

**UNIVERSITE POLYTECHNIQUE
DE BOBO-DIOULASSO**

INSTITUT DU DEVELOPPEMENT RURAL



N° d'ordre...

THESE UNIQUE

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE POLYTECHNIQUE
DE BOBO-DIOULASSO**

*Doctorat Unique en Biologie Appliquée et Modélisation des Systèmes
Biologiques (Spécialité : Biochimie-Microbiologie)*

Par

Clarisse Sidbewendé COMPAORE épouse DAWENDE

**Titre : CARACTERISATION DE *BACILLUS* SPP. EN
VUE DE LA SELECTION DE CULTURES STARTERS
POUR UNE FERMENTATION CONTROLEE DU
BIKALGA (GRAINES FERMENTEES D'OSEILLE)**

Présentée et soutenue publiquement le 18 Novembre 2013 devant
le jury composé de :

Président : Pr. Laya SAWADOGO, Université de Ouagadougou, Burkina Faso

Membres : Pr. Georges Anicet OUEDRAOGO, Université Polytechnique de Bobo, Burkina Faso
Dr. Bréhima DIAWARA, IRSAT/CNRST, Burkina Faso
Dr. Wisdom Koffi AMOA-AWUA, Food Research Institute, Ghana

DEDICACE

Je dédie cette thèse :

-A la mémoire de mon Cher Papa, qu'il repose en paix !

-A mon époux Denis et à notre fille Ornella Laurène !

-A ma Mère et à mes frères !

-A toute ma famille !

AVANT-PROPOS

Ce travail a été réalisé grâce à la contribution de plusieurs collaborations de recherche impliquant plusieurs Institutions dont l'Ecole Doctorale de l'Université Polytechnique de Bobo-Dioulasso (Burkina Faso) à travers la formation en Biologie Appliquée-Modélisation des Systèmes Biologiques (BA-MSB), le Département Technologie Alimentaire de l'Institut de Recherche en Sciences Appliquées et technologies (DTA/IRSAT/CNRST, Burkina Faso) et le Département of Food Science, Faculty of Sciences de l'Université de Copenhague (Danemark). Cette thèse a été conduite sous la direction et les co-directions suivantes :

- Pr. Georges Anicet Ouédraogo, Président de l'Université Polytechnique de Bobo-Dioulasso, Responsable Académique de la formation Doctorale de Biologie Appliquée-Modélisation des systèmes Biologiques (BA-MSB) de l'Ecole Doctorale de l'UPB, Directeur de la présente thèse;
- Dr. Bréhima Diawara, Directeur de l'Institut de Recherche en Sciences Appliquées et Technologies (IRSAT/CNRST), Directeur de Recherche, co-Directeur de thèse;
- Pr. Mogens Jakobsen, Professeur Titulaire Emérite au Department of Food Sciences/Faculty of Sciences de l'Université de Copenhague, Danemark, Manager Principal du projet DANIDA (Danish International Development Assistance), co-Directeur de thèse.

Le travail a été soutenu financièrement et matériellement par le projet DANIDA à travers son volet «Capability Building for Research and Quality Assurance in Traditional Food Processing in West Africa / STS4, J. nr. 104 dan. 8L. / 1101». Nous exprimons notre profonde reconnaissance à la coopération danoise DANIDA.

Le travail a également bénéficié d'un appui financier de l'UEMOA à travers son programme de soutien pour la formation et la Recherche de l'excellence, édition 2011-2012. Nous adressons nos sincères remerciements à l'UEMOA.

REMERCIEMENTS

La présente thèse de doctorat est le fruit d'un travail de longue haleine dont l'aboutissement a été possible grâce au soutien de plusieurs personnes. J'aimerais souligner ici celles et ceux dont les contributions multiformes ont permis cet accomplissement.

Qu'il me soit permis de remercier en premier lieu :

Le Professeur Mogens Jakobsen, Professeur Titulaire Emérite au Department of Food Sciences/Faculty of Sciences de l'Université de Copenhague/Danemark, Manager Principal du projet DANIDA (Danish International Development Assistance), co-Directeur de cette thèse, pour m'avoir accueilli dans votre laboratoire et pour votre confiance placée en moi depuis mon DEA. Les facilités de travail que vous m'avez offert, votre grande disponibilité et votre soutien constant ont été d'un grand apport dans l'accomplissement de cette thèse. Profonde gratitude et sincère reconnaissance!

Le Pr. Georges Anicet Ouédraogo, Responsable Académique de la formation Doctorale de Biologie Appliquée-Modélisation des systèmes Biologiques (BA-MSB) de l'Ecole Doctorale de l'UPB, Directeur de cette thèse pour avoir accepté de diriger ce travail et pour votre encadrement scientifique. Votre modestie, votre disponibilité, vos connaissances scientifiques immenses et votre engagement pour la formation de la jeunesse africaine m'ont beaucoup marqué. Il m'est donc agréable de trouver ici l'occasion de vous exprimer ma sincère reconnaissance.

Le Dr. Bréhima Diawara, Directeur de Recherche, Directeur de l'Institut de Recherche en Sciences Appliquées et Technologies (IRSAT/CNRST), co-Directeur de cette thèse pour m'avoir confié ce projet de recherche et pour la confiance que vous m'avez accordée. Malgré vos multiples occupations, vous avez toujours été à mon écoute pour me guider, m'imprégnant ainsi de vos qualités intellectuelles, scientifiques et de chercheur. Permettez-moi de vous traduire toute ma gratitude et mes sincères remerciements.

Le Pr. Line Thorsen et le Pr. Dennis S. Nielsen, du Department of Food Science (Copenhague) pour votre accueil, votre assistance scientifique et technique, votre constante disponibilité et votre rigueur scientifique, ainsi que votre soutien inestimable lors de la rédaction des articles.

Le Dr Irène L.I. Ouoba, Chercheur à l'Université Métropolitaine de Londres, pour votre implication dans ce travail, votre encadrement scientifique, votre soutien sans faille, votre disponibilité constante tout au long de ce travail. Merci très chère grande sœur !

Le Dr. Hagrétou Sawadogo-Lingani, Maître de Recherche, Chef du Département Technologie Alimentaire de l'IRSAT, vous avez toujours été à mon écoute chaque fois que j'ai eu besoin de vous. Je tiens à vous exprimer mes très vifs remerciements pour votre participation si enrichissante à l'encadrement de cette thèse, votre aide, votre disponibilité, vos précieux conseils.

Je remercie le Pr. Alfred S. Traoré, le Pr. Adrien M. Gaston Bélem et le Dr. Wisdom K. Amoa-Awua, qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'être rapporteurs de ma thèse.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude au président du jury, le Pr. Laya Sawadogo et aux membres du jury pour avoir accepté juger ce travail.

Mes remerciements vont également à :

Tous les enseignants-chercheurs de l'Ecole Doctorale de l'UPB et les enseignants-chercheurs du CRSBAN (Université de Ouagadougou) qui ont chacun à un certain moment contribué efficacement à ma formation.

Dr Thorben S. Berner, pour m'avoir aidé à réaliser les essais SDS-PAGE et pour avoir corrigé les manuscrits d'articles.

Dr. Kristian F. Nielsen pour m'avoir aidé à effectuer les analyses HPLC-MS et pour avoir corrigé les manuscrits d'articles.

Toute l'équipe du laboratoire de microbiologie du département of food science de l'Université de Copenhague en particulier Pr. Lene J., Jeanne, Bashir, Filippa, Dr. Sally, Dr. Nadja, Dr. Martin, pour votre sympathie et vos encouragements lors de nos séjours à Copenhague.

Mes amis doctorants David, Stephen, Elmer, James, Fortune, Pélagie, Benoit pour la bonne ambiance de travail et pour le partage scientifique durant nos séjours à Copenhague.

Mme Kéré/Kando Christine avec qui nous avons partagé des moments aussi bien difficiles qu'agréables à Copenhague. Merci pour ton soutien inestimable chère Dans'cop !

Dr. Charles Parkouda et Dr. Donatien Kaboré, pour votre aide, soutien, assistance, suggestions et encouragements.

Tout le personnel de l'IRSAT et du DTA en particulier Dr Léguet Ganou, Dr Laurencia Ouattara, Dr. Ba Hama F., Mr Combari M., Mr Bougouma B., Mr Bayili R., Mr. Sawadogo

L., Raoul D., Mmes Congo M., Traoré H., Somda S., Konate J., Bassole J., Konkobo C., Zida K., Eugénie K., Ouédraogo C., pour vos soutiens multiformes et encouragements.

Les stagiaires du laboratoire de microbiologie du DTA pour leur contribution à la réalisation de ce travail.

Dr. Isidore Bonkougou pour ses encouragements, son aide, ses précieux conseils ainsi que sa disponibilité durant la rédaction de cette thèse.

Mes remerciements vont aussi à mes amis doctorants de la promotion CHEVAL du RABIOTECH pour leur soutien. Merci et surtout bon courage à vous pour la suite de vos travaux.

Madame Françoise Nebié de l'UEMOA pour son aide et ses encouragements.

Mes amis Bodil, Max, Ole, Feu Inge, Nezien, Leila, Da, famille Yonaba, pour leur amitié et leurs soutiens multiformes lors de mes séjours à Copenhague.

Mes amis Alice, Estelle, Maimounata, Diane, Dianita, Juliette, Gorga, Patricia, Biba, Dr. Somda M., Dr. Ilboudo H., Dissa L., pour vos encouragements et vos soutiens.

Aux familles Dawendé et Parkouda, en particulier le Colonel Jean-Baptiste Parkouda pour ses encouragements et son soutien.

La Soeur Thérèse Dawendé pour ses encouragements et son soutien spirituel.

Mr. Jean Pascal Dawendé pour ses encouragements et son aide durant la rédaction de la thèse.

Maître Zouré Théophile et son épouse à Bobo pour leur hospitalité et leurs soutiens multiformes.

Merci enfin à toutes celles et à tous ceux qui ont contribué directement ou indirectement à faire de cette aventure une expérience bénéfique, et dont les noms n'ont pu être cités.

SOMMAIRE

DEDICACE	i
AVANT-PROPOS	ii
REMERCIEMENTS.....	iii
SOMMAIRE	vi
LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS	x
LISTE DES TABLEAUX	xii
LISTE DES FIGURES.....	xiii
LISTE DES PHOTOS.....	xiii
RESUME.....	xiv
ABSTRACT	xvi
INTRODUCTION GENERALE	1
CHAPITRE I: SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	5
1.1 Description botanique de la plante d' <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.	6
1.2 Composition et principales utilisations.....	7
1.2.1 Composition biochimique.....	7
1.2.1.1 Composition des graines	8
1.2.1.2 Composition des autres parties de la plante.....	10
1.2.2 Principales utilisations de la plante d' <i>Hibiscus sabdariffa</i>	11
1.2.2.1 Utilisations alimentaires.....	11
1.2.2.2 Utilisations médicinales.....	12
1.3 Fermentation alimentaire.....	13
1.4 Fermentation traditionnelle alcaline en Afrique.....	14
1.5 Condiments fermentés alcalins d'Afrique et principaux microorganismes associés	15

1.6	Le <i>Bikalga</i>	18
1.6.1	Méthode de production	18
1.6.2	Changements physico-chimiques au cours de la fermentation.....	22
1.6.3	Valeur nutritive du <i>Bikalga</i>	24
1.6.4	Microorganismes associés à la fermentation	26
1.7	Les bactéries du genre <i>Bacillus</i>	26
1.8	La nécessité d'optimiser le processus de production du <i>Bikalga</i>	28
1.9	Avantages de l'utilisation de starter pour la fermentation des graines d' <i>H. sabdariffa</i>	29
1.10	Les bactériocines	31
1.10.1	Définition.....	31
1.10.2	Classification.....	31
1.10.3	Les applications des bactériocines	33
1.10.3.1	Les bactériocines en agroalimentaire	33
1.10.3.2	Les applications médicales	34
1.10.4	<i>Bacillus</i> spp. producteurs de bactériocines	35
1.11	Les lipopeptides	36
1.11.1	Structure chimique des lipopeptides.....	37
1.11.2	Biosynthèse des lipopeptides	38
1.11.3	Propriétés des lipopeptides.....	39
1.11.3.1	Propriétés physico-chimiques.....	39
1.11.3.2	Propriétés biologiques	40
1.12	Les polykétides.....	42
1.12.1	Définition.....	42
1.12.2	Biosynthèse des polykétides.....	43
1.13	Résistance des bactéries aux antibiotiques.....	43
1.13.1	Définition des antibiotiques	43
1.13.2	Mode d'action des antibiotiques	43
1.13.3	Classification des antibiotiques	44
1.13.4	Etude de la bactériostase : Détermination de la CMI.....	45
1.13.5	Les différents types de résistance aux antibiotiques	46
CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES.....		48
2.1	Matériels.....	49
2.1.1	Les souches bactériennes et les conditions de culture	49
2.1.2	Les milieux de culture (solides et liquides)	51

