



Influence des substrats carbonés et minéraux sur l'activité des substances BLIS (Bacteriocin-Like Inhibitory Substances) produites par des souches de *Bacillus* isolées à partir d'aliments fermentés au Burkina Faso

Hama CISSE, Aly SAVADOGO, Essodolom TAALE, François TAPSOBA, Flibert GUIRA, Cheikna ZONGO, Yves TRAORE

Laboratoire de Biochimie et Immunologie Appliquée (LaBIA). UFR/SVT, Université Ouaga I Pr Joseph KI-ZERBO, 03 BP 7021 Ouagadougou 03, Burkina Faso.

Corresponding author: Savadogo Aly, e-mail: alysavadogo@gmail.com

Original submitted in on 10th September 2016. Published online at www.m.elewa.org on 31st October 2016
<http://dx.doi.org/10.4314/jab.v106i1.3>

RESUME

Objectif : La présente étude a porté sur les souches de *Bacillus* productrices de substances inhibitrices (BLIS) isolées à partir d'échantillons de *Soumbala*, *Bikalga*, *Attiéké* et *Maari* au Burkina Faso.

Méthodologie et résultats : La diffusion sur gélose a été utilisée pour détecter la production de BLIS. L'influence des substrats (carbonés, minéraux) sur la production de BLIS et leur thermostabilité ont été étudiées. Les tests morphologiques et biochimiques montrent que les souches appartiennent au genre *Bacillus*. Parmi les souches isolées, 11 produisent des BLIS avec des inhibitions variant de $07,90 \pm 0,14$ mm (AB₆) à $16,50 \pm 0,71$ mm (AB₇) à l'encontre de *Micrococcus luteus*. La souche et la concentration en substrat influencent significativement cette production ($p < 0,0001$). Les BLIS étudiées ont été stables aux traitements thermiques variant de 50°C à 100 °C pendant 30 min.

Conclusion et application : Ces BLIS produites pourraient donc être des bactériocines et pourraient contribuer à une meilleure conservation des aliments.

Mots clés : Aliments fermentés, *Bacillus*, substances inhibitrices, diamètre d'inhibition, *Micrococcus luteus*.

Influence of carbon and inorganic substrates on the activity of BLIS (bacteriocin-Like Inhibitory Substances) produced by *Bacillus* strains isolated from fermented foods in Burkina Faso

ABSTRACT

Objective: This study focused on production of inhibitory substances (BLIS) by *Bacillus* strains isolated from fermented foods (*Soumbala*, *Bikalga*, *Attieke* and *Maari*) in Burkina Faso.

Methods and results: The agar diffusion method through the well was used to detect the BLIS production. The influence of the substrates (carbon, minerals) on production BLIS and their thermostability were studied. The morphological and biochemical tests studied strains showed that these strains belong to the *Bacillus* genus. Eleven strains have revealed producing BLIS with the inhibition from 16.50 ± 0.71 mm for the AB₇ strain to

07.90 ± 0.14 mm for the strain AB₆. The strain and the substrate concentration significantly influence this production ($p < 0.0001$). BLIS were stable to heat treatment ranging from 50 °C to 100 °C for 30 min.

Conclusion and application of findings: These inhibitory substances produced, could be bacteriocins and could contribute to a better food preservation.

Key words: Fermented food, *Bacillus*, inhibitory substance, inhibition diameter, *Micrococcus luteus*.

INTRODUCTION

Depuis des millénaires, certaines bactéries ou leurs métabolites étaient utilisés de façon empirique par de nombreuses populations pour conserver des aliments à travers leurs fermentations (Taalé *et al.*, 2016). La conservation des aliments constitue un problème majeur, surtout dans le secteur alimentaire à cause des problèmes d'ordre microbiologique. Les moyens de lutte employés contre ces agents pathogènes se limitaient les années écoulées aux additifs chimiques tels que le sel, les nitrates et les sorbates. Cependant, des nouvelles tendances du marché montrent une réticence des consommateurs pour les additifs chimiques en raison de leur possible action carcinogène, tératogène et allergogène et d'une forte toxicité résiduelle (Boumediene, 2013). C'est dans cette démarche que des investigations se sont orientées vers l'utilisation des peptides antibactériens pour réduire de façon considérable la présence de germes indésirables et nuisibles, sans modifier les propriétés organoleptiques du produit (Landman and Quévrain, 2016; Verma *et al.*, 2014). En effet, les bactéries peuvent produire des substances antimicrobiennes telles que des acides organiques, de l'acide lactique, des peroxydes d'hydrogène, du CO₂ et des bactériocines durant la fermentation des aliments. Ces métabolites permettent à ces bactéries de survivre dans le milieu en inhibant la croissance des autres germes. Parmi ces métabolites, les bactériocines sont les plus étudiées et les plus connues. D'après Klaenhammer (1988), les bactériocines sont des protéines ou complexes de protéines produites par des bactéries par voie ribosomale, douées d'une activité bactéricide ou bactériostatique contre des souches phylogénétiquement proches de la souche productrice. Les bactériocines sont produites par les bactéries à Gram positif, des bactéries à Gram négatif et des Archaea bactéries (Verma *et al.*, 2014). Les bactériocines pourraient être des bioconservateurs alimentaires intéressants à

l'échelle industrielle du fait de leur thermostabilité, de leur spectre d'activité relativement étroit ou large, l'absence de toxicité pour les cellules eucaryotes et la perte d'activité en présence des protéases présentes dans le tube digestif. En plus de l'effet protecteur de ces molécules, la découverte des bactériocines donne un élan pour le développement des aliments de meilleures qualités (Anas, 2013). Durant la dernière décennie, de nombreux travaux se sont intéressés aux bactériocines produites par des *Bacillus*, en raison de leur potentiel utilisation dans le secteur alimentaire et sanitaire (Kivanç *et al.*, 2014). Par ailleurs, le champ des investigations s'est largement concentré sur ces bactériocines, en raison de leur intégration dans les produits à usage quotidien comme les pâtes dentifrices (le rince-bouche BLIS K12) et dans les applications thérapeutiques potentielles en inhibant des souches résistantes comme les MRSA (*Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus*) (Anas *et al.*, 2012 ; Kivanç *et al.*, 2014, Pierre *et al.*, 2015). Au Burkina Faso, des études ont confirmé que des espèces de *Bacillus* isolées du *Soumbala* ont un large potentiel de production de substances à activités antimicrobiennes permettant la bonne conservation du *Soumbala* (Compaoré *et al.*, 2013 ; Savadogo *et al.*, 2011; Taalé, 2016). Le *Bikalga*, le *Maari* et le *Soumbala* sont des condiments obtenus par fermentation naturelle et alcaline respectivement des graines du néré (*Parkia biglobosa*) ou du Soja, des graines de roselle (*Hibiscus sabdariffa*) et des graines de baobab (*Adansonia digitata* L). Ces condiments sont bien connus dans plusieurs pays d'Afrique de l'Ouest et de l'Afrique Centrale. L'*Attiéké* est le résultat d'un long processus de transformations physiques et biologiques du manioc (*Manihot esculenta* Grantz) et typique à la Côte d'Ivoire. Cependant, très peu de données sont disponibles sur l'influence de certains paramètres sur la production et l'activité de ces substances

inhibitrices produites. C'est fort de ce constat que cette étude vise à étudier l'influence du glucose, de l'extrait de levure et des ions (Ca²⁺, Mn²⁺, Mg²⁺) sur la production de substances inhibitrices et la

thermostabilité des substances produites afin d'apporter de nouvelles données dans la recherche d'alternatives aux additifs chimiques.

