faecium</i></p>
		
<p>le pouvoir antimicrobien contre <i>Staph. aureus</i></p>	<p>le pouvoir antimicrobien contre <i>Enterococcus faecium</i></p>	

Tableau 9 : Résultat d'étude de l'activité antimicrobienne de quelques souches par la culture des bouchons de gélose.

	
<p>le pouvoir antimicrobien de quelques isolats contre <i>Enterococcus faecalis</i>.</p>	<p>le pouvoir antimicrobien de quelques isolats contre <i>Acinetobacter baumannii</i>.</p>
	
<p>le pouvoir antimicrobien de quelques isolats contre <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA).</p>	<p>le pouvoir antimicrobien de quelques isolats contre <i>Enterococcus faecium</i>.</p>