2.1.3	Les tampons, les solutions et les enzymes	51
2.1.4	Les graines d' <i>H. sabdariffa</i> L.	52
2.2	Protocole des études réalisées	52
2.2.1	Confirmation de l'identité des souches dominantes de <i>Bacillus</i> spp. isolées du <i>Bikalga</i>	52
2.2.1.1	Extraction de l'ADN bactérien	52
2.2.1.2	Regroupement des isolats par M13-PCR (Polymerase Chain Reaction)	53
2.2.1.3	Amplification et séquençage du gène <i>gyrB</i>	53
2.2.2	Etude de l'activité antimicrobienne des souches dominantes de <i>Bacillus</i> spp. isolées du <i>Bikalga</i>	54
2.2.2.1	Préparation des inocula des souches de <i>Bacillus</i> spp.....	54
2.2.2.2	Préparation des surnageants de culture des souches de <i>Bacillus</i> spp..	54
2.2.2.3	Détermination de l'activité antimicrobienne par la méthode de diffusion de tache de culture dans l'agar	55
2.2.2.4	Détermination de l'activité antimicrobienne par la méthode de diffusion en puits du surnageant de culture dans l'agar	55
2.2.3	Caractérisation physico-chimique des substances antimicrobiennes produites	56
2.2.3.1	Effet des enzymes, du pH, de la chaleur et des composés chimiques sur l'activité inhibitrice	56
2.2.3.2	Estimation de la taille des composés antimicrobiens par SDS-PAGE ...	57
2.2.3.3	Analyse des substances antimicrobiennes par HPLC-MS	59
2.2.4	Recherche des gènes codant pour les bactériocines (subtiline, subtilosine, sublancine et éricine), les lipopeptides (iturine/mycosubtiline, surfactine/lichenysine et fengycine/plipastatine), les polykétides (difficidine, macrolantine et bacillaene) et la dipeptide bacilysine.....	61
2.2.5	Cinétique de croissance et de production des substances inhibitrices.....	63
2.2.6	Essais de production de substances inhibitrices par les souches A4, I8, G3 et H4 dans le bouillon des graines broyées d' <i>H. sabdariffa</i>	63
2.2.7	Résistance des <i>Bacillus</i> spp. dominantes du <i>Bikalga</i> aux antibiotiques....	64
2.2.7.1	Détermination de la sensibilité des souches aux antibiotiques : détermination des concentrations Minimales Inhibitrices (CMI).....	64
2.2.7.2	Recherche de quelques gènes de résistance aux antibiotiques	65
2.2.8	Résistance à l'acide et tolérance à la bile des souches de <i>Bacillus</i> spp.dominantes du <i>Bikalga</i>	66
2.2.8.1	Préparation des inocula des souches de <i>Bacillus</i> spp.....	66
2.2.8.2	Effet de l'acidité sur les souches	67
2.2.8.3	Effet de la bile sur les souches	67
2.2.9	Méthodes d'analyses statistiques des données	68

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION	69
3.1 Résultats	70
3.1.1 Résumé de l'article 1	71
3.1.2 Article 1 publié: Coproduction of surfactin and a novel bacteriocin by <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> H4 isolated from <i>Bikalga</i> , an African alkaline <i>Hibiscus sabdariffa</i> seed fermented condiment.	73
3.1.3 Résumé de l'article 2	85
3.1.4 Article 2 publié: <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ssp. <i>plantarum</i> strains as potential protective starter cultures for the production of <i>Bikalga</i> , an alkaline fermented food.....	87
3.1.5 Résumé de l'article 3.....	102
3.1.6 Article 3 publié: Resistance to antimicrobials and acid and bile tolerance of <i>Bacillus</i> spp. isolated from <i>Bikalga</i> , fermented seeds of <i>Hibiscus sabdariffa</i>	104
3.2 Discussion générale	112
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	118
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	121
ANNEXES.....	146

LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS

(i).Instituts-Organismes

MEF	Ministère de l'Economie et des Finances
FAO	Food and Agriculture Organization
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
DANIDA	Danish International Development Assistance
CNRST	Centre National de la Recherche Scientifique et Technique
IRSAT	Institut de Recherche en Sciences Appliquées et Technologies
DTA	Département technologie Alimentaire
UPB	Université Polytechnique de Bobo Dioulasso

(ii).Unités de mesure

H	Heure
min	Minute
Sec	Seconde
mM	Millimolaire
V	Volt
µg	Microgramme
µl	Microlitre
DO	Densité Optique
ufc	Unité formatrice de colonie

(iii).Abréviations générales

ADN	Acide Désoxyribonucléique
ARN	Acide Ribonucléique
BHI	Brain Heart Infusion
PBS	Phosphate Buffer Saline
SDS-PAGE	Sodium Dodécyl Sulfate- Polyacrylamide Gel Electrophoresis
dNTP	Mélange équimolaire des quatre désoxyribonucléotides triphosphate dATP, dCTP, dGTP et dTTP
UV	Ultra Violet
TBE	Tris-Borate-EDTA
MS	Matière sèche
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
Pb	paire de base
EDTA	Ethylène Diamine Tétra Acétique
PCR	Polymerase Chain Reaction (Réaction de polymérisation en chaine)
CFA	Communauté Financière Africaine
HPLC-MS	High Performance Liquid Chromatographie-Mass Spectrometry

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Composition en acides aminés et en acides gras des graines d' <i>H. sabdariffa</i>	9
Tableau II : Exemples de condiments fermentés africains et les principaux microorganismes impliqués.....	17
Tableau III : Valeur nutritive en protéines, lipides, sucres et sels minéraux du <i>Bikalga</i>	25
Tableau IV : Composition en acides aminés et en sels minéraux des graines fermentées d' <i>H. sabdariffa</i>	25
Tableau V : Exemples de bactériocines produites par <i>Bacillus</i> spp.....	36
Tableau VI : Classification des antibiotiques selon le mode d'action.....	45
Tableau VII : Les souches indicatrices utilisées dans l'étude.....	50
Tableau VIII : Amorces oligo-nucléotidiques utilisées.....	62
Tableau IX : Concentrations critiques des antibiotiques et les gènes de résistance investigués.....	65
Tableau X : Amorces utilisées pour la détection des gènes de résistance aux antibiotiques.....	66

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Diagramme technologique de production du <i>Bikalga</i>	21
Figure 2 : <i>B. subtilis</i> observé en microscopie électronique à balayage.....	27
Figure 3: Exemples de lantibiotiques de <i>B. subtilis</i> et leurs gènes de synthèse.....	32
Figure 4: Structure détaillée de la surfactine, de la fengycine et de l'iturine.....	38
Figure 5 : Quelques exemples de polykétides.....	42
Figure 6 : Mode d'action des antibiotiques.....	44

LISTE DES PHOTOS

Photo 1a : Aspect général du plant d' <i>H. sabdariffa</i> variété rouge.....	7
Photo 1b: Fleur d' <i>H. sabdariffa</i> L.....	7
Photo 1c: Calices d' <i>H. sabdariffa</i> L.....	7
Photo 1d : Graines d' <i>H. sabdariffa</i> L.....	7
Photo 2 : Bikalga sec.....	22

RESUME

Le *Bikalga* est un condiment obtenu par fermentation naturelle et alcaline des graines d'oseille (*Hibiscus sabdariffa*) au Burkina Faso. La technologie de production est non standardisée et varie d'une productrice à l'autre, entraînant ainsi une instabilité de la qualité nutritionnelle et hygiénique du produit fini. Afin de sélectionner des starters de microorganismes pour une production contrôlée du *Bikalga*, 13 souches de *Bacillus* spp. ont été caractérisées par leurs propriétés antimicrobiennes, leur capacité à produire des bactériocines et des lipopeptides, leur résistance aux antibiotiques et leur capacité à survivre en condition acide et en présence de bile.

Les *Bacillus* spp. ont au préalable été différenciés grâce au séquençage du gène *gyrB* en *Bacillus subtilis* ssp. *subtilis* (six souches), *Bacillus licheniformis* (quatre souches) et *Bacillus amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* (trois souches). L'activité antimicrobienne des souches a été évaluée par des méthodes de diffusion en milieu gélosé contre une gamme variée de 40 indicateurs de microorganismes pathogènes comprenant neuf souches de *Bacillus cereus*, huit souches de *Salmonella* spp., quatre souches de *Listeria monocytogenes*, deux souches de *Micrococcus luteus*, trois souches de *Yersinia* spp., deux souches de *Shigella* spp., une souche de *Escherichia coli*, une souche de *Staphylococcus aureus*, quatre souches de *Candida* spp., deux souches de *Saccharomyces* spp. et quatre souches de *Penicillium* spp. Les résultats ont permis de sélectionner une souche de *B. subtilis* ssp. *subtilis* (H4) pouvant inhiber la croissance de bactéries pathogènes Gram-positifs et trois souches de *B. amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* (A4, I8, G3) pouvant inhiber la croissance de souches pathogènes de *Penicillium* spp. et de bactéries pathogènes Gram-positifs et gram-négatifs. A la différence de H4, les souches A4, I8 et G3 ont également été capables de produire des substances inhibitrices contre *B. cereus* en utilisant comme seul substrat pour leur croissance, un bouillon préparé à base de graines broyées d'*H. sabdariffa*.

La caractérisation de la substance antimicrobienne produite par *B. subtilis* ssp. *subtilis* H4 a montré qu'elle était sensible à l'action enzymatique de la protéase et de la trypsine, indiquant sa nature protéique. Il s'est avéré que cette protéine possède un fragment de sucre, un fragment de lipide et des ponts disulfures. Les analyses PCR ont mis en évidence les gènes de biosynthèse des bactériocines subtilosine et subtiline, ainsi que des lipopeptides surfactine et plipastatine dans le génome de H4. La Chromatographie Liquide à Haute Performance-

Spectrométrie de Masse (HPLC-MS) a permis d'identifier des surfactines et une protéine de masse monoisotopique de 3346,59 Da, différent de la masse molaire de la subtilosine et de la subtiline. Ce résultat, en plus des caractéristiques de cette bactériocine montre que H4 pourrait produire une nouvelle bactériocine.

Les caractéristiques de la substance antimicrobienne produite par les *B. amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* étaient par contre différentes de celle produite par *B. subtilis* ssp. *subtilis* H4. En effet, elle a été résistante à l'action de toutes les enzymes utilisées qui comprenaient la trypsine, la papaïne, la protéase, la protéinase K, la catalase, la lipase II et l' α -amylase. L'activité antimicrobienne n'était pas non plus détectable par SDS-PAGE confirmant la nature non protéique des composés produits. Les trois souches ne possédaient pas de gènes de biosynthèse de bactériocines comme H4, mais uniquement des gènes de biosynthèse de lipopeptides (iturine, bacillomycine, mycosubtiline, surfactine et fengycine), de polykétides (difficidine, macrolactine et bacillaene) et de la dipeptide bacilysine. L'analyse HPLC-MS a permis d'identifier les lipopeptides iturine, surfactine et fengycine.

Dans la présente étude, les souches de *B. amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* A4, I8, G3 étaient résistantes à seulement quatre antibiotiques (bacitracine, flavomycine, synergicide et tiamuline) des 24 antibiotiques testés pendant que *B. subtilis* ssp. *subtilis* H4 était sensible à seulement deux antibiotiques à savoir la flavomycine et la sulphaméthoxazole. Elles peuvent donc être considérées saines par rapport au risque de transfert de résistance aux antibiotiques à d'autres bactéries incluant les pathogènes. Leur bonne capacité à résister au pH acide et à la bile montre qu'elles pourraient survivre au passage du tractus gastro-intestinal.

Au regard de tous ces résultats, les souches de *B. amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* A4, I8, G3 et de *B. subtilis* ssp. *subtilis* H4 peuvent être retenues comme de potentiels candidats pour la mise au point de starters en vue d'une fermentation contrôlée et optimisée du *Bikalga*.

Mots clés : *Hibiscus sabdariffa*, Fermentation, *Bacillus* spp., starter, activité antimicrobienne, bactériocine, lipopeptide, résistance aux antibiotiques, acide, bile.

ABSTRACT

Bikalga is an alkaline fermented food condiment processed from the seeds of *Hibiscus sabdariffa* in Burkina Faso. The processing method used is not standardized and varies from one processor to another, thereby leading to product with inconsistent quality attributes. In order to select suitable starter cultures for a controlled fermentation of *Bikalga*, 13 *Bacillus* spp. were characterized regarding their antimicrobial properties, their capacity to produce bacteriocins and lipopeptides, their antimicrobial resistance profile as well as their resistance to acid and tolerance to bile.

The *Bacillus* spp. were first differentiated based on *gyrB* gene sequencing as *Bacillus subtilis* ssp. *subtilis* (six strains), *Bacillus licheniformis* (four strains) and *Bacillus amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* (three strains). Antimicrobial activity of all *Bacillus* spp. was evaluated by agar spot and agar well diffusion assays against a panel of 40 indicator organisms including nine strains of *Bacillus cereus*, eight strains of *Salmonella* spp., four strains of *Listeria monocytogenes*, two strains of *Micrococcus luteus*, three strains of *Yersinia* spp., two strains of *Shigella* spp., one strain of *Escherichia coli*, one strain of *Staphylococcus aureus*, four strains of *Candida* spp, two strains of *Saccharomyces* spp. and four strains of *Penicillium* spp. Results allowed selection of *B. subtilis* ssp. *subtilis* (H4) inhibiting growth of Gram-positive bacteria and *B. amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* A4, I8 and G3 inhibiting growth of pathogenic *Penicillium* spp. and both Gram-positive and Gram-negative pathogenic bacteria. The three *B. amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* were also able to produce antimicrobial activity against *B. cereus* using as only substrate for their growth *H. sabdariffa* grinded seeds based broth.