MATERIEL ET METHODES

Matériel Biologique : L'étude a porté sur cinquante (50) souches bactériennes isolées à partir des aliments fermentés collectés auprès des revendeuses de la ville

de Ouagadougou. *Micrococcus luteus* LMG3293 a été utilisée comme souche indicatrice. La répartition et les codes de souches est faite dans le Tableau 1.

Tableau 1: Origine et code des souches bactériennes sélectionnées et étudiées

Origine	Code des souches bactériennes	Nombre
Soumbala de néré	SY ₁ , SY ₂ , SY ₃ , SY ₄ , SY ₅ , SY ₆ , SY ₇ , SY ₈ , SY ₉ , SY ₁₀ , SY ₁₁ , SY ₁₂ , SY ₁₃ , SY ₁₄ , SY ₁₅	15
Soumbala de soja	SS ₁ , SS ₂ , SS ₃ , SS ₄ , SS ₅ , SS ₆	06
Bikalga	BB ₁ , BB ₂ , BB ₃ , BB ₄ , BB ₅ , BB ₆ , BB ₇ , BB ₈ , BB ₉ , BB ₁₀ , BB ₁₁ , BB ₁₂	12
Maari	MB ₁ , MB ₂ , MB ₃ , MB ₄ , MB ₅ , MB ₆ , MB ₇ , MB ₈ , MB ₉	09
Attiéké	AB ₁ , AB ₂ , AB ₃ , AB ₄ , AB ₅ , AB ₆ , AB ₇ , AB ₈	08
		Total :
50		

Isolement des souches : 10 g de chaque aliment ont été pesé aseptiquement et placé dans 90 ml d'eau physiologique constituant la solution mère et des dilutions en cascades ont été réalisées jusqu'à 10⁻⁸. Le milieu PCA a servi de milieu d'isolement et l'ensemencement a été effectué par étalement. Les boîtes ont été incubées à 37 °C pendant 24 heures. Des colonies bien isolées ont été sélectionnées. Les souches ont été purifiées suites à trois repiquages successifs dans chacun des milieux (Trypticase Soja Broth et Trypticase Soja Agar). Les souches ont été conservées dans du bouillon cœur-cervelle supplément de glycérol à 15% et conservées à +4 °C après une incubation de 24 heures à 37 °C.

Caractérisation biochimique, physiologique et essais taxonomique : L'examen microscopique (la forme, le mode de regroupement et la mobilité des cellules), la coloration de Gram, le test de catalase (Leyral and Vierling, 2007), d'oxydase (Joffin and Leyral, 2006) et de sporulation (Carr et al., 2002) ont été réalisés. Le métabolisme de l'urée, du citrate, la production d'indole, d'acétoïne, de gaz, du H₂S et l'affiliation des souches aux genres *Bacillus* ont été réalisés selon la méthode du Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.

Mise en évidence de l'activité antimicrobienne substances produites par les souches de *Bacillus* : La méthode de diffusion sur gélose par les puits (Tagg and Mc Given, 1971) a été utilisée pour détecter les souches présentant une activité antibactérienne à

l'encontre de *Micrococcus luteus* LMG3293. Chaque souche a été cultivée dans du bouillon nutritif à 37 °C pendant 24 heures. Les cultures bactériennes ont été centrifugées à 6000 rpm pendant 15 minutes à 4 °C. Les surnageants ont été recueillis et leur pH ajusté à 6,5 avec du NaOH 1N ou HCl 1 N en utilisant le pH-mètre de type WTW 340. Une culture de *Micrococcus luteus* a été ensemencée par inondation sur des boîtes de Pétri contenant de la gélose nutritive. Quatre (04) puits de diamètre 6 mm ont été réalisés sur chaque boîte de Pétri à l'aide de pipettes pasteur stérilisées. Chaque puits a été rempli de 50 µl du surnageant de la culture bactérienne. Le puits témoin a été rempli avec 50 µl de glycérol stérile (cryo-conservateur). Les boîtes ont été laissées pendant 1 heure à la température ambiante pour permettre la diffusion du surnageant puis incubées à 37 °C pendant 16 heures à 24 heures. Les diamètres d'inhibitions matérialisés par l'apparition d'halo claire autour de chaque puits ont été mesurés. Puis la moyenne a été faite (moyenne de deux diamètres perpendiculaires). Seules les souches dont les substances inhibitrices ont présenté un diamètre d'inhibition supérieure ou égale à 1 mm (Diamètre d'inhibition=Diamètre d'inhibition totale-Diamètre du puits) et formant des spores ont été retenues pour la suite de l'étude.

Etude de l'influence des substrats sur la production de substances inhibitrices : Dans cette partie le pH du bouillon a été ajusté à 6,8 et les tubes incubés à 37 °C.

Un volume de 10 µl de suspension bactérienne a été utilisé comme inoculum pour 10 ml de chaque culture bactérienne. Le bouillon nutritif a été supplémenté en glucose ou en extrait de levure à différentes concentrations 1%, 2%, 3%, 4%, 5% (m/v) et des ions (Ca^{2+} , Mn^{2+} et le Mg^{2+}) aux concentrations (0,2 ; 0,4 ; 0,6 ; 0,8 ; 1 g/L). Pour un milieu de concentration 1% en glucose (ou extrait de levure), 1 g de glucose a été dissout dans 100 mL. Pour un milieu de concentration 1 g/L en ion, 1 g de l'ion correspondant a été placé dans

1000 mL. La production de substances inhibitrices a été suivie pendant 96 heures.

Thermostabilité des surnageants : Les surnageants des souches retenues ont été traités à différentes températures (50 °C, 80 °C et 100 °C) pendant 30 min pour examiner la stabilité thermique des substances inhibitrices produites.

Analyse des données : Le logiciel d'analyse statistique XLSTAT 7.5.2 a été utilisé pour l'analyse de la variance (ANOVA) en utilisant le test de Fisher LSD au seuil de probabilité $p = 5\%$.

RESULTATS ET DISCUSSION

Caractères morphologiques et biochimiques des souches isolées

Aspect macroscopique : Les figures 1a et 1b montrent respectivement l'observation macroscopique de la

souche SY₈ issue du *Soumbala* de néré et BB₁₂ du *Bikalga*.