The characterization of the produced antimicrobial substances showed that *B. subtilis* ssp. *subtilis* H4 antimicrobial substance was sensitive to the enzymatic action of protease and trypsin, indicating its proteinaceous nature. Treatment with α -amylase and lipase II resulted in a complete loss of inhibitory activity, indicating that a sugar moiety and a lipid moiety are necessary for the activity effect. Treatment with mercapto-ethanol resulted in a significant loss, indicative of the presence of disulfide bridges. PCR detection of *yiwB*, *sboA*, *alba* and *spaS*, *etnS* genes and genes coding for surfactin and plipastatin (fengycin) indicated a potential for subtilosin, subtilin and lipopeptides production, respectively. High performance

liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS) analysis allowed identification of surfactin and a protein with a monoisotopic mass of 3346.59 Da, which is dissimilar in size to subtilosin and subtilin. This result, in addition to its characteristics indicates that the bacteriocin produced by H4 may be novel.

The characteristics of antimicrobial substances produced by the three *B.amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* were however different from those produced by H4. Indeed, they were resistant to the proteolytic enzymes trypsin, papain, protease and proteinase K, and to catalase, lipase II and α -amylase. In addition, the antimicrobial activity could not be visualized by SDS-PAGE, confirming the non-proteinaceous nature of the produced compounds. PCR results revealed that the three isolates have potential for the lipopeptides iturin, fengycin, surfactin, the polyketides difficidin, macrolactin, bacillaene and the dipeptide bacilysin production. HPLC-MS analysis of antimicrobial substance allowed identification of iturin, surfactin and fengycin.

The studied *Bacillus* spp. were also examined for their antimicrobial resistance profile, their resistance to acid and tolerance to bile. It was found that *Bacillus amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* A4, I8 and G3 were resistant to only four antimicrobials (bacitracin, flavomycin, synergid and tiamuline) of the 24 antimicrobials tested while *B. subtilis* ssp. *subtilis* H4 was resistant to only two antimicrobials (flavomycin, and sulphamethoxazol). These isolates may therefore be considered safe regarding the risk to transfer antimicrobial resistance to commensal or pathogenic bacteria. Furthermore, they survived in pH 2.5 and 0,3% bile over 4 h at 37°C indicating that they may be able to survive in the gastro-intestinal tract conditions.

Regarding all these results, *B. amyloliquefaciens* A4, I8 and G3 and *B. subtilis* H4 can be considered as potential candidates to constitute a consortium of starter cultures for the control and optimization of *Hibiscus sabdariffa* seeds fermentation into *Bikalga*.

Keywords: *Hibiscus sabdariffa*, fermentation, *Bacillus* spp., starter, antimicrobial activity, bacteriocin, lipopeptide, antimicrobial resistance, acid, bile.

INTRODUCTION GENERALE

La fermentation est l'une des plus anciennes méthodes de transformation/conservation des produits alimentaires utilisée par l'Homme. De nos jours, l'importance de la fermentation dans l'alimentation humaine se traduit par la diversité de produits fermentés développés tant au niveau des ménages que des unités artisanales et industrielles (Motarjemi, 2002). L'émergence des aliments fermentés est due non seulement à leurs avantages sur le plan conservation et sécurité sanitaire mais aussi à leurs attributs nutritionnel et sensoriel appréciés par les consommateurs. Dans la plupart des pays en développement, les aliments fermentés, obtenus essentiellement par des méthodes traditionnelles, contribuent jusqu'à plus de 60% de l'alimentation des populations (Holzapfel *et al.*, 1995).

Le Burkina Faso est un pays soudano-sahélien à vocation agricole avec une population estimée en 2006 à 14 017 262 habitants dont 46,4% vivent sous le seuil de la pauvreté (MEF, 2011). L'alimentation des populations, comme dans la plupart des régions d'Afrique de l'Ouest y est essentiellement basée sur les produits riches en amidon tels que le maïs, le sorgho, le riz, le manioc et les ignames (Dakwa, 2005). La consommation de ces aliments ne permet cependant pas de couvrir les besoins quantitatifs et qualitatifs en protéines, lipides et micronutriments. En conséquence, les malnutritions protéino-énergétiques et les carences en micronutriments demeurent des défis majeurs à relever (Nanama, 1998). En 2011 par exemple, les prévalences de la malnutrition aiguë, de l'insuffisance pondérale et de la malnutrition chronique au Burkina Faso ont été estimées respectivement à 10,5 %, 31,4 % et 28,8 % (Coulidiati, 2011). Il est donc nécessaire d'équilibrer les rations par l'apport d'aliments riches en protéines et économiquement accessibles. Il existe une grande variété d'aliments locaux qui pourraient contribuer à résoudre ces problèmes de malnutrition. C'est le cas des protéines végétales traditionnellement fermentées pour produire des condiments utilisables dans l'alimentation en raison de leur haute valeur nutritive et de leurs propriétés organoleptiques.

Au Burkina Faso, le plus connu de ces condiments fermentés est sans contexte le *Soumbala*, obtenu par une fermentation naturelle des graines de néré (*Parkia biglobosa*). A côté du *Soumbala*, il existe d'autres condiments traditionnels fermentés tous aussi riches en protéines tels que le *Bikalga* (graines d'oseille fermentées) et le *Maari* (graines de baobab fermentées). Le *Bikalga* (nom mooré) ou

Dâtou (nom Dioula), obtenu par une fermentation naturelle des graines d'oseille (*Hibiscus sabdariffa*), est le second condiment traditionnel le plus consommé au Burkina Faso. Il est très utilisé pour rehausser le goût des sauces et pour améliorer la qualité nutritionnelle des repas pauvres en protéines (Bengaly, 2001). Cet aliment est également connu dans d'autres pays africains sous diverses appellations telles que *Mbuja* au Cameroun, *Furundu* au Soudan, *Datou* au Mali et *Dawadawa bosto* au Niger (Yagoub *et al.*, 2004) où il est utilisé dans la préparation des mets. Au Bénin, par contre deux produits issus de la fermentation naturelle des graines d'*H. sabdariffa* nommés *Yanyanku* et *Ikpiru* sont utilisés comme additifs traditionnels dans la fermentation des graines de néré (Agbobatinkpo *et al.*, 2011).

Le *Bikalga* est une source importante de protéines (26-37%), de lipides (17-24%), de glucides (13-22%) et de sels minéraux (5-13%) (Bengaly, 2001 ; Yagoub *et al.*, 2004 ; Parkouda *et al.*, 2008). Les protéines du *Bikalga* renferment tous les acides aminés reconnus essentiels par la FAO (Bengaly, 2001 ; Yagoub et Mohamed 2008). Selon une étude menée par Bengaly *et al.* (2006), le *Bikalga* pourrait être un bon candidat pour l'enrichissement des régimes alimentaires en fer et en zinc. Certaines ethnies au Burkina Faso utilisent le *Bikalga* pour soigner l'hypertension artérielle, la diarrhée, les plaies, etc (Parkouda *et al.*, 2008). Les principales étapes de la production du *Bikalga* comprennent un nettoyage des graines, une cuisson en milieu alcalin et généralement deux phases de fermentation naturelle (Parkouda *et al.*, 2008). L'étude de la microbiologie du *Bikalga* a montré que *Bacillus subtilis* et *Bacillus licheniformis* étaient les microorganismes prédominants (Ouoba *et al.*, 2008).

Malgré sa grande valeur nutritive, la production du *Bikalga*, comme celle du *Soumbala* et du *Maari* reste artisanale avec des équipements rudimentaires et une fermentation incontrôlée. Ceci a pour conséquence, une variation de la stabilité et de la qualité des produits finis, rendant de ce fait ces condiments peu compétitifs vis-à-vis des condiments importés, d'où la nécessité d'améliorer les techniques de production. Un des facteurs importants de cette amélioration est le développement et l'utilisation de starters de microorganismes bien identifiés et bien définis pour une fermentation contrôlée (Holzapfel, 1997 ; Achi, 2005). Dans cette perspective, des travaux antérieurs ont proposé des cultures starters de *Bacillus* spp. pour une

fermentation contrôlée du *Soumbala* (Ouoba, 2003) et du *Maari* (Kaboré, 2012). Cependant, aucun travail de recherche ne s'est jusqu'à présent intéressé à l'amélioration de la qualité du *Bikalga* qui pourtant est le second condiment traditionnel le plus consommé au Burkina Faso. C'est dans ce contexte que la présente étude a été entreprise afin de caractériser les souches dominantes de *Bacillus* spp. isolées du *Bikalga* en vue de la mise au point de cultures starters pour une production contrôlée.

Plus spécifiquement, les objectifs suivants ont été fixés :

- Examiner les propriétés antimicrobiennes des souches dominantes de *Bacillus* spp. isolées du *Bikalga* ;
- Isoler, caractériser et identifier les composés antimicrobiens produits ;
- Déterminer la résistance des souches dominantes de *Bacillus* spp. du *Bikalga* aux antibiotiques ainsi que l'effet de l'acide et de la bile sur ces bactéries.
- Capitaliser les connaissances sur les microorganismes responsables de la fermentation des graines d'oseille ;
- Sélectionner des souches de *Bacillus* spp. pouvant être utilisées comme cultures starters pour une fermentation contrôlée du *Bikalga*.

Le présent document est subdivisé en trois chapitres. Le premier chapitre aborde la synthèse bibliographique. Les aspects méthodologiques sont traités dans le second chapitre tandis que le troisième chapitre présente les résultats obtenus et leur discussion.

CHAPITRE I: SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1 Description botanique de la plante d'*Hibiscus sabdariffa* L.

Hibiscus sabdariffa L. est une plante herbacée annuelle appartenant à la famille des *Malvaceae*. Elle est largement distribuée dans les zones tropicales et subtropicales et est connue sous divers noms en français : oseille de Guinée, oseille rouge, thé rose d'Abyssinie, karkadé ou carcadé, roselle ou bissap. Au Burkina Faso, cette plante est abusivement appelée oseille en français. En mooré on l'appelle *bidgo* (singulier) ou *bito* (pluriel) et en dioula *dâ* ou *dâkumu* (Abu-Tarboush *et al.*, 1997 ; Morton, 1987; Nacoulma-Ouédraogo, 1996). *Hibiscus sabdariffa* est également présent dans d'autres pays tels que l'Inde, la Malaisie, la Thaïlande, l'Arabie Saoudite, le Nigeria, la Tanzanie, la Jamaïque, etc où il est connu sous diverses appellations (Endrias, 2006). Plus de 500 espèces d'*Hibiscus* sont connues dans le monde. La majorité des variétés sont utilisées comme plantes ornementales à l'exception de l'espèce *H. sabdariffa* dont deux variétés ont été identifiées : *Hibiscus sabdariffa* variété *altissima* et *H. sabdariffa* variété *sabdariffa* L. (Kerharo et Adams 1974; Morton, 1987). McClintock (2004) a distingué ces deux variétés d'*H. sabdariffa* en variété blanche et variété rouge.

Hibiscus sabdariffa L. est décrit comme une plante qui peut atteindre 1 à 2 m de haut et plus suivant les types de l'espèce et les modes de culture (Photo 1a). Sa tige robuste est verte ou rouge, glabre ou hispide selon les variétés. Elle porte des feuilles alternes dont le limbe présente un polymorphisme relatif ; il est généralement trilobé et denté. Les fleurs (Photo 1b), réparties le long de la tige ont de 7 à 10 cm de diamètre ; elles sont axillaires de couleur jaune-crème possédant une corolle à cinq pétales et un calice (photo 1c) à cinq sépales qui prennent la couleur de la tige.

A maturité, le fruit capsulaire entouré par le calice persistant devenu charnu, renferme des graines à deux cotylédons limitées par un tégument pectino-cellulosique résistant (Fortin *et al.*, 1997 ; Kerharo et Adams, 1974). Les graines sont ovoïdes et de teinte brune (Photo 1d). A partir d'un échantillon de 1000 graines, il a été mesuré que la graine d' *H. sabdariffa* avait un diamètre moyen principal de 5,6 mm, un diamètre intermédiaire de 5,2 mm et minimal de 2,8 mm (Omobuwajo *et al.*, 2000).

Au Burkina Faso la plante d'*H. sabdariffa* est communément cultivée en bordure des champs de brousse et dans les champs autour des habitations. Elle est également

exploitée en culture maraîchère. Les variétés blanche et rouge sont les plus emblavées et leur culture est essentiellement réalisée pour la fourniture de légumes-condiments.



Photo 1 : Plante d'*H. sabdariffa*. (a) : Aspect général du plant variété rouge, (b) : fleur, (c) : calices, (d) : graines (Compaoré C.S)

Hibiscus sabdariffa est emblavé en cultures pluviales et de contre saison. L'utilisation de ses graines dans la préparation du *Bikalga* constitue un grand avantage en termes de disponibilité de la matière première. Ses graines sont plus disponibles que celles du néré (*Parkia biglobosa*). Ces dernières étant des produits de cueillette, il se pose de plus en plus un problème de disponibilité déterminé par divers facteurs dont le vieillissement des arbres producteurs, qui en plus ont un long cycle de développement (Ferre et Muchnik, 1992).

1.2 Composition et principales utilisations

1.2.1 Composition biochimique

1.2.1.1 Composition des graines

Les graines d'*H. sabdariffa* sont protégées par un tégument pectino-cellulosique épais limitant les échanges. Cela explique en partie leur faible teneur en eau (7-12%). Elles sont principalement constituées de protéines (22-33%), de lipides (20%) et de 25-30% de glucides (El-Adawy et Khalil, 1994; Hainida *et al.*, 2008; Parkouda *et al.*, 2008). La teneur en protéine des graines d'*H. sabdariffa* est très proche de celles de l'okra (*Hibiscus esculentus*) et de l'huile de coton (*Gossypium sp*) selon Çaliçir *et al.* (2005). Elles constituent donc une source potentielle de protéines pour l'alimentation humaine.

La concentration totale en acides aminés essentiels de la référence protéique de la FAO est de 36 g 100 g⁻¹, alors qu'elle est de 39,5 g 100 g⁻¹ de protéine pour les graines d'oseille. Les acides aminés essentiels et majoritaires des graines sont les acides glutamique, aspartique, la phenylalanine, la leucine et l'arginine (Al-Wandawi *et al.*, 1984; El-adawy et Khalil, 1994; Hainida *et al.*, 2008). Selon le modèle de référence de la FAO (FAO/WHO, 1991) et la plupart des auteurs (Al-Wandawi *et al.*, 1984; El-Adawy *et al.*, 1994; Pu, 1996; Hainida *et al.*, 2008), les acides aminés limitant seraient la valine, l'isoleucine, la méthionine et le tryptophane, tandis que tous les acides aminés soufrés ne le seraient pas. La teneur en lysine des graines est identique à celle de la protéine de référence de la FAO. Ces protéines pourraient donc être utilisées pour équilibrer les régimes alimentaires pauvres en lysine comme ceux basés sur le maïs (Nanaman, 1998; Nanaman *et al.*, 1999). C'est le cas du tô de maïs qui constitue l'aliment de base de certaines régions du Burkina (Nanama, 1998).

Avec une teneur moyenne de 20%, la graine d'*H. sabdariffa* présente une richesse en huile proche de celles d'autres graines comme celles de la tomate (Lazos *et al.*, 1998) ou celles des graines de baobab (Diop *et al.*, 2005). En plus donc de leur bonne valeur protéique, ces graines représentent une source potentielle de lipides pour l'alimentation humaine (Pu, 1996). L'huile brute des graines contient plus de 70% d'acides gras insaturés. L'acide linoléique est le plus abondant (39%) suivi de l'acide oléique à une concentration de 31%. L'acide palmitique (21%) et l'acide stéarique (6%) sont les acides gras saturés les plus abondants. Les propriétés physico-chimiques de l'huile brute révèlent que l'huile a un indice de saponification

élevé mais un indice d'iode faible (Abu-Tarboush *et al.*, 1997; Mohamed *et al.*, 2007). L'huile des graines d'oseille a une teneur importante en tocophérol (2000 mg/kg en moyenne) comprenant la gamma-tocopherol (74,5%), l'alpha-tocophérol (25%) et le delta-tocophérol (0,5%) et constitue ainsi une bonne source d'antioxydants liposolubles (Mohamed *et al.*, 2007). Le tableau I donne la composition en acides aminés et en acides gras des graines d'*H. sabdariffa*.

Tableau I : Composition en acides aminés et en acides gras des graines d'*H. sabdariffa* (Al-Wandawi *et al.*, 1984 ; El-Adawy et Khalil, 1994 ; Abu-Tarboush *et al.*, 1997)

Acides aminés (mg/g)		Acides gras (%)	
Alanine	4,37	Myristique	0,31
Acide aspartique	10,64	Palmitique	21,65
Arginine	10,58	Palmitoléique	0,44
Cystine	2,65	Stéarique	5,47
Acide glutamique	22,47	Oléique	30,90
Glycine	4,69	Linoléique	39,16
Histidine*	2,35	γ-linolénique	0,57
Isoleucine*	3,25	Arachidique	0,72
Leucine*	6,80	Eicosénoïque	0,08
Lysine*	5,51	Eicosatriénoïque	0,34
Méthionine*	1,25	Behénique	0,37
Phénylalanine*	5,18		
Proline	3,72		
Sérine	4,48		
Thréonine*	3,80		
Tryptophane	0,51		
Tyrosine*	3,46		
Valine*	3,57		

* : Acides aminés essentiels

Source: Cissé *et al.* (2009)

Les graines d'*H. sabdariffa* ont des teneurs moyennes en glucides de 30%. Pu les a estimés entre 39,5 et 42,6% en incluant les insolubles (Pu, 1996). Ces teneurs sont plus élevées que celle des graines de *Parkia biglobosa* (12%) (Laokole, 1994; Odunfa, 1985). Elles sont proches de celles relevées dans le soja (*Glycine max*) (32%) (Gauthier *et al.*, 1996). Le sucrose et l'amidon sont les sucres dominants; ils

représentent à eux deux près de 90% des sucres, fibres exclus. Les graines d'*H. sabdariffa* se caractérisent par une forte teneur en fibres. Elles renferment environ 12% de cellulose et l'insoluble formique (cellulose + lignine) avoisine le seuil de 23% (El-Adawy et Khalil, 1994; Pu, 1996).

Les concentrations de sels minéraux des graines d'oseille sont de l'ordre de 7 à 12% (El-Adawy et Khalil, 1994; Bengaly, 2001). Le potassium est l'élément minéral dominant avec des concentrations de l'ordre de 23 g/100g de cendres brutes. Ensuite viennent le sodium (11 g/100 g), le magnésium (8 g/ 100 g) et le calcium (7 g/ 100 g). Le manganèse (0,07 g/100 g), le fer (0,14 g/ 100 g) et le zinc (0,07 g/ 100 g) sont présents en faible quantité et seules des traces de cuivre ont été relevées (El-Adawy et Khalil, 1994; Pu, 1996; Bengaly, 2001). Au regard de cette composition en sels minéraux, certains auteurs ont préconisé son utilisation comme complément des farines boulangères en éléments minéraux notamment en calcium (El-Adawy et Khalil, 1994).

La graine d'*H. sabdariffa* contient plus de 25 composés volatiles dont des hydrocarbures, des alcools et des aldéhydes (Jirovetz et al., 1992). Ces composés sont importants pour l'arôme de l'huile dont la typicité peut être mise à profit en cuisine.

1.2.1.2 Composition des autres parties de la plante

Les feuilles d'*H. sabdariffa* contiennent une quantité non négligeable de protéines comparables au standard de l'OMS (Sena et al., 1998). Sena et ses collaborateurs (1998) ont également mentionné que les feuilles d'*Hibiscus* pourraient constituer potentiellement une bonne source de fer, calcium, magnésium et zinc. Elles contiennent également des acides organiques (acide ascorbique, tartrique, citrique, malique, oxalique...), des alcaloïdes, des triterpènes, des saponosides et du mucilage (Fortin et al., 1997; Kerharo et Adams 1974). Ces feuilles constituent une bonne source de nutriments, c'est pourquoi elles entrent dans l'alimentation des populations des pays producteurs (Diouf et al., 2007; Kahane et al., 2005).

Les fleurs d'*H. sabdariffa* renferment de l'acide hibiscique, des flavonoïdes (gossypétine, hibiscétine, sabdarétine), des hétérosides (gossytrine, hibistrine,

hibiscine), de la phytostérolène et de la cire (Fortin *et al.*, 1997; Kerharo et Adams 1974).

Les calices d'*H. sabdariffa* constituent la partie la plus importante de la plante du point de vue économique dont la composition varie suivant la variété, la zone géographique de production, le climat, les conditions de culture, etc. Ils sont riches en acides organiques dont les acides succinique, ascorbique, oxalique, tartrique et malique (Daffallah et Al-Mustafa 1996; Wong *et al.*, 2002). Les sucres présents dans les calices sont constitués de glucose (sucre majoritaire), fructose et saccharose (Wong *et al.*, 2002). L'élément minéral dominant dans les calices est le calcium. Les calices d'*H. sabdariffa* contiennent également des mucilages, des pectines, ainsi que tous les acides aminés essentiels (El-Adawy et Khalil, 1994; Tsai, 1995). L'une des caractéristiques d'*H. sabdariffa* est également sa richesse en anthocyanes (calices rouges) dont la teneur peut atteindre 1,5 g. kg⁻¹ de calices secs, teneur comparable à la mûre et supérieure à la plupart des autres végétaux comestibles (Mazza et Miniati, 2000). L'activité antioxydante des anthocyanes confère aux boissons à base d'*H. sabdariffa* des propriétés antioxydantes intéressantes (Tsai *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2000). Les calices d'*H. sabdariffa* renferment également les vitamines B1, B2, B3, C et D (Fortin *et al.*, 1997).

1.2.2 Principales utilisations de la plante d'*Hibiscus sabdariffa*

1.2.2.1 Utilisations alimentaires

Les graines d'*H. sabdariffa* sont riches en protéines et sont essentiellement utilisées pour la fabrication de condiments traditionnels par cuisson puis fermentation. Au Burkina Faso, l'utilisation la plus commune des graines est la préparation du *Bikalga*. Au Bénin, le *Yanyanku* et l'*Ikpiru* sont deux produits obtenus par cuisson puis fermentation des graines d'*H. sabdariffa* et qui sont utilisés comme additifs fonctionnels dans la fermentation des graines de *Parkia biglobosa* pour produire respectivement le *Sonru* et l'*Iru* qui sont des condiments très populaires (Azokpota *et al.*, 2006; Agbobatinkpo *et al.*, 2011). Au Nord du Nigeria, les graines d'oseille sont fermentées en présence de quelques épices pour préparer un condiment connu sous le nom de *Mungza ntusa* (Omobuwajo *et al.*, 2000). Au Soudan, elles sont utilisées pour élaborer un produit de remplacement de la viande appelé viande

d'oseille, le *Furundu*, qui est traditionnellement préparé en faisant fermenter pendant 9 jours les graines préalablement cuites (Yagoub *et al.*, 2004). L'huile des graines est traditionnellement utilisée en cuisine au Tchad, en Tanzanie et en Chine (McClintock et El Tahir, 2004).

Les feuilles d'oseille sont très utilisées dans la cuisine traditionnelle africaine. Elles sont particulièrement appréciées pour leur goût acidulé lié à la présence de nombreux acides organiques (Fortin *et al.*, 1997). Au Burkina Faso, au Niger et au Mali, elles sont bouillies pour fabriquer des sauces accompagnant différents plats à base de céréales et de tubercules (McClintock et El Tahir, 2004; Sarni-Manchad et Cheynier, 2006; Sena *et al.*, 1998). Au Sénégal, ces feuilles sont utilisées pour préparer une sauce aigre, épaisse, appelée *békéj*, servie avec le riz et le poisson. Au Burkina Faso, la culture en contre-saison d'*H. sabdariffa* dans les jardins maraîchers est essentiellement destinée à la fourniture des feuilles utilisées comme légumes-condiments des sauces.

Les calices du fruit sont utilisés dans la préparation de boissons désaltérantes et tonifiantes sans alcool (jus, thé, sirop, ...), de vin, de confiture, de gelée, de desserts, (Abu-Tarboush *et al.*, 1997; McClintock et El Tahir, 2004; Mounigan et Badrie, 2007). Les extraits de calices sous forme de filtrat concentré ou de poudre séchée sont utilisés comme colorant naturel dans les industries alimentaires (pâtisserie, jus de fruits, boissons, etc.) et pharmaceutiques (Endrias, 2006).

1.2.2.2 Utilisations médicinales

L'espèce *H. sabdariffa* a de nombreuses propriétés thérapeutiques. Elle est utilisée dans la plupart des médecines traditionnelles aussi bien dans les pays du Sud que dans les pays du Nord (Cissé *et al.*, 2009). En médecine traditionnelle chinoise, les calices rouges d'*H. sabdariffa* sont utilisés sous forme d'infusion dans le traitement de l'hypertension. Plusieurs études ont mis en évidence que la consommation d'extrait d'*H. sabdariffa* diminuerait de manière significative la tension artérielle chez des sujets hypertendus (Farji et Tarkhani, 1999; Haji et Haji, 1999; Hirunpanich *et al.*, 2006). L'extrait des calices d'hibiscus est considéré comme angioprotecteur par sa teneur en anthocyanosidols. L' α -tocophérol, présent en quantité importante dans

l'huile d'hibiscus, possède une activité vitaminique E qui lui confère des propriétés antioxydantes bénéfiques pour la santé. Ces molécules jouent un rôle dans la prévention contre les maladies cardiovasculaires, et particulièrement l'athérosclérose (Leger, 2000). L'extrait d'hibiscus est également utilisé pour lutter contre les maladies cardiovasculaires et hépatiques (Ali *et al.*, 2003; Christiana *et al.*, 2006) et pour soigner l'anémie (Falade *et al.*, 2005). Il possède une activité anti-spasmodique, antimicrobienne et antifongique (D'Heureux-Calix et Badrie, 2004; Palé *et al.*, 2004). Les calices en décoction sont utilisés comme diurétiques et antiseptiques.

Les préparations à base de feuilles sont utilisées pour soigner les plaies et les ulcères (Kerharo et Adams, 1974; Nacoulma/Ouédraogo, 1996). L'extrait de feuilles d'hibiscus posséderait aussi un fort pouvoir antioxydant qui permettrait la dégradation du cholestérol LDL (Chen *et al.*, 2005) et pourrait donc être utile dans la prévention des maladies cardiovasculaires.

1.3 Fermentation alimentaire

La préparation et la consommation des aliments fermentés datent depuis la période de la préhistoire. En effet, des méthodes de fermentation du lait, de la viande, du poisson, des légumes et des céréales ont été décrites depuis des civilisations et les écrits les plus récents apparus au Moyen Orient, datent de 6000 ans avant Jésus Christ (Blandino *et al.*, 2003).