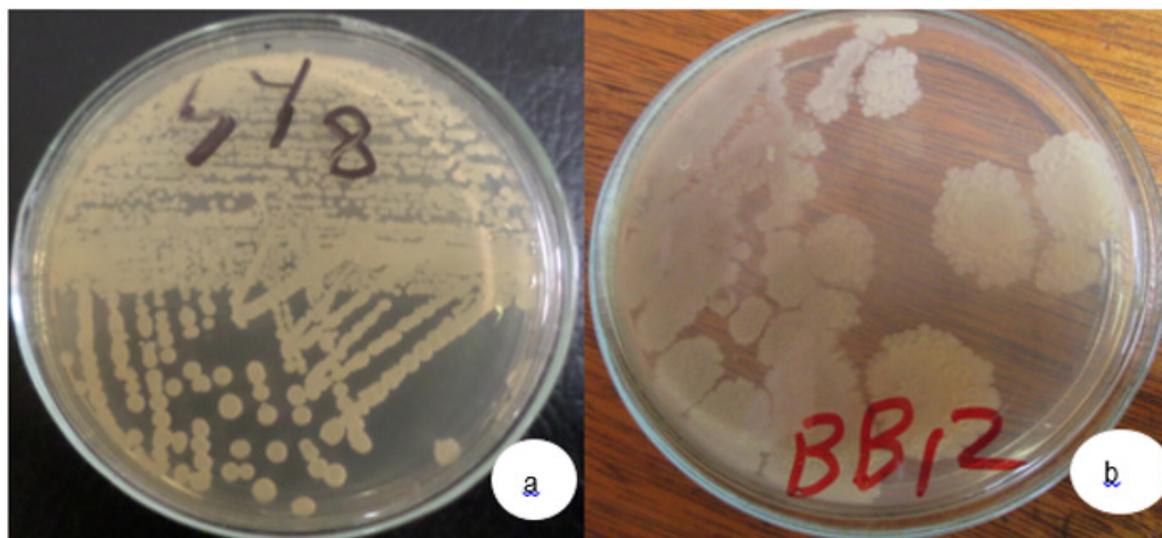


Figure 1 : Observation macroscopique des souches SY₈ (a) et BB₁₂ (b) sur milieu gélosé isolées respectivement du *Soumbala* de néré et du *Bikalga*

L'observation macroscopique a permis de distinguer des colonies rondes à bords variables (réguliers et irréguliers) plates ou bombées, de couleur blanchâtre ou beige avec un aspect opaque. La taille de ces colonies varie entre 0,5 mm à 6 mm de diamètre.

Aspect microscopique : Toutes les souches sont des bacilles dont les cellules se regroupent en chaînettes. Elles sont toutes mobiles et à Gram positives.

Caractéristiques métaboliques des différentes souches : Le Tableau 2 présente les caractéristiques métaboliques des différentes souches de *Bacillus* isolées et leur affiliation.

Tableau 2 : Caractéristiques morphologiques et biochimiques des souches sélectionnées et étudiées

Caractères	Souches				
	SY ₇ , SY ₈	SY ₅ , SY ₁₁ , SY ₁₂ , BB ₈	SY ₂ , SY ₃ , SY ₆ , SY ₉ , MB ₂ , MB ₃ , MB ₄ , MB ₈ , MB ₉ , BB ₂ , BB ₃ , BB ₄ , BB ₅ , BB ₆ , BB ₇ , AB ₁ , AB ₅ , AB ₆ , AB ₈	SY ₁ , SY ₁₀ , SY ₁₄ , SY ₁₅ , MB ₁ , MB ₆ , MB ₇ , BB ₁ , BB ₁₀ , BB ₁₁ , BB ₁₂ , AB ₂ , AB ₃ , AB ₄ , AB ₇ , SS ₁ , SS ₂ , SS ₃ , SS ₅ , SS ₆	SY ₄ , SY ₁₃ , MB ₅ , BB ₉ , SS ₄
Gram	+	+	+	+	+
Forme	Bacille	Bacille	Bacille	Bacille	Bacille
Mobilité	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+
Oxydase	-	-	-	-	-
Spore	+	+	+	+	+
Citrate	+	-	-	-	-
Urée	-	-	-	+	+ (3), - (2)
Gaz	-	-	-	-	-
H ₂ S	-	-	-	-	+
Indole	-	-	-	-	-
VP	+	-	+	+(15), - (5)	+
Présomption d'indentification	<i>B. subtilis</i>	<i>B. circulans</i>	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>B. sp</i>
Nombre d'espèces	2 (4%)	4 (8%)	19 (38%)	20 (40%)	5 (10%)

+ (15) : nombre de à *B. cereus* VP+ ; - (5) : nombre de à *B. cereus* VP-
 (2) : nombre de *Bacillus* sp. à Urée -

+ (3) : nombre de *Bacillus* sp. à Urée + ; -

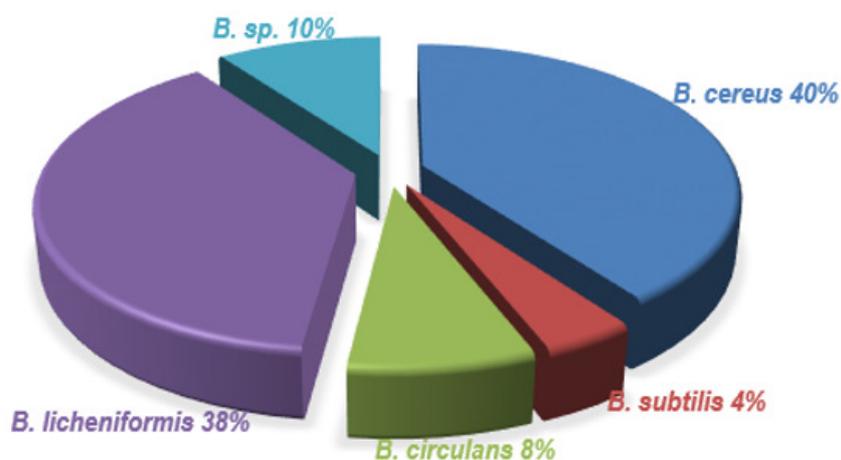


Figure 2 : Fréquence d'apparition des différentes souches identifiées

La figure 2 représente la fréquence d'apparition des différentes souches identifiées. Les résultats montrent que 82% des souches sont productrices d'acétoïne. La production de gaz s'est révélée négative pour toutes les souches lors du métabolisme des sucres et 10% des souches (SY₄, SY₁₃, MB₅, BB₉, SS₄) produisent du sulfure d'hydrogène dans le milieu conduisant au noircissement du milieu. Le Tableau 2 montre que 10% des souches

(SY₇, SY₈, SY₁₀, MB₇ et AB₃) ont utilisées le citrate comme source de carbone. La présence de l'ammoniaque alcalinise le milieu, ainsi 46% des souches ont hydrolysé l'urée tandis que 54% des souches sont dépourvues de l'uréase. Le test d'indole s'est révélé négatif pour toutes les souches. La synthèse de l'acétoïne et des composés organiques acides est un caractère biochimique facilitant la classification des