La fermentation résulte de l'activité microbienne, laquelle a une grande incidence d'une part sur la qualité intrinsèque de la denrée alimentaire qui peut être améliorée ou altérée et d'autre part sur sa qualité sanitaire et sa durée de conservation. Ainsi, Steinkraus (1996) définissait les produits fermentés comme des substrats alimentaires envahis par des microorganismes comestibles dont les enzymes caractéristiques transforment les macromolécules en métabolites non toxiques avec l'apparition de saveurs, d'arômes et de textures agréables et attrayants pour la consommation humaine. Par contre, si les produits issus de l'action enzymatique des microorganismes dégagent des odeurs désagréables, indésirables ou des saveurs non attrayants, ou si ces produits sont toxiques ou sont à l'origine de maladies, ils sont alors dits altérés ou pourris. Diverses fermentations sont mises en œuvre dans le domaine alimentaire et les principales sont :

-la fermentation alcoolique par l'action des levures dans le cas des vins, bières modernes, bières traditionnelles ;

-la fermentation lactique avec les bactéries lactiques comme principaux microorganismes, qui concerne les produits laitiers, les produits à base de céréales, les produits végétaux ;

-la fermentation acétique par des bactéries du genre *Acetobacter* pour la production du vinaigre ;

-la fermentation alcaline résultant de la production de peptides, d'acides aminés et d'ammoniac par des bactéries du genre *Bacillus* dans le cas des poissons et des graines légumineuses.

De nombreux effets bénéfiques sont attribués à la fermentation de manière générale et à la fermentation alcaline en particulier. Ce sont entre autres : l'enrichissement des aliments en nutriments essentiels, la sécurité sanitaire des aliments, l'augmentation de la durée de conservation, l'amélioration de la digestibilité et de la comestibilité, l'amélioration des caractéristiques organoleptiques, la réduction de la durée de cuisson (Odunfa et Oyewole, 1998 ; Ouoba, 2003).

1.4 Fermentation traditionnelle alcaline en Afrique

La fermentation alcaline est définie comme un procédé de fermentation durant lequel le pH du substrat augmente jusqu'à des valeurs alcalines pouvant atteindre 9 (Omafuvbe *et al.*, 2000). Cette augmentation du pH est due à la dégradation des protéines en peptides, acides aminés et ammoniac grâce à l'action des microorganismes fermentaires (Kiers *et al.*, 2000) ou au traitement alcalin subit par le substrat pendant la préparation (Wang et Fun, 1996).

Dans la plus part des pays africains, les condiments issus de la fermentation alcaline de graines riches en protéines sont communs et constituent une part importante de l'alimentation (Dakwa *et al.*, 2005 ; Odunfa, 1998). Ils sont qualifiés d'aliments indigènes ou traditionnels dû au fait que leur préparation date des temps préhistoriques. En raison de leur haute valeur nutritive et de leurs propriétés organoleptiques, ils sont largement utilisés dans la préparation de plusieurs mets (Odunfa et Oyewole, 1998).

Généralement, les graines sont naturellement fermentées par les microorganismes de l'environnement de production. Les microorganismes responsables de cette fermentation sont des bactéries du genre *Bacillus* principalement *Bacillus subtilis* (Odunfa, 1981; Parkouda *et al.*, 2010).

Les produits de la fermentation alcaline peuvent être considérés comme des substituts de protéines de viande puisqu'ils contiennent des acides aminés semblables à ceux de la viande une fois digérés dans le tractus intestinal (Streinkraus *et al.*, 1986). Dans beaucoup de pays africains, la malnutrition due au déficit de protéines est un problème majeur. Les protéines végétales fermentées offrent donc de grandes possibilités intéressantes en tant que sources principales de protéines et en tant que suppléments alimentaires (Odunfa et Oyewole, 1998). Ils peuvent ainsi aider à l'élimination de la malnutrition et d'autres insuffisances alimentaires dans les pays en voie de développement. C'est ce qui explique l'intérêt scientifique accru pour ces produits ces dernières années.

1.5 Condiments fermentés alcalins d'Afrique et principaux microorganismes associés

En Afrique, les condiments fermentés alcalins sont généralement préparés à partir de graines d'arbres sauvages (*Parkia biglobosa*, *Prosopis africana*, *Adansonia digitata*, ...) ou de graines de plantes cultivées (*Hibiscus sabdariffa*, *Glycine max*, *citrullus vulgaris*...). Ces condiments, obtenus par une fermentation naturelle sont connus sous diverses appellations selon les régions (Tableau II). Il a été rapporté que les *Bacillus* spp. sont les principaux microorganismes impliqués dans la fermentation de ces graines (Tableau II). Outre le genre *Bacillus* spp., le genre *Staphylococcus* spp., *Micrococcus* spp., des bactéries lactiques, etc ont été identifiés dans les condiments fermentés alcalins d'Afrique (Ndir *et al.*, 1997 ; Azokpota *et al.*, 2006 ; Mohamadou *et al.*, 2007 ; Parkouda *et al.*, 2010).

Au Burkina Faso, les plus populaires de ces condiments sont le *Soumbala* (graines fermentées de *Parkia biglobosa*), le *Bikalga* (graines fermentées d'*Hibiscus sabdariffa*) et le *Maari* (graines fermentées d'*Adansonia digitata*). La biodiversité microbienne de ces condiments a été étudiée et il est ressortit que les principaux germes identifiés dans le *Soumbala* étaient *B. subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus cereus* et *Brevibacillus bortilensis* avec *B. subtilis* et *B. pumilus* étant les germes majoritaires (Ouoba *et al.*, 2004). Quant au *Bikalga*, les travaux de Ouoba *et al.*

(2008) ont montré que sa fermentation était dominée par *B. subtilis* et *B. licheniformis*. Les autres genres de *Bacillus* identifiés dans le *Bikalga* étaient *B. pumilus*, *Bacillus badius*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus fusiformis*, *B. hortilensis*. Les travaux de Bengaly (2001) ont rapporté qu'en plus du genre *Bacillus* spp., le genre *Staphylococci* était présent dans le *Bikalga*. L'étude sur la microbiologie du *Maari* (Parkouda *et al.*, 2010) a montré que la fermentation des graines de baobab était initiée par les bactéries aérobies mésophiles (BAM) identifiées comme *B. subtilis* (82% des BAM) et *Staphylococcus sciuri* (18% des BAM). Des bactéries lactiques apparaissaient après 24 h de fermentation et demeuraient jusqu'à la fin de la fermentation avec comme espèce prédominante *Enterococcus faecium*. Les microorganismes secondaires identifiées dans le *Maari* étaient constitués de *B. pumilus*, *B. licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus circulans*, *B. cereus*, *Lysinibacillus sphaericus*, *Staphylococcus gallinarum*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Enterococcus casseliflavus*, *Pediococcus acidilacti* et *Corynebacterium* sp. (Parkouda *et al.*, 2010).

Tableau II: Exemples de condiments fermentés africains et les principaux microorganismes impliqués

Matière première	Nom	Pays/régions	Principaux microorganismes	Références
Graines de néré (<i>Parkia biglobosa</i>)	<i>Soumbala</i>	Burkina Faso	<i>B. subtilis</i> , <i>B. pumilus</i>	Ouoba <i>et al.</i> , 2004; Sarkar <i>et al.</i> , 2002
	<i>Dawadawa</i> (Iru)	Nigeria	<i>B. subtilis</i>	Jideani et Okeke, 1991; Sanni <i>et al.</i> , 2000
	<i>Afitin</i> , <i>Iru</i> , <i>Sonru</i>	Benin	<i>B. subtilis</i> , <i>B. licheniformis</i> ,	Azokpota <i>et al.</i> , 2007
	<i>Netetu</i>	Senegal	<i>B. licheniformis</i> , <i>B. coagulans</i> , <i>B. subtilis</i>	Ndir <i>et al.</i> , 1994; Ndir <i>et al.</i> , 1997
Graines d'oseille (<i>Hibiscus sabdariffa</i>)	<i>Bikalga</i>	Burkina Faso	<i>B. subtilis</i> , <i>B. licheniformis</i>	Ouoba <i>et al.</i> , 2008
	<i>Furundu</i>	Soudan	<i>Bacillus</i> spp., Yeast and Mould	Yagoub et Mohamed., 2008
	<i>Mbuja</i>	Cameroun	<i>Bacillus</i> spp., bactéries lactiques	Mohamadou <i>et al.</i> , 2007; 2008
Graines de baobab (<i>Adansonia digitata</i>)	<i>Maari</i>	Burkina Faso	<i>B. subtilis</i> , <i>Staphylococcus sciuri</i> , <i>Enterococcus faecium</i>	Parkouda <i>et al.</i> , 2010
Graines de soja (<i>Glycine max</i>)	<i>Soy-dawadawa</i>	Ghana	<i>B. subtilis</i>	Dakwa <i>et al.</i> , 2005
	<i>Soyadawadawa</i>	Nigeria	<i>B. subtilis</i>	Jideani et Okeke, 1991; Dike et Odunfa, 2003
<i>Prosopis africana</i>	<i>Okpehe</i>	Nigeria	<i>B. subtilis</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>B. pumilus</i>	Oguntoyinbo <i>et al.</i> , 2007
Graines de <i>Pentaclethra macrophyla</i>	<i>Ugba</i>	Nigeria	<i>B. subtilis</i>	(Sanni <i>et al.</i> , 2000)
Graines de <i>Ricinus communis</i>	<i>Ogiri</i>	Nigeria	<i>B. subtilis</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>B. metaterium</i>	Jideani et Okeke, 1991
Graines de coton (<i>Gossypium hirsutum</i> L.)	<i>Owoh</i>	Nigeria	<i>B. subtilis</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>B. pumilus</i> , <i>Staphylococcus</i> sp.	Sanni et Ogbonna, 1991

1.6 Le Bikalga

Le *Bikalga* (nom moaga) est un condiment traditionnel obtenu par fermentation naturelle des graines d'*H. sabdariffa*. Il est connu au Burkina Faso sous divers noms vernaculaires : *Dâtou* en dafing, *Ganyiri-Kôlo* en bissa, et *Kiri-Tiin* en samo. Il est consommé dans d'autres pays africains dont le Niger, le Mali, le Cameroun et le Soudan où il est connu sous diverses appellations telles que *Mbuja* au Cameroun, *Furundu* au Soudan, *Datou* au Mali et *Dawadawa bosto* au Niger.

1.6.1 Méthode de production

Suivant les régions du Burkina Faso, en particulier les ethnies, les techniques traditionnelles de préparation du *Bikalga* présentent des variations plus ou moins notables (Bengaly, 2001). Mais de manière générale, on distingue les étapes ci-dessous (Figure 1) :

-Le prétraitement (nettoyage) des graines : les graines d'*H. sabdariffa* sont manuellement triées pour enlever les cailloux et les diverses impuretés. Ensuite elles sont décortiquées par pilage au mortier-pilon ; Ce pilage permet d'éliminer l'enveloppe externe laissant apparaître des téguments luisants. Le son et les impuretés légères (glumes, résidus de paille...) sont alors éliminés par vannage. Les graines pilées subissent 2 à 3 lavages successifs à l'eau au cours de laquelle les meilleures graines sont sélectionnées par gravimétrie. Les graines perforées ou immatures qui surnagent sont éliminées avec les autres impuretés légères pendant que les cailloux qui sédimentent sont également éliminés (Bengaly, 2001; Parkouda *et al.*, 2008).

-La cuisson des graines: les graines nettoyées sont cuites à l'eau pendant 12-24 heures en fonction de l'intensité du feu (tiges de mil ou fagots de bois) (Parkouda *et al.*, 2008). La durée de la cuisson est également dépendante de l'état de maturité des graines et de leur durée de conservation (Bengaly, 2001). Dans le procédé décrit par Bengaly (2001), les graines d'*H. sabdariffa* sont cuites pendant une période de 10-12 h. Les graines sont cuites lorsqu'elles se laissent écraser facilement entre deux doigts. D'autres critères tels que l'odeur, la couleur ou la

présence de graines éclatées sont également utilisés (Bengaly, 2001 ; Parkouda *et al.*, 2008).

De la potasse traditionnelle (lyxifiats de cendre) est très fréquemment ajoutée aux graines pendant la cuisson. Ce produit alcalinisant est obtenu à partir de la cendre de tiges de millet par des techniques traditionnelles. Selon les productrices son ajout a pour but d'accélérer la cuisson. Ces observations peuvent se justifier par l'effet des pH extrêmes sur les polymères organiques. En effet, les propriétés alcalinisantes de la potasse sont utilisées pour hâter la libération de substances mucilagineuses, hydrolyser les saponosides, alcaloïdes et autres hétérosides contenus dans les légumes et les graines (The Merck Index, 1996). L'hydrolyse des polysaccharides peut entraîner une solubilisation partielle qui accélère la cuisson comme l'a montré Martin-Cabrejas et ses collaborateurs sur les graines de *Phaseolus vulgaris* (Martin-Cabrejas *et al.*, 1999). Selon les travaux de Bengaly (2001), le relèvement des teneurs en sels minéraux en particulier des teneurs en potassium dans le *Bikalga* est essentiellement lié à l'ajout de potasse traditionnelle.

Le traitement thermique que les graines d'oseille subissent peut provoquer divers types de transformations des nutriments. En effet la cuisson à l'eau entraîne l'hydrolyse des liaisons osidiques, des di et polysaccharides des glucides (Ekpenyong et Borchers, 1980). Cette hydrolyse est favorisée en milieu alcalin. Les traitements thermiques entraînent aussi la dénaturation des macromolécules protéiques. Cette dénaturation est liée à la destruction de la configuration native des protéines. Par cette dénaturation, les cuissons augmentent la valeur nutritive des aliments (Fagbemi *et al.*, 2005; Giami, 2005). Les inhibiteurs tryptiques sont également inactivés par la chaleur, ce qui augmente la digestibilité des protéines (Ekpenyong et Borchers, 1980; El-adawy, 2002). La cuisson favorise également l'absorption d'eau. Ce phénomène est influencé par l'hydroscopicité des protéines (Pilosof *et al.*, 1982). Les coques des graines sont ainsi ramollies par l'hydratation créant de ce fait des conditions favorables à l'action des enzymes microbiennes. Les lipides et les sels minéraux peuvent également subir des transformations lors de la cuisson en milieu alcalin.