Bacillus. Taalé et al. (2015) ont montré que des souches de *Bacillus* isolées du *Soumbala*, du *Bikalga* et du lait fermenté ont des réactions variables au test de production d'acétoïne et des composés organiques acides. Les résultats du Tableau 2 montrent que 82% des souches sont VP+ et l'affiliation des souches a été faite selon les descriptions du Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. La production de gaz s'est révélée négative pour toutes les souches lors du métabolisme des sucres (Tableau 2). Des études ont montré que les *Bacillus* métabolisent les sucres sans production de gaz (Taalé et al., 2015). La production du sulfure d'hydrogène est un moyen permettant aux bactéries de survivre dans des conditions hostiles (effet des antibiotiques) ou par dégradation des composés soufrés présent dans le milieu (Debroise, 2012). Le milieu Kliger Iron Agar a permis de montrer que 10% des souches (SY₄, SY₁₃, MB₅, BB₉, SS₄) produisent du sulfure d'hydrogène dans le milieu conduisant au noircissement du milieu. Ces souches de *Bacillus* ont présenté des réactions variables à la production du sulfure d'hydrogène et à la dégradation des composés soufrés. Ces résultats diffèrent de ceux obtenus par Taalé et al. (2015) qui ont obtenu une absence totale de production du sulfure d'hydrogène par des souches de *Bacillus* isolées du *Soumbala*, du *Bikalga* et du lait fermenté. Le métabolisme de citrate est un critère important utilisé pour la classification des *Bacillus*. Des résultats rapportés

par May (2011) ont montré des réactions variables concernant le métabolisme du citrate par des bactéries du genre *Bacillus*. L'uréase est une enzyme hydrolysant l'urée en ammoniac (NH₃). La présence de l'ammoniac alcalinise le milieu. Le Tableau 2 montre que 46% des souches ont hydrolysé l'urée (la présence de l'uréase dans le système enzymatique de ces bactéries), tandis que 54% des souches sont dépourvues de l'uréase. Des résultats similaires ont été obtenus par Taalé et al. (2015). Le test d'indole s'est révélé négatif pour toutes les souches (Tableau 2). Ces résultats montrent que ces souches ne possèdent pas la tryptophanase (enzyme) pour hydrolyse le L-tryptophane. May (2011) et Taalé et al. (2015) ont obtenu des résultats similaires lors de l'identification des souches de *Bacillus*. Essai d'identification : L'ensemble des tests morphologiques, biochimiques et physiologiques en comparaison à ceux du Bergey's Manual of Determinative Bacteriology confirment que ces souches sont des *Bacillus* et a permis de proposer un essai taxonomique reporté dans le Tableau 2.

Activité antimicrobienne des substances produites par les souches performantes de *Bacillus* : Les substances produites par les souches performantes ont inhibé la croissance de *M. luteus* LMG3293 dont les différents diamètres relevés sont reportés dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Mesure des diamètres d'inhibition des surnageants à l'encontre de *Micrococcus luteus* et pH des cultures après 24 heures

Souche	pH initial	pH final	Diamètre en mm
AB ₇	6,8	6,91	16,50 ± 0,71
SY ₃	6,8	6,07	13,50 ± 0,71
SY ₉	6,8	6,37	12,25 ± 0,35
AB ₅	6,8	7,40	11,00 ± 0,00
BB ₄	6,8	6,45	10,75 ± 1,06
SY ₆	6,8	5,82	10,20 ± 1,13
MB ₈	6,8	7,20	09,75 ± 0,35
MB ₇	6,8	5,63	09,50 ± 0,28
AB ₁	6,8	7,01	09,00 ± 0,00
SY ₇	6,8	5,97	09,00 ± 0,00
AB ₆	6,8	6,96	07,90 ± 0,14

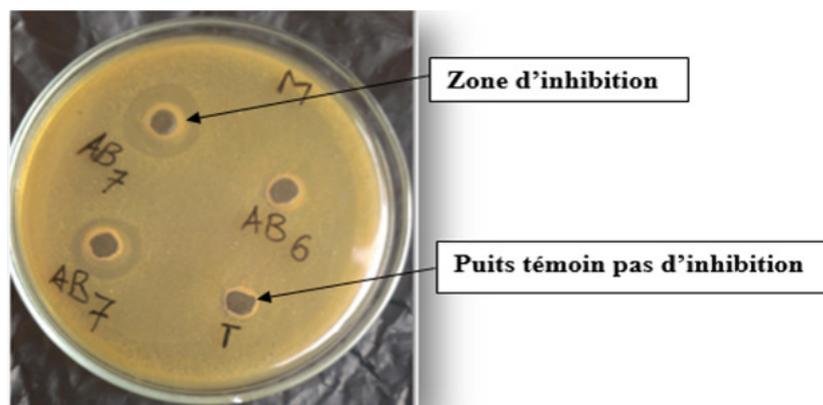


Figure 3 : Inhibition de *M. luteus* LMG3293 par des substances inhibitrices produites par des souches de *Bacillus*

La figure 3 montre l'inhibition de *M. luteus* LMG3293 par des substances inhibitrices produites par la souche AB₆ et AB₇. La variation du pH final (Tableau 3) par rapport au pH initial est due à l'activité bactérienne (nutrition, synthèse de différentes substances). La diminution du pH serait due à une production d'acides organiques (acétate, acide lactique). Les souches SY₆, MB₇, et SY₇ produiraient des substances acides lors de la fermentation des sucres qui rendent le milieu légèrement acide. Ainsi, le pH le plus bas (5,63) a été obtenu avec la souche MB₇. Cette acidité pourrait inhiber la croissance de certains microorganismes (Jenson, 2014). L'augmentation du pH du milieu serait due à la production des substances basiques telles que l'éthanol et l'acétaldéhyde (Jenson, 2014). Les souches SY₃, AB₇, SY₉, AB₅, BB₄, AB₁, MB₈ et AB₆ produisent donc des substances basiques. Le pH le plus élevé (7,40) a été observé chez la souche AB₅. En effet, la figure 3 illustre l'inhibition de *M. luteus* LMG3293 par des substances inhibitrices produites par quelques souches de *Bacillus*. Ces résultats montrent que les biomolécules en question sont de nature protéique. Au total onze (11) souches ont produit des substances ayant une activité antimicrobienne à l'encontre de *M. luteus* LMG3293, avec des diamètres variant d'une souche à l'autre (Tableau 3). La nature protéique de ces substances reste à être élucidée, donc elles peuvent être désignées par le terme anglais de (BLIS) Bacteriocin-Like Inhibitory Substances

(Abriouel et al., 2011 ; Taalé et al., 2015). Lorsque la bactérie se trouve en monoculture, en absence de concurrence et en excès de nutriments, la production de bactériocines s'avère alors sans sens et inutile pour la bactérie (Riley and Chavan, 2007). Pour la suite de l'étude les souches bactériennes qui ont donné un diamètre d'inhibition à l'encontre de *Micrococcus luteus* LMG3293 supérieur à deux fois le diamètre du puits ont été sélectionnées. Il s'agit des trois souches de *Bacillus* : AB₇, SY₃ et SY₉.

Influence des substrats sur l'activité des substances inhibitrices produites par des souches de *Bacillus* :

Les trois souches sélectionnées (AB₇, SY₃, SY₉) ont produit des substances inhibitrices qui ont présenté de grands diamètres d'inhibition à l'encontre de *Micrococcus luteus* LMG3293. L'influence de la production des substances inhibitrices en fonction de la concentration en glucose, en extrait de levure et en ions (Ca²⁺, Mn²⁺, Mg²⁺) a été réalisée à partir de ces souches (AB₇, SY₃, SY₉), afin de connaître le rôle des substrats sur la production de substances inhibitrices.

Influence de substrats carbonés

Influence du glucose : La figure 4 présente les valeurs moyennes des diamètres d'inhibition des substances inhibitrices produites par des souches de *Bacillus* en fonction de la concentration du glucose après 96 heures incubation.

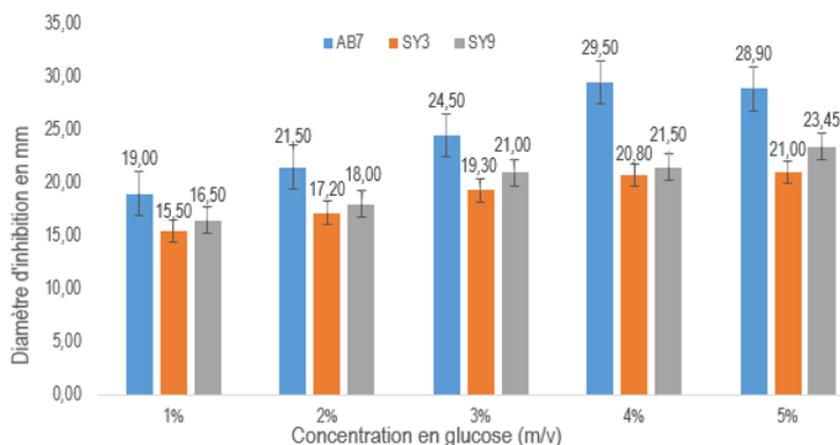


Figure 4 : Effet de la concentration du glucose sur la production de substances inhibitrices par des souches de *Bacillus* à l'encontre de *M. luteus* LMG3293 après 96 heures incubation

Les diamètres d'inhibition augmentent au bout de 96 heures en fonction de la concentration de glucose dans le milieu. En effet, le glucose est facilement utilisé par les bactéries comme source de carbone pour la croissance, la production des enzymes et d'autres métabolites comme les bactériocines (Savadoغو et al., 2006 ; Vamanu and Vamanu, 2010). Des études ont montré également que l'absence du glucose dans le milieu limite la croissance des bactéries et la production de bactériocines (Zendo et al., 2005). Les meilleures concentrations en glucose pour la production de

substances inhibitrices étaient à 4% pour la souche AB₇ et 5% pour les souches SY₃ et SY₉. La concentration optimale en glucose pour la production de substances inhibitrices par les souches utilisées était de 5% du glucose.

Influence de l'extrait de levure : Les valeurs moyennes des diamètres d'inhibition des substances inhibitrices produites par les trois souches performantes de *Bacillus* en fonction de la concentration en extrait de levure au bout de 96 heures sont illustrées par la figure 5

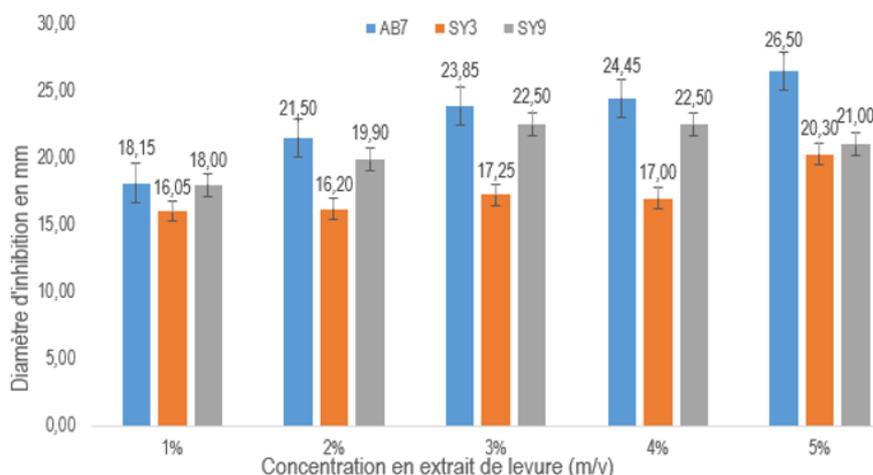


Figure 5 : Effet de la concentration en extrait de levure sur l'activité des substances inhibitrices produites par des souches de *Bacillus* à l'encontre de *M. luteus* LMG3293 après 96 heures d'incubation

Ces résultats montrent que la concentration en extrait de levure influence significativement la croissance bactérienne ainsi que leur synthèse métabolique ($p < 0,0001$) en particulier la production de substances inhibitrices. Ainsi, les diamètres les plus élevés ont été

obtenus respectivement à 5% ($20,30 \pm 0,42$ mm) en 96 heures pour la souche SY₃; à 3% ($22,50 \pm 0,12$ mm), en 96 heures pour la souche SY₉ et à 5% ($26,50 \text{ mm} \pm 0,71$ mm) et pour la souche AB₇ en 96 heures. Les concentrations 3% et 4% ont permis d'obtenir de grands

diamètres d'inhibition avec la souche SY₉. Pour les souches AB₇ et SY₃ c'est la plus forte concentration 5% qui à donner de grands diamètres d'inhibition. Des études similaires menées par Elmoualdi *et al.* (2008) et Han *et al.* (2011) ont montré respectivement que des concentrations de 1% et 2% d'extrait de levure favorisait une croissance importante des bactéries avec une production maximale de substances inhibitrices. Donc, les résultats de cette étude diffèrent un peu de ceux qu'ils ont obtenus. Sarika *et al.* (2010) et Zendo *et al.* (2005)

ont signalé l'importance de l'extrait de levure comme source d'azote organique dans la production de bactériocines.

Influence de substrats minéraux sur l'activité des substances inhibitrices produites par les souches de *Bacillus*.

Influence des ions Calcium (Ca²⁺) : La figure 6 illustre les diamètres d'inhibitions des souches en fonction de la concentration du calcium.