La cuisson à l'eau pourrait donc contribuer à augmenter la qualité nutritionnelle des graines d'oseille et à les rendre plus aptes à la consommation humaine en réduisant les teneurs en facteurs antinutritionnels (polyphénols et phytates) et en augmentant

la digestibilité des protéines (El-Adawy, 2002; Fagbemi *et al.*, 2005; Giami, 2005; Yagoub *et al.*, 2004). Cette étape de cuisson pourrait aussi contribuer à sélectionner les microorganismes thermorésistants tels que les spores de *Bacillus spp.* (Azokpota *et al.*, 2006; Ouoba *et al.*, 2008).

-La fermentation: les graines cuites sont essorées et mises à fermenter dans un récipient fermé (canaris, paniers et autres plats). Certaines préparatrices placent des feuilles de *Lannea microcarpa* au fond du récipient. Ces feuilles pourraient limiter la déshydratation et assurer une oxygénation du substrat au cours de la phase initiale de la fermentation (Bengaly, 2001).

La fermentation est effectuée en une ou deux phases selon la productrice. Dans le premier cas, les graines sont fermentées pendant 3 à 4 jours et sa bonne conduite est estimée par la forte odeur complexe de type ammoniacale qui se dégage à la fin du processus. Les graines fermentées sont alors broyées par pilage au mortier-pilon et cuites à la vapeur sous forme de boules.

Cependant pour plusieurs productrices, la fermentation se fait en deux phases: pendant la première phase, les graines sont mises à fermenter dans un panier ou un récipient aéré pendant 2 à 3 jours. Puis les graines sont écrasées par pilage au mortier-pilon et malaxées avec de la potasse (lyxifiats de cendre) et de l'eau. La pâte obtenue est alors soumise à la fermentation dans une enceinte fermée pendant 1 à 2 jours. A la fin de cette seconde fermentation le produit acquiert une très forte odeur ammoniacale caractéristique. La pâte fermentée est conditionnée en petites boules avant la cuisson à la vapeur qui peut durer toute une nuit (Bengaly, 2001; Parkouda *et al.*, 2008). Cette étape est très importante car déterminante dans la durée de vie du *Bikalga*. Il est en effet admis que ce type de traitement inhibe les activités enzymatiques, la prolifération des souches mésophiles et détruit une bonne partie de la flore asporogène (Abu-Tarboush et Ahmed, 1996). Cela autorise une meilleure conservation et garantit une certaine innocuité sur le plan microbiologique (Guiraud, 1998).

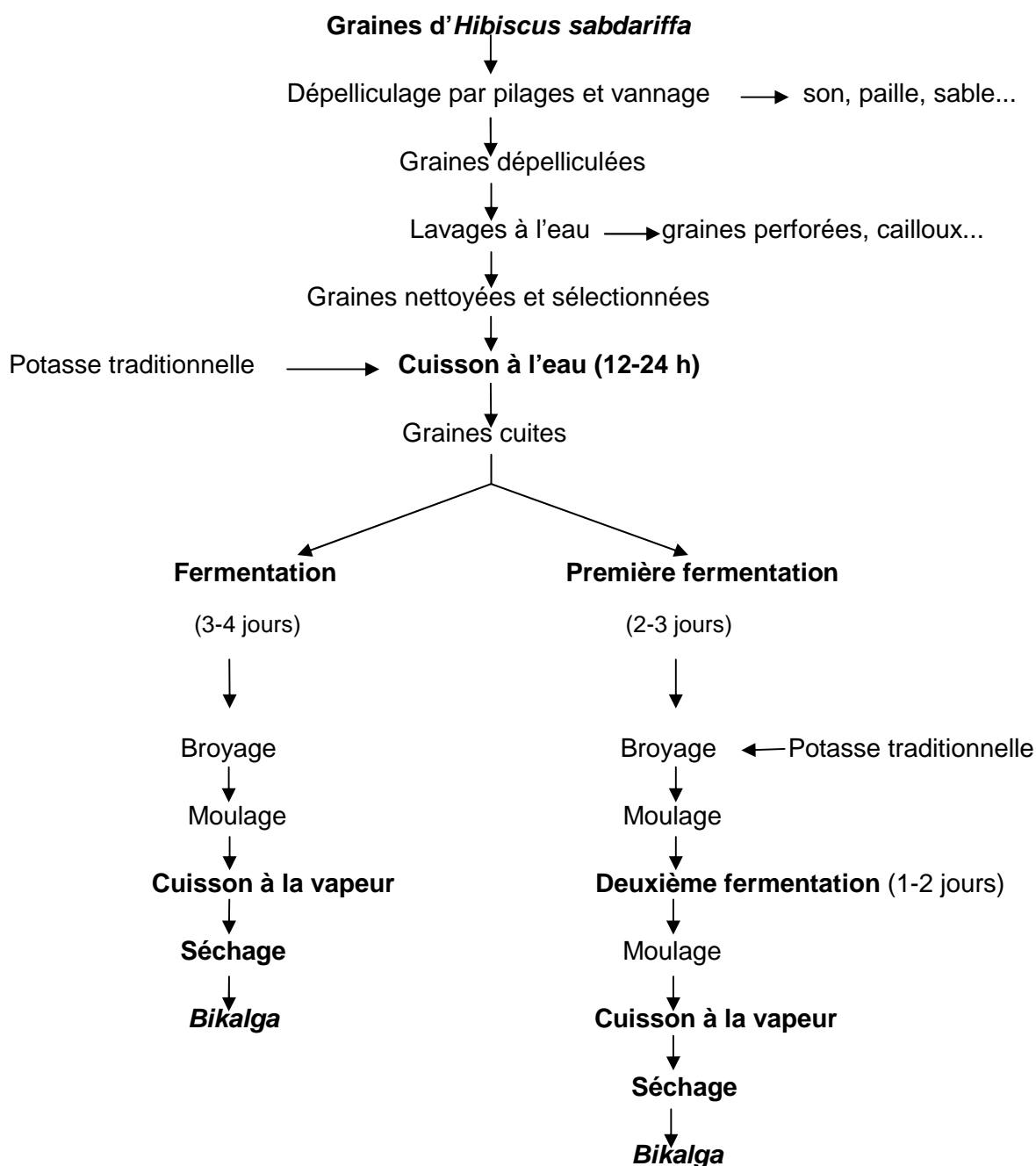


Figure 1: Diagramme technologique de production du *Bikalga*

Source : Parkouda *et al.*, 2008

-Le traitement des graines fermentées : après la cuisson à la vapeur, le *Bikalga* frais est séché au soleil. Le séchage peut durer de 1 à 3 jours selon la saison (intensité du soleil). Le produit obtenu après le séchage correspond au *Bikalga* sec

(Photo 2) prêt à être utilisé comme condiment dans les sauces accompagnant le Tô (pâte de farine de céréales), le couscous, le riz et autres plats à base de céréales. Il est couramment conditionné en sachet de 25 Frs CFA pour la vente sur la place des marchés. Contrairement au *Soumbala* qui est directement utilisé dans les repas, le *Bikalga* sec est d'abord mis à macérer dans de l'eau chaude ou froide pendant quelques minutes. Après tamisage, le macérât est utilisé comme eau de cuisson des sauces et le résidu essentiellement constitué de téguments des graines est rejeté.



Photo 2: *Bikalga* sec (Compaoré C.S.)

1.6.2 Changements physico-chimiques au cours de la fermentation

- **Evolution du pH :** le pH des graines d'*H. sabdariffa* augmente après la cuisson (Bengaly, 2001; Parkouda *et al.*, 2008), probablement dû à l'ajout de potasse mais également à la libération de composés acides dans l'eau de cuisson (Yagoub *et al.*, 2004). Il augmente de plus de 8 après la première fermentation. Cela pourrait s'expliquer par l'activité protéolytique des microorganismes tels que les souches de *Bacillus* responsables de la fermentation (Ouoba *et al.*, 2008) qui dégradent les protéines en peptides puis en acides aminés. Une partie de ces acides aminés est dégradée pour produire des composés tels que l'ammoniac (NH₃) responsable de l'augmentation du pH (Ibrahim et Antai, 1986; Kiers *et al.*, 2000). Cependant après la deuxième fermentation on observe une stabilisation et parfois une légère diminution du pH, cette diminution est beaucoup plus prononcée après la cuisson à la vapeur et le séchage où le pH peut baisser jusqu'à 6,1 (Parkouda *et al.*, 2008). Les travaux de

Yagoub *et al.* (2004), de Yagoub et Mohamed (2008) et de Bengaly (2001) ont également rapporté une augmentation du pH des graines d'hibiscus après la cuisson et une diminution après la fermentation. Cette diminution pourrait être due à une acidogénèse liée à la fermentation des glucides au regard des teneurs en glucides très élevées dans les graines d'*H. sabdariffa* (Bengaly, 2001). Harper et Collin (1992) ont noté l'augmentation d'une production d'acide acétique suivie d'une diminution du pH lors de la production du *Furundu*.

- **Teneurs en éléments minéraux** : une augmentation significative des teneurs en sels minéraux particulièrement les teneurs en potassium, sodium et calcium est observée dans les graines fermentées. Cette augmentation est essentiellement liée à l'ajout de la potasse traditionnelle qui est riche en éléments minéraux (Bengaly, 2001 ; Parkouda *et al.*, 2008). L'augmentation de la quantité de sels minéraux pourrait aussi être la conséquence de l'hydrolyse des acides oxalique et phytique (Uwaegbute, 1996).

- **Teneurs en protéines** : Parkouda *et al.* (2008) ont trouvé que la fermentation entraînait une légère diminution du taux de protéines des graines d'*H. sabdariffa* (de 28,69% à 26,47%). Cette diminution a été attribuée à une légère perte de nitrates selon Harper et Collin (1992) qui ont mentionné une évolution similaire du taux de protéines au cours de la fermentation du *Furundu*. Cependant Bengaly (2001) a noté une augmentation de 5% du taux de protéines totales au cours de la fermentation des graines d'*H. sabdariffa* pour produire le *Bikalga*. Yagoub et Mohamed (2008) ont également rapporté une augmentation du taux des protéines totales (32,28% à 33,03%) pendant la fermentation du *Furundu*. Ce relèvement des taux de protéines totales est une propriété classique des fermentations alimentaires et les souches du genre *Bacillus* sont particulièrement impliquées dans cette protéogénèse (Jideani et Okere, 1991 ; Odunfa et Oyewole, 1986).

- **Teneurs en lipides** : le taux de lipides augmente légèrement après la fermentation des graines d'*H. sabdariffa* (21,93 à 23,19) selon Parkouda *et al.* (2008) et serait dû à l'utilisation sélective des hydrates de carbones par la microflore durant la fermentation. Une légère augmentation du taux de lipides reportée comme non significative a également été observée pendant la fermentation du *Furundu* (Harper et Collin, 1992 ; Abu-Tarboush *et al.*, 1997). Cependant, les travaux de Bengaly (2001) ont révélé que le taux de lipides des graines d'*H. sabdariffa* ne variait pas avec la fermentation.

- **Teneurs en glucides totaux** : le taux de sucre totaux diminue durant la fermentation du *Bikalga*, de 10% selon Bengaly (2001) et jusqu'à 50% selon Parkouda *et al.* (2008). Cette diminution qui a également été observée pendant la fermentation du *Furundu* (Yagoub *et al.*, 2004) serait liée à deux facteurs : la longue cuisson pendant laquelle une certaine quantité de carbohydrates solubles est perdue dans l'eau de cuisson et la fermentation durant laquelle les carbohydrates sont hydrolysés en sucres réducteurs facilement utilisables par les microorganismes comme source d'énergie (Odunfa, 1985 ; Yagoub *et al.*, 2004).

- **Evolution des facteurs antinutritionnels** : les travaux de Bengaly *et al.* (2006) ont montré que la cuisson et la fermentation entraînait une diminution significative (70% en moyenne) des teneurs en facteurs antinutritionnels tels que les polyphénols et les acides phytiques des graines d'*H. sabdariffa*. Des résultats similaires avaient été rapportés par Yagoub *et al.* (2004), cependant les taux de réduction étaient beaucoup plus faibles (par exemple 13% de réduction du taux en acides phytiques). La production de phytases bactériennes pourrait être responsable de la diminution des teneurs en acides phytiques (Ortwin et Igbasan, 2002). La diminution des teneurs en polyphénols serait liée à une libération de polyphénols pendant la cuisson ou à un changement de leur réactivité chimique et la formation de complexes insolubles avec les protéines due au pH alcalin (Jyoti et Sumathi, 1995). Les pertes de composés dans les eaux de cuisson avaient été mentionnées (Duhan *et al.*, 2002). La réduction des teneurs en acides phytiques et en polyphénols grâce à la cuisson en milieu alcalin et la fermentation améliorerait la biodisponibilité du fer et du zinc du *Bikalga* (Bengaly *et al.*, 2006).