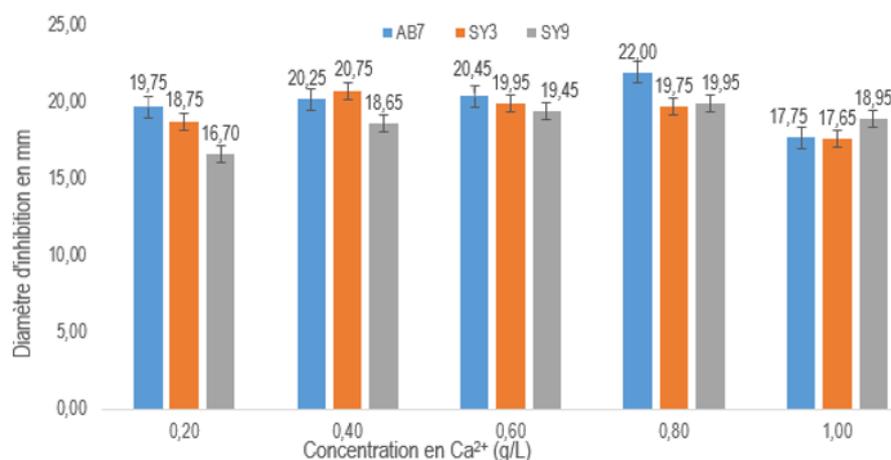


Figure 6 : Effet de la concentration du Ca²⁺ sur l'activité des substances inhibitrices par des souches de *Bacillus* à l'encontre de *M. luteus* LMG3293 après 96 heures incubation

Le diamètre d'inhibition des substances produites par les souches varie en fonction de la souche et de la concentration en Ca²⁺ dans le milieu. Le plus grand diamètre d'inhibition a été obtenu avec la souche AB₇ à 0,8 g/L (22,00 ± 0,00 mm) et le plus petit avec la souche SY₉ à 0,2 g/L (16,70 ± 0,00 mm) après 96 heures d'incubation. Il ressort de l'analyse statistique que la concentration en Ca²⁺ et la souche utilisée ont une influence significative sur la production des substances inhibitrices (p < 0,0001). Les ions calcium protègent également les enzymes contre la dénaturation et augmentent leur activité (Agrawal *et al.*, 2005). Schallmeyer

et al. (2004) ont rapporté que des *Bacillus* produisent des substances inhibitrices lors de la phase exponentielle de croissance et au début de la sporulation, cela pourrait justifier l'importance du calcium dans la production des substances inhibitrices. Des études réalisées par Han *et al.* (2011) ont montré que les concentrations supérieures à 1 g/L en Ca²⁺ limitaient la production de bactériocines.

Influence des ions manganèse (Mn²⁺) : La figure 7 présente les diamètres d'inhibition des substances produites par les souches en fonction de la concentration en Mn²⁺ dans le milieu.

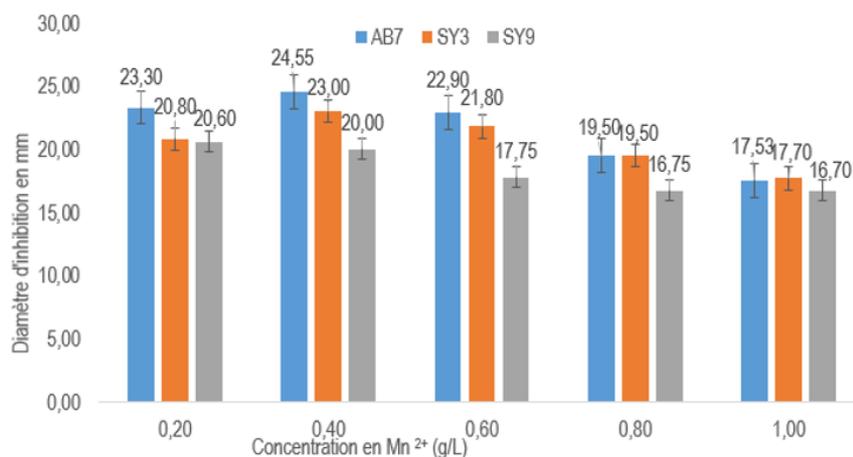


Figure 7 : Effet de la concentration du Mn²⁺ sur la production de substances inhibitrices par des souches de *Bacillus* à l'encontre de *M. luteus* LMG3293 après 96 heures incubation

Les diamètres d'inhibition minimale et maximale mesurés à 96 heures étaient respectivement de 16,70 ± 0,15 mm (SY₉ à 1 g/L) et 24,55 ± 0,64 mm (AB₇ à 0,4 g/L). La souche SY₃ tolère plus l'augmentation du manganèse dans le milieu, car à partir de 0,8 g/L, elle possède des diamètres d'inhibitions plus grands (19,80 ± 1,13 mm à 0,8 g/L et 17,70 ± 0,41 mm à 1 g/L). Les souches AB₇ et SY₃ à 0,4 g/L présentent les diamètres les plus élevés respectivement 24,55 ± 0,64 mm et 23,00 ± 0,64 mm. La souche SY₉ supporte moins le manganèse, car le plus petit diamètre obtenu était de 20,00 ± 0,00 mm à 0,4 g/L. A partir de 0,6 g/L le milieu devient défavorable à la croissance des bactéries et à la production de substances inhibitrices. Les résultats du test de Fisher montrent que la concentration en Mn²⁺ et la souche (p < 0,0001) influencent très significativement la production

des substances inhibitrices. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Han *et al.* (2011) qui ont trouvé qu'une concentration de 0,14 g/L en Mn²⁺ était favorable à la production des bactériocines. Au-delà d'une concentration supérieure à 0,4 g/L, on observe une diminution des diamètres d'inhibition qui pourrait s'expliquer par une baisse de la production de substances inhibitrices. Kamjumhol *et al.* (2013) ont rapporté que l'augmentation de la concentration en manganèse dans un milieu à un effet négatif sur la croissance bactérienne, la formation de biofilms et la synthèse de métabolites.

Influence des ions magnésium (Mg²⁺) : Les diamètres d'inhibition en fonction de la concentration en Mg²⁺ dans le milieu au bout de 96 heures sont représentés dans la figure 8.

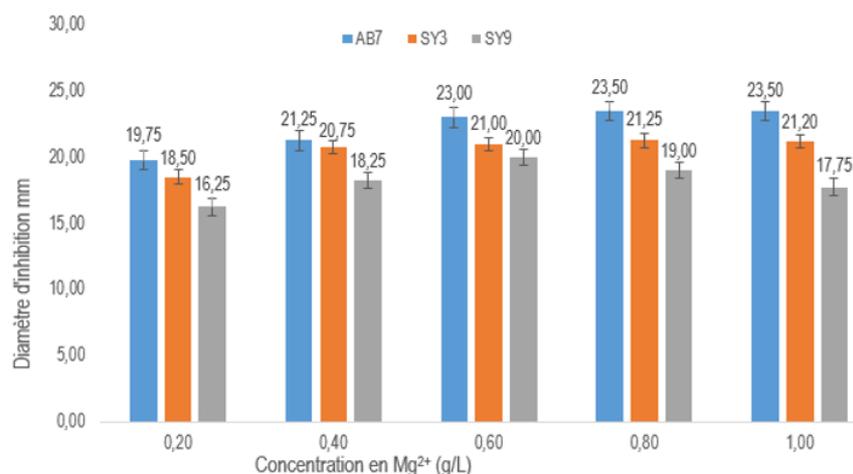


Figure 8 : Effet de la concentration du Mg²⁺ sur la production de substances inhibitrices par les souches de *Bacillus* à l'encontre de *M. luteus* LMG3293 après 96 heures incubation

L'analyse des résultats montre que les diamètres d'inhibition des substances produites par les souches varient en fonction de la concentration en Mg²⁺ dans le milieu et de la souche utilisée. Le diamètre d'inhibition maximal était de 23,00 ± 0,71 mm (la souche AB₇ à 0,8 g/L) et le diamètre d'inhibition minimal 17,25 ± 1,06 mm (la souche SY₉ à 0,2 g/L). Pour les souches AB₇ et SY₃ la production de substances inhibitrices à 96 heures aux concentrations 0,6 g/L ; 0,8 g/L ; 1 g/L est pratiquement invariable. La souche SY₉ présente de grands diamètres d'inhibition (20,00 ± 0,00 mm et 19,75 ± 0,35 mm) avec la concentration de 0,6g/L, tandis que les concentrations 0,8 g/L et 1 g/L montrent de faibles diamètres d'inhibition (19,00 ± 0,00 mm et 17,75 ± 1,06 mm). Biswas *et al.* (1991) ont montré que l'ajustement en magnésium du

milieu de culture affectait la production de bactériocines. Ces résultats sont en accord avec ceux de Han *et al.* (2011) qui ont suggéré qu'une concentration de 0,575 g/L en Mg²⁺ favorise la production de bactériocines. L'analyse de la variance de la production de substances inhibitrices en fonction du Mg²⁺ révèle que la concentration et la souche utilisée ont une influence significative sur la production de substances inhibitrices (p < 0,0001).

Propriété physique du surnageant :

thermostabilité : Le Tableau 4 présente les diamètres d'inhibition obtenus après traitements thermiques des substances inhibitrices à différentes températures pendant 30 mn.

Tableau 4 : Effet de la température sur les substances inhibitrices

T °C	Diamètre d'inhibition à l'encontre de <i>M. luteus</i> (mm)		
	AB ₇	SY ₃	SY ₉
Témoin	14,00 ± 0,00	10,50 ± 0,71	11,75 ± 0,00
50 °C	12,50 ± 0,35	09,00 ± 0,70	09,50 ± 0,71
80 °C	12,00 ± 0,07	09,00 ± 0,00	08,00 ± 0,71
100 °C	12,00 ± 0,71	09,00 ± 0,00	08,50 ± 0,00

La sensibilité thermique des substances a été testée par un traitement à différentes températures (50 °C, 80 °C et 100 °C) pendant 30min. Les bactériocines sont reconnues pour leur stabilité aux traitements thermiques. Les bactériocines de faible poids moléculaire sont plus thermostables par rapport à celles qui ont un poids moléculaire très élevé (Albano *et al.*, 2007). Cependant, les bactériocines deviennent inefficaces lorsqu'elles sont exposées à de fortes températures (à 121 °C pendant 20 minutes) (Karam *et al.*, 2008). Les résultats obtenus montrent que les substances inhibitrices gardent leur activité antibactérienne quel que soit la température de traitement thermique inférieure ou égale à 100 °C pendant 30 min. Ces résultats trouvés sont en accord

avec ceux rapportés par Karam *et al.* (2008), qui ont trouvé que l'activité du surnageant n'est pas affectée pour une température comprise entre 60 °C et 100 °C pendant 30 minutes. Les diamètres d'inhibition obtenus variaient entre 08,00 ± 0,71 mm et 12,50 ± 0,35 mm (Tableau 4). En effet la stabilité de ces substances suggère qu'elles pourraient être des bactériocines appartenant à la classe I ou II. Dortu and Thonart (2009) ont rapporté que les bactériocines de classe II sont des peptides de taille inférieure à 10 kDa, stables à la chaleur et ne contiennent pas d'acides aminés modifiés. Twomey *et al.* (2002) ont également rapporté la thermostabilité des bactériocines de taille inférieure à 5 kDa (classe I).

CONCLUSION

La présente étude a porté sur la production de substances BLIS par des souches *Bacillus* isolées d'aliments fermentés au Burkina Faso. Il ressort de cette étude que certaines souches de *Bacillus* produisent des substances inhibitrices dirigées contre *Micrococcus luteus* LMG3293. Les résultats obtenus montrent que les souches utilisées pourraient appartenir aux espèces : *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. sp.*, *B. circulans* et *B. subtilis*. Sur les cinquante souches utilisées, onze étaient productrices de substances inhibitrices actives à l'encontre de *Micrococcus luteus* LMG3293. Les

souches AB₇, SY₃ et SY₉ ont présenté un fort pouvoir inhibiteur vis-à-vis de *Micrococcus luteus* LMG3293 avec des diamètres inhibition allant de 16,50 ± 0,71 mm à 07,25 ± 0,35 mm respectivement pour les souches AB₇ et SY₉. Cette production était significativement influencée par la souche utilisée, le type et la concentration du substrat (glucose et extrait de levure) mais aussi la concentration en ions (minéraux). Les concentrations 4% et 5% de glucose et d'extrait de levure stimulaient fortement la production de substances inhibitrices. Quant aux minéraux, les concentrations favorisant la production

maximale de substances inhibitrices étaient de 0,8 g/L pour le Ca²⁺, 0,4 g/L pour le Mn²⁺ et 0,6 g/L pour le Mg²⁺. Le traitement thermique à 100 °C pendant 30 mn a révélé la thermostabilité des substances inhibitrices contenues