1.6.3 Valeur nutritive du *Bikalga*

Le *Bikalga* est une source importante de protéines (26-37%). Il contient 17 à 24% de lipides et 13 à 22% d'hydrates de carbone (Tableau III). Il contient 5 à 13% de sels minéraux dont le plus abondant est le potassium (1063-1532 mg/100g MS) (Tableau IV). Le *Bikalga* est également une bonne source de calcium (303-344 mg/100g MS) pour l'alimentation humaine. Comme le montre le tableau IV, tous les 9 acides aminés reconnus essentiels par la FAO (FAO, 1991) sont présents dans le *Bikalga*.

Tableau III : Valeur nutritive en protéines, lipides, sucres et sels minéraux du *Bikalga*

Nutriments	Bengaly, 2001	Yagoub et al., 2004	Parkouda et al., 2008
%Protéines	31,08-37,84	28,66	26,47
%Lipides	17,95-21,92	24,6	23,19
%Sucres Totaux	16,32-22,43	22,77	13,17
%Sels minéraux	6,12-13,05	5,52	9,03

Tableau IV : Composition en acides aminés et en sels minéraux des graines fermentées d'*H. sabdariffa*

Acides aminés			Eléments minéraux (mg/100g MS) (Bengaly et al., 2006)	
	Bengaly, 2001 (g/100gMS)	Yagoub et Mohamed, 2008 (g/100g protéines)		
Glycine	1,66-1,81	5,83	Calcium	303-344
Alanine	1,60-1,75	5,00	Magnésium	340-459
Valine*	1,63-1,79	5,66	Sodium	450-501
Leucine*	2,38-2,64	7,73	Potassium	1063-1532
Isoleucine*	1,18-1,30	4,13	Fer	6,50-8,33
Sérine	1,67-1,80	4,26	Manganèse	3,13-4,11
Thréonine*	1,06-1,21	3,42	Cuivre	Traces
Méthionine*	0,59-0,66	0,93	Zinc	2,90-3,53
Cystéine	0,68-0,78	1,48		
Phénylalanine*	1,61-1,80	5,19		
Tyrosine*	1,01-1,14	1,80		
Acide Aspartique	3,33-3,88	11,23		
Acide glutamique	6,50-7,07	18,52		
Lysine*	1,54-1,70	4,95		
Arginine	3,99-4,42	11,31		
Histidine*	0,48-0,53	3,99		
Tryptophane	0,15-0,17	-		

* : Acides aminés essentiels

Une comparaison des concentrations d'acides aminés essentiels des protéines du *Bikalga* à ceux de la protéine de référence FAO montre que les teneurs en leucine, isoleucine, phénylalanine+tyrosine, méthionine+cystéine et valine en sont acceptables (Bengaly, 2001 ; Yagoub et Mohamed, 2008). Le *Bikalga* contient donc des protéines de qualité relativement bonne malgré l'insuffisance de certains acides aminés comme la lysine. Néanmoins, les teneurs en lysine de l'ordre de 46 mg/g de protéines ne sont pas négligeables dans un régime alimentaire basé sur les céréales (El-Adawy et Khalil, 1994 ; Nanama, 1998).

1.6.4 Microorganismes associés à la fermentation

Les principaux microorganismes responsables de la fermentation alcaline des graines d'*H. sabdariffa* en *Bikalga* sont des bactéries du genre *Bacillus* telles que *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. cereus*, *B. pumilus*, *B. badius*, *B. bortelensis*, *B. sphaericus* et *B. fusiformis* avec comme espèces prédominantes *B. subtilis* et *B. licheniformis* (Ouoba *et al.*, 2008). Hormis *Bacillus* spp., des *Staphylococcus* spp. ont été isolés dans le *Bikalga* (Bengaly, 2001). La longue cuisson subie par les graines avant la fermentation constitue un système de sélection des microorganismes. Les bactéries du genre *Bacillus* sont donc favorisées due à leur capacité à sporuler et à la résistance de leurs spores à la chaleur (Odunfa, 1981 ; Antai et Ibrahim, 1986). La fermentation du *Furundu* est quant à elle dominée par des espèces du genre *Bacillus* et des levures et moisissures (Yagoub et Mohamed, 2008) tandis que celle du *Mbuja* est dominée par des *Bacillus* spp. et des bactéries lactiques (Mohamadou *et al.*, 2007). La microbiologie de la fermentation du *Yanyanku* et de l'*Ikpiru*, deux produits obtenus par fermentation des graines d'*H. sabdariffa* et utilisés comme additifs fonctionnels dans la fermentation du *Sonru* et de l'*Iru* (condiments à base de graines fermentées de *Parkia biglobosa*) au Bénin a été récemment étudiée (Agbobatinkpo *et al.*, 2013). Il ressort de cette étude que *B. subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. cereus*, *Bacillus safensis* et *Bacillus altitudinis* constituent les espèces de *Bacillus* majoritaires dans ces produits.

1.7 Les bactéries du genre *Bacillus*

Les bactéries du genre *Bacillus* de la famille des Bacillaceae, représentent les bactéries sporulées aérobies les plus largement répandues dans les sols, les eaux naturelles, l'air où elles participent à plusieurs transformations chimiques. Ce sont des bâtonnets de diverses tailles formant des colonies de formes variées. Leur habileté à sporuler leur permet de tolérer des conditions nutritionnelles pauvres (Doi, 1989). Elles sont Gram positif au cours de la phase exponentielle de croissance, catalase positive pour la plupart, oxydase positive ou négative, aérobies ou anaérobies facultatives, psychrophiles, mésophiles ou thermophiles, immobiles ou mobiles par cils péritriches (Claus et Berkeley, 1986). Elles sont hétérotrophes et tirent leur énergie d'une large gamme de composés organiques par fermentation ou

respiration. Les espèces du genre *Bacillus* sont très nombreuses et de propriétés variées. Il existe environ une centaine connues (Sander *et al.*, 2003). La souche *B. subtilis* (Figure 2) est considérée comme l'espèce type du genre *Bacillus* (Harwood, 1989). C'est un des organismes les plus étudiés, le second chez les procaryotes, juste après *Escherichia coli* (Marchadier, 2009).

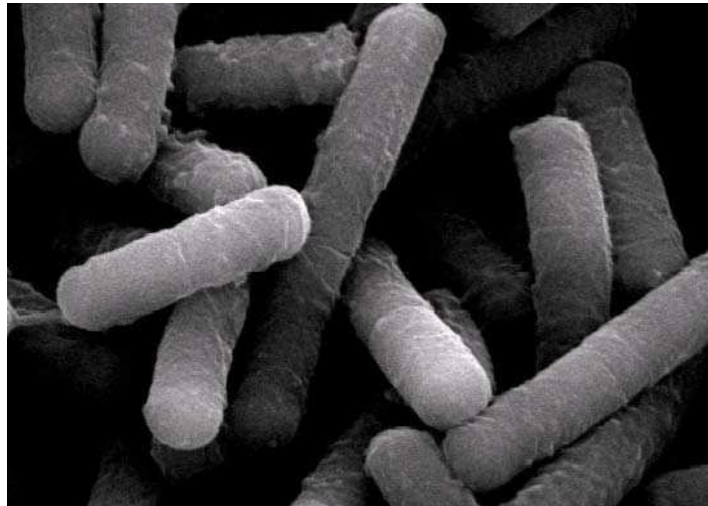


Figure 2 : *B. subtilis* observé en microscopie électronique à balayage
(Source: Marchadier, 2009)

Le genre *Bacillus* regroupe à la fois des bactéries pathogènes pour l'homme, les plantes et les animaux tels que *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. cereus*, *B. Sphaericus* et des bactéries non pathogènes participant à plusieurs types de fermentations traditionnelles et industrielles (Green *et al.*, 1999 ; Ouoba *et al.*, 2004). En effet, diverses espèces de *Bacillus* ont été isolées au cours de la fermentation traditionnelle alcaline des graines légumineuses en condiments. C'est le cas des condiments fermentés à base d'*H. sabdariffa* (*Bikalga*, *Furundu*, *Mbuja*), de *Parkia biglobosa* (*Dawadawa*, *Soumbala*, *Iru*, *Afitin*, *Sonru...*), de *Adansonia digitata* (*Maari*), de *Glycine max* (*Soy-dawadawa*, *kinema...*) etc. Les plus citées sont *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* et *B. pumilis* avec comme espèce prédominante *B. subtilis* (Odunfa, 1985 ; Ibrahim et Antai, 1986 ; Diawara *et al.*, 1992 ; N'dir *et al.*, 1997, Ouoba *et al.*, 2004 ; Bengaly, 2001 ; Azokpota *et al.*, 2006 ; Mohamadou *et al.*, 2007 ; Ouoba *et al.*, 2008 ; Parkouda *et al.*, 2010). Cette dernière assure la protéolyse et la lipolyse indispensable à la genèse d'arômes caractéristiques.

L'augmentation de la teneur en protéines observée au cours des fermentations naturelles de divers substrats a été attribuée au métabolisme de *B. subtilis* (Ibrahim et Antai, 1986 ; Jideani et Okere, 1991 ; Odunfa, 1985 ; Ouoba *et al.*, 2004).

Les bactéries du genre *Bacillus* sont aptes à produire des substances antimicrobiennes telles que les bactériocines (subtiline, subtilosine...), les lipopeptides antibiotiques (surfactine, iturine, fengycine...) et des enzymes industrielles telles que les amylases utilisées dans l'industrie du pain, les protéases et cellulases utilisées dans l'industrie des détergents (N'dir *et al.*, 1997 ; Diep et Nes, 2002 ; Savadogo *et al.*, 2011 ; Kaboré *et al.*, 2012 ; Compaoré *et al.*, 2013a, 2013b). De nombreux antibiotiques produits par *Bacillus subtilis* tels que la polymyxine, la difficidine, la mycobacilline ou la bacitracine sont utilisés dans l'industrie pharmaceutique. Une variété de *B. subtilis* (*B. subtilis natto*) sert également à fabriquer le *Natto*, un plat traditionnel japonais à base de soja fermenté.

Les bactéries du genre *Bacillus* peuvent aussi synthétiser une diversité de vitamines dont la thiamine, la riboflavine et la biotine. Certaines souches excrètent des polysaccharides (levanes) sur des substrats contenant le sucrose ou le raffinose. C'est ce qui donne à certains produits fermentés une texture gluante caractéristique (Laokolé, 1994 ; Bourgeois et Larpent, 1996).

Certaines espèces de *Bacillus* comme *B. cereus* sont des pathogènes potentiels pour l'homme de par leur production de toxines et d'enzymes lytiques. Elles sont donc à contrôler au cours de la fermentation des denrées alimentaires (Bourgeois et Larpent, 1996). L'espèce *B. thuringiensis* est un pathogène des insectes (moustiques), elle excrète un cristal protéique larvicide (Buchanan et Gibsons, 1975). Cette antibiose renforce la compétitivité des souches de *Bacillus* sur les substrats fermentaires.

1.8 La nécessité d'optimiser le processus de production du *Bikalga*

Le *Bikalga* constitue avec le *Soumbala* et le *Maari*, les condiments les plus populaires au Burkina Faso et est une source importante de protéines pour l'alimentation humaine (Bengaly, 2001). Cependant, comme la plupart des aliments fermentés en Afrique, la production est toujours traditionnelle avec des équipements

rudimentaires et une fermentation incontrôlée, ce qui entraîne des variations aussi bien de la stabilité que de la qualité du produit (Sanni, 1993 ; Diawara *et al.*, 1998). Le *Bikalga* est également confronté à une concurrence venant des assaisonnements importés bien que la teneur en calorie et la valeur nutritionnelle de ces produits soient faibles (Diawara *et al.*, 1998). Une amélioration de la production est donc nécessaire afin de procurer aux populations du *Bikalga* de meilleure qualité nutritionnelle et d'obtenir un produit commercialement attractif capable de concurrencer les assaisonnements importés. Les objectifs précités peuvent être réalisés en optimisant la production de la manière suivante (Sanni, 1993 ; Holzapfel, 2002) :

- des paramètres de production tels que la température, l'humidité, l'aération, la quantité de substrats à utiliser peuvent être modifiés afin d'améliorer la qualité et le temps de production ;
- la mise au point de starters : les microorganismes doivent être sélectionnés pour conduire une fermentation donnant un produit désirable. Ce point est l'intérêt même de cette thèse et sera abordé plus tard ;
- des équipements modernes adaptés et une production industrielle (à petite échelle dans un premier temps) doivent être envisagés. Le matériel doit être muni de conditions de maintenance, de fiabilité et d'hygiène bien définies ;
- un système de qualité doit être appliqué à la production avec à l'appui une formation du personnel en matière de conditions hygiéniques et d'utilisation des équipements.

1.9 Avantages de l'utilisation de starter pour la fermentation des graines d'*H. sabdariffa*

La production du *Bikalga* implique une fermentation naturelle et incontrôlée comme la plupart des aliments fermentés en Afrique, entraînant souvent une variation de la qualité et de la stabilité du produit fini (Sanni, 1993). Un des facteurs contribuant à l'optimisation du processus de production est l'utilisation de cultures attestées et effectives de starter. Celles-ci garantissent la qualité et la stabilité nutritionnelle et organoleptique du produit ainsi qu'une réduction du temps de fermentation (Odufa et Adewuyi, 1985). La fermentation des produits africains est souvent réalisée par un consortium de plusieurs microorganismes. En effet, dans les unités artisanales, la

fermentation naturelle non contrôlée résulte généralement de l'activité compétitive d'une variété de microorganismes où les mieux adaptés au substrat et aux conditions techniques et environnementales vont dominer le processus de fermentation. Pour cela, la sélection de starters doit passer par l'isolement et l'identification des microorganismes associés à la fermentation. La variabilité de la culture microbienne doit être notée et le rôle de chaque microorganisme proprement déterminé. Des essais de fermentation doivent être réalisés avec de la matière première appropriée afin d'évaluer la performance des microorganismes et de décrire leurs propriétés technologiques (Sanni, 1993).

Selon Holzapfel (1997), une culture starter peut être définie comme une substance ou une préparation contenant des microorganismes adaptés, et pouvant être ajoutée à un substrat pour accélérer ou faciliter la maîtrise du processus de fermentation et assurer la qualité des produits. La maîtrise du processus de fermentation consiste à favoriser une flore utile au détriment d'une flore indésirable afin de prévenir les risques sanitaires chez les consommateurs. La particularité d'un starter est liée à la matière première (lait, viande, légumes, céréales, tubercules, etc.) et doit avoir quelques attributs potentiels (Holzapfel, 1997 ; 2002) tels que :

- l'amélioration de la valeur nutritive par un enrichissement biologique à travers par exemple la biosynthèse de vitamines, d'acides aminés essentiels et de protéines ;
- l'amélioration des caractéristiques organoleptiques à savoir la saveur, l'arome, la texture, la consistance et l'apparence visuelle ;
- l'amélioration de la sûreté toxicologique en dégradant les composés toxiques ;
- la capacité d'avoir un effet antimicrobien contre certains germes pathogènes et la flore d'altération ;
- la capacité d'avoir des propriétés probiotiques contribuant ainsi à la santé ;
- la capacité de réduire le temps de production par une accélération du temps de fermentation.

En raison de la longue tradition et de leur haute performance, les starters utilisés dans l'industrie laitière servent de modèle ou d'exemple d'application des starters à d'autres aliments. Le premier starter (*Lactococcus lactis*) a été simultanément introduit au Danemark et en Allemagne en 1890 et a été utilisé pour la fermentation du lait dans la production de fromage ou de yaourt (Holzapfel, 1997).

Les études de la fermentation du *Bikalga* ont révélé que *B. subtilis* et *B. licheniformis* étaient responsables de la fermentation (Ouoba *et al.*, 2008). Cependant les

meilleures souches capables de conduire une fermentation contrôlée n'ont pas encore été sélectionnées.

1.10 Les bactériocines

1.10.1 Définition

Différentes définitions des bactériocines ont été données au cours du temps. Cependant, la définition qui reste la plus largement acceptée est celle de Klaenhammer (1988) qui définit les bactériocines comme des protéines, ou complexes de protéines, avec une activité bactéricide contre des espèces proches de la souche productrice. Les bactériocines représentent une large classe de substances antagonistes qui varient considérablement du point de vue de leur poids moléculaire, de leurs propriétés biochimiques, de leur spectre d'action et de leur mode d'action (Klaenhammer, 1988).

1.10.2 Classification

Les bactériocines ont été regroupées en quatre classes distinctes définies par Klaenhammer (Klaenhammer, 1988).

Classe I : les lantibiotiques : peptides de taille inférieure à 5 kDa, stables à la chaleur et qui contiennent des acides aminés inhabituels soufrés formés post-traductionnellement, c'est-à-dire la lanthionine, la β -méthyl lanthionine, la déhydrobutyrine et la déhydroalanine. Ces peptides ont généralement un large spectre d'activité (McAuliffe *et al.*, 2001). Comme exemples de lantibiotiques on peut citer la subtiline, la subtilosine A, la sublancine 128, l'ericine (A et S), produites par *B. subtilis* (Paik *et al.*, 1998 ; Stein *et al.*, 2002 ; Zheng *et al.*, 1999) ; la nisine produite par *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* est la bactériocine la plus étudiée de cette classe. La figure 3 montre la structure de quelques lantibiotiques du groupe I et l'organisation des gènes spécifiques de leur biosynthèse.

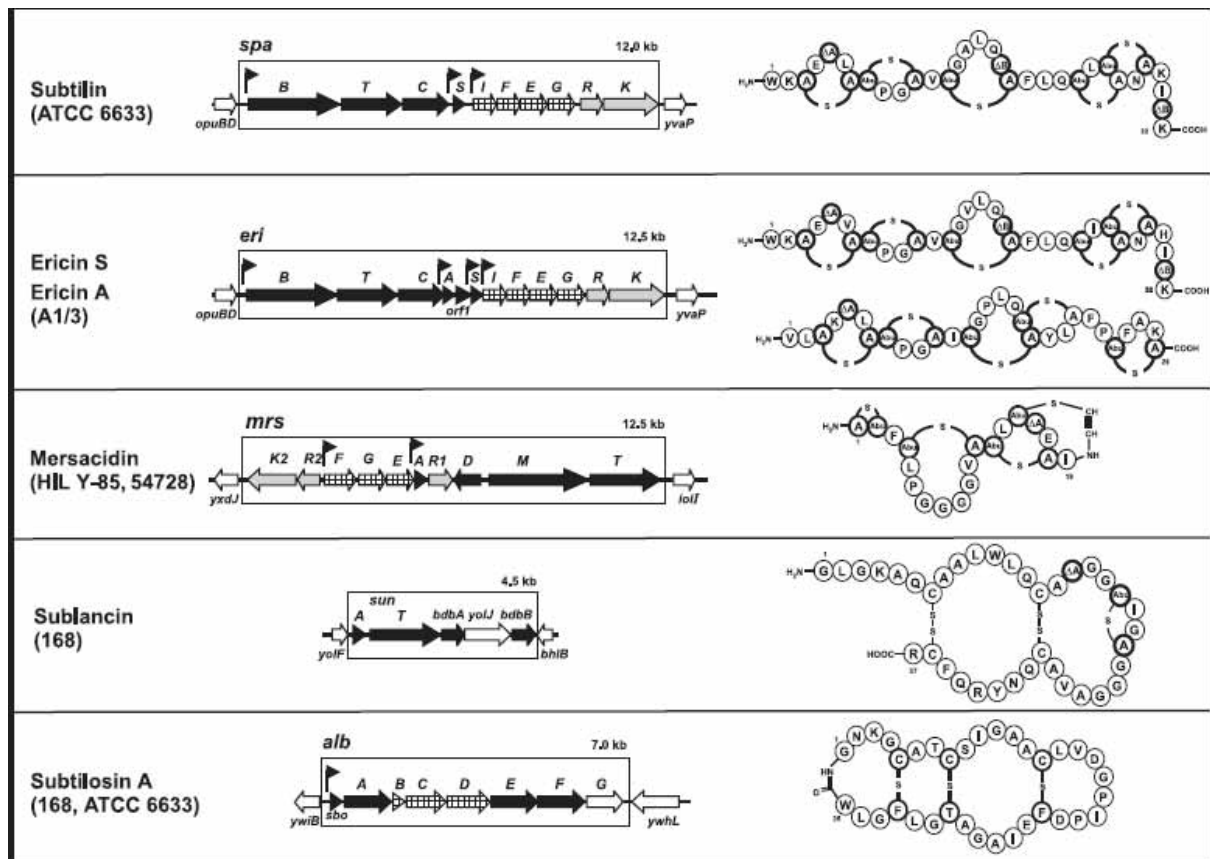


Figure 3 : Exemples de lantibiotiques produits par *B. subtilis* et leurs gènes de synthèse

Source : Stein, 2005

Classe II : cette classe est divisée en trois sous-classes. Les bactériocines de la sous-classe IIa contiennent entre 27 et 48 acides aminés et ont toutes une partie N-terminale hydrophobe contenant la séquence consensus YGNGV ainsi qu'un pont disulfure et une partie C-terminale moins conservée, hydrophobe ou amphiphile qui détermine la spécificité d'action (Fimland *et al.*, 2000). Elles ont toutes une activité contre *Listeria monocytogenes*. Certaines bactériocines de cette sous-classe contiennent également un deuxième pont disulfure dans leur domaine C-terminale qui semble être important dans la stabilisation de la structure tertiaire. Il semble par ailleurs qu'il leur conférerait une meilleure activité antimicrobienne, une meilleure résistance à l'exposition à des hautes températures et un spectre d'action plus large (Eijsink *et al.*, 1998 ; Fimland *et al.*, 2000). La sous-classe IIb comprend les bactériocines ayant besoin de deux peptides pour avoir une activité. Deux types de bactériocines de classe IIb peuvent être distingués : le type E (*Enhancing*) où la fonction d'un des deux peptides est d'augmenter l'activité de l'autre et le type S

(*Synergy*) où les deux peptides sont complémentaires. La sous-classe IIc contient les bactériocines ne pouvant pas être classées dans les autres sous-classes. Exemples : la coaguline, la céréine, la lichenine, la thuricine ...

Classe III : protéines de taille supérieure à 30 kDa et sensibles à la chaleur. La mégacine A-216 produite par *Bacillus megaterium* 216 en est un exemple.

Classe IV : peptides requérant une partie carbohydratée ou lipidique pour avoir une activité. Aucune bactériocine de cette classe n'a encore été décrite.

1.10.3 Les applications des bactériocines

1.10.3.1 Les bactériocines en agroalimentaire

Quelques bactériocines présentent des propriétés qui les placent parmi les substances sans danger pour l'Homme, comme en particulier l'absence de toxicité pour les cellules eucaryotes et la perte d'activité en présence des protéases présentes dans le tube digestif (Gálvez *et al.*, 2011). Par ailleurs, leur résistance aux variations de pH et aux traitements thermiques, leur activité antimicrobienne bactéricide contre des bactéries pathogènes colonisant les produits alimentaires et l'absence de résistance croisée avec les antibiotiques en font de bons candidats pour la bio conservation des aliments (Gálvez *et al.*, 2007). De ce fait, afin de diminuer l'utilisation des additifs chimiques dans l'alimentation et d'obtenir des aliments prêts à la consommation et respectant les règles de la sécurité sanitaire, l'industrie agroalimentaire en Europe s'intéresse à l'utilisation des bactériocines comme bio-conservateurs (Robertson *et al.*, 2004). Cependant, la nisine est aujourd'hui la seule bactériocine légalement approuvée comme additif alimentaire dans 80 pays. Elle a été évaluée comme sans danger pour l'Homme par l'organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (ONUAA) et l'Organisation Mondiale pour la Santé publique (OMS) en 1969 ainsi que par les autorités sanitaires Européennes en 1983. La nisine est souvent utilisée pour le contrôle de la prolifération de pathogènes tels que *Clostridium botulinum*, *Clostridium tyrobutyricum* et *Listeria monocytogenes* dans les produits laitiers (Davies et Delves-Broughton, 1999). Elle est également utilisée dans d'autres

produits alimentaires pasteurisés comme les crèmes glacées, les desserts sucrés à base de lait, de laits aromatisés et de jaune d'œufs (Thomas *et al.*, 2000).

D'autres bactériocines ont, depuis, été commercialisés sous la forme d'un concentré obtenu après fermentation par la souche productrice et atomisation d'un substrat alimentaire tel que le lait, par exemple. Considéré comme un ingrédient fermenté, ce type de préparation contiendrait d'autres métabolites microbiens tels que l'acide lactique (Dortu et Thonart, 2009). Parmi ces produits, figure la pédiocine PA-1/ AcH (Deegan *et al.*, 2006), utilisée pour prévenir la contamination des fromages blancs, des crèmes fromagères et des produits carnés par *L. Monocytogenes* (Rodríguez *et al.*, 2002).

Récemment, l'entéroccine AS-48, une bactériocine de classe IIc, a montré des résultats prometteurs quant à l'inhibition de *Salmonella enterica* dans le lait écrémé (Martinez Viedma *et al.*, 2008). De plus, l'addition d'entéroccine AS-48 sous forme lyophilisée à du lait écrémé inhibe la prolifération de *L. monocytogenes* et réduit progressivement le nombre des souches de *Staphylococcus aureus* vivantes (Ananou *et al.*, 2010).

1.10.3.2 Les applications médicales

L'émergence de la résistance aux antibiotiques conventionnels ces dernières années a orienté la recherche vers l'étude de nouveaux agents antimicrobiens. Le mode d'action des bactériocines qui diffère de ceux des antibiotiques conventionnels et l'innocuité des bactériocines permettraient leur utilisation comme alternative aux antibiotiques dans la prévention et/ ou le traitement des infections dues à des bactéries devenues résistantes aux traitements conventionnels (Dicks *et al.*, 2011). Contrairement aux applications alimentaires des bactériocines, aucune bactériocine n'est à ce jour commercialisée comme médicament. Cependant, quelques-unes d'entre elles sont en cours d'essais cliniques pour le traitement d'infections cutanées, respiratoires, systémiques et/ou urogénitales ainsi qu'en tant qu'agents contraceptifs (Hancock, 2000).

La mersacidine est un antibiotique produit par *Bacillus* sp. HIL Y-85,54728 active contre *Propionibacterium acnes*, une espèce bactérienne rencontrée dans certains problèmes cutanés responsables d'acné, ce qui pourrait lui conférer une utilisation potentielle dans le traitement de ce type d'infection (Niu et Neu, 1991).

La nisine présente un effet bactéricide rapide contre *Staphylococcus pneumoniae* à l'origine d'otite chez la souris à des concentrations inférieures à 1 mg/l. Elle pourrait remplacer l'utilisation de la vancomycine pour le traitement de ce type d'infection afin d'éviter l'apparition de résistance (Mota-Meira *et al.*, 2000). En outre, elle peut être utilisée dans le traitement des ulcères gastriques