dans le surnageant qui pourraient être des bactériocines de classe I ou II. Ces substances inhibitrices produites par des *Bacillus* pourraient contribuer à la conservation des aliments.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abriouel H, Franz C, Omar NB, Galvez A, 2011. La diversité et les applications de *Bacillus* bactériocines. *FEMS. Microbiol. Rev.* 35 (1): 201-232.
- Agrawal D, Patidar P, Banerjee T, Patil S, 2005. Alkaline protease production by a soil isolate of *Beauveria felina* under SSF condition: parameter optimization and application to soy protein hydrolysis. *Proc. Biochem.* 40: 1131-1136.
- Albano H, Oliveira M, Aroso R, Cubero N, Hogg T, Teixeira P, 2007. Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from 'Alheiras' (traditional portuguese fermented sausages) *In situ* assays. *Meat. Sci.* 76: 796-800.
- Anas M, 2013. Recherche des bactéries lactiques productrices de bactériocine à large spectre d'action vis-à-vis des germes impliqués dans les toxi-infections alimentaires en Algérie. Thèse, Université d'Oran, Algérie. 176pp.
- Anas M, Zinedine BA, Rizk HA, Eddine HJ, Mebrouk K, 2012. Screening of autochthonous *Lactobacillus* species from Algerian raw goats' milk for the production of bacteriocin-like compounds against *Staphylococcus aureus*. *Afr. J. Biotechn.* 11(20) : 4595-4607.
- Biswas SR, Ray P, Johnson MC, Ray B, 1991. Influence of growth conditions on the production of bacteriocin, pediocin Ach, by *Pediococcus acidilactici* H. *Appl. Environ. Microbiol.* 5: 1265-1267.
- Boumediene K, 2013. Recherche des bactéries lactiques productrices des bactériocines et l'étude de leur effet sur des bactéries néfastes. MEMOIRE de Magister en Biologie, Université Abou Bekr Belkaïd-Tlemcen. 80pp.
- Carr F J, Chill D, Madia N, 2002. The lactic Acid Bacteria: A literature survey. *Crit. Microbiol. Rev.* 28 (4): 281-378.
- Compaoré CS, Jensen LB, Diawara B, Ouédraogo GA, Jakobsen M, Ouoba LII, 2013. Resistance to antimicrobials and acid and bile of *Bacillus* spp isolated from *Bikalga*, fermented seeds of *Hibiscus sabdariffa*. *African tolerance. J. Foods. Sci.* 1 (11): 408-414.
- Debroise A, 2012. Un gaz aide les bactéries à résister aux antibiotiques. *Rech.* 461: p20.
- Dicks LMT, Heunis DA, Staden VDA, Brand A, Sutyak NK, Chinkindas ML, 2011. Medical and Personal Care Applications of Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria. In: Drider D and Rebuffat S. (Eds). *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From genes to applications*. Springer New York. 391-421 pp.
- Dortu C and Thonart P, 2009. Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 13 (1): 143-154.
- Elmoualdi L, Labioui H, Boushama L, Benzakour A, Ouhssine M, Yachioui EM, 2008. Activité bactéricide d'une souche de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux.* 147: 7-18.
- Gänzle MG, Hertel C, Hammes WP, 1999. Resistance of *Escherichia coli* and *Salmonella* against nisin and curvacin A. *Int. J. Food. Microbiol.* 48: 37-50.
- Han B, Zhanqiao Y, Baosheng L, Qingshan M, Rijun Z, 2011. Optimization of bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* YJG, isolated from the mucosa of the gut of healthy chickens. *Afr. J. Microbiol. Res.* 5 (10): 1147-1155.
- Holt JG, Krieg RN, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST, 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th edn. Williams and Wilkins, Baltimore, MD. 787pp.
- Jenson I, 2014. *Bacillus*. In: Dahl, M.K. (Ed.), *Encyclopedia of Food Microbiology*. Elsevier Ltd, 111-117pp.
- Joffin JN and Leyral G, 2006. *Microbiologie technique*. Centre Régional de Documentation Pédagogique d'Aquitaine Bordeaux, France. 219-223pp.
- Kahina MM, 2011. Caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie lactique *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolée du boza. Thèse, Université Pierre et Marie Curie-Paris VI. 228pp.
- Kamjumphol W, Chareonsudjai S, Chareonsudjai P, Wongratanacheewin, Taweechaisupapong,

2013. Environmental factors affecting Burkholderia Pseudomallei biofilm formation. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 44(1): 72-81.
- Karam NE, Zadi-Karam H, Lazreg L, Dalache F, 2008. Bactériocines de bactéries lactiques : caractérisation d'une bactériocine d'*Enterococcus* BO2. *Renc. Rech. Ruminants*. 15: 72.
- Kivanç SA, Takim M, Kivanç, M, Güllülü G, 2014. *Bacillus* Spp. isolated from the conjunctiva and their potential antimicrobial activity against other eye pathogens. *Afr. Health. Sci.* 14(2): 364-371.
- Klaenhammer TR, 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochem.* 70 (3): 337-349.
- Landman C, Quévrain E, 2016. Le microbiote intestinal : description, rôle et implication physiopathologique. *Rev. Méd. Inter*, 37(6) : 418-423.
- Leyral G and Vierling E, 2007. Microbiologie et toxicologie des aliments : hygiène et sécurité alimentaire. *Biosci. technol. Wolters Kluwer*, France, 287p.
- May AAAI-Allaf, 2011. Isolation of *Bacillus* spp. from some sources and study of its proteolytic activity. *Tikrit. J. P. Sci.* 16 (4): 1813-1662.
- Pierre T, Aurélien L, Matthieu R, 2015. Innovative treatments for multidrug-resistant bacteria. *Bulletin de l'Academie nationale de medecine.* 198(3) : 439-56.
- Riley MA and Chavan MA, 2007. Bacteriocins : Ecology and Evolution. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Sarika AR, Lipton AP, Aishwarya MS, 2010. Bacteriocin production by a new isolate of *Lactobacillus rhamnosus* GP1 under different culture conditions. *Adv. J. Food. Sci. Technol.* 2: 291-297.
- Savadogo A, Ouattara CAT, Bassolé IHN, Traoré SA, 2006. Bacteriocins and lactic acid bacteria. *Afr. J. Biotechnol.* 5 (9): 678-683.
- Savadogo A, Tapi A, Chollet M, Wathelet B, Traoré AS, Jacques P, 2011. Identification of surfactin producing strains in *Soumbala* and *Bikalga* fermented condiments using Polymerase Chain Reaction and Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Mass Spectrometry methods. *Int. J. Food. Microbiol.* 151: 299-306.
- Schallmeyer M, Singh A, Ward OP, 2004. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Canadian. J. Microbiol.* 50: 1-17.
- Taalé E, 2016. Recherche de molécules bioactives d'origine microbienne : caractérisation biochimique et moléculaire des souches de bactéries isolées du *Soumbala*, du *Bikalga* et de certains yaourts consommés au Burkina Faso, productrices de bactériocines. Doctoral dissertation, Université Ouaga I Pr Joseph KI-ZERBO. 205pp.
- Taalé E, Savadogo A, Zongo C, Somda MK, Sereme SS, Karou SD, Soulama I, Traore AS, 2015. Characterization of *Bacillus* species producing Bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) isolated from fermented food in Burkina Faso. *Int. J. Adv. Res. Biol. Sci.* 2 (4): 279-290.
- Taalé E, Savadogo A, Zongo C, Tapsoba F, Karou SD, Traore AS, 2016. Les peptides antimicrobiens d'origine microbienne: cas des bactériocines. *Int. J. Biol. Chem. Sci.* 10(1): 384-399.
- Tagg JR and Mc Given AR, 1971). Assay system for bacteriocin. *Appl. Microbiol.* 21: 943-948.
- Tagg JR, 2004. Prevention of Streptococcal Pharyngitis by Anti-*Streptococcus pyogenes* Bacteriocin-like Inhibitory Substances (BLIS) Produced by *Streptococcus salivarius*. *Indian. J. Med. Res.* 119: 13-16.
- Twomey D, Ryan M, Meaney B, Hill C, 2002. Lantibiotics produced by lactic acid bacteria : structure, function and applications. *Antonie van Leeuwenhoek.* 82: 165-185.
- Vamanu E and Vamanu A, 2010. The influence of prebiotics on bacteriocin synthesis using the strain *Lactobacillus paracasei* CMGB 16. *Afr. J. Microbiol. Res.* 4 (7): 534-537.
- Zendo T, Eungruttanagorn N, Fujioka S, Tashiro Y, Nomura K, Sera Y, Sonomoto K, 2005. Identification and production of a bacteriocin from *Enterococcus mundtii* QU2 isolated from soybean. *J Appl Microbiol* 99:1181-1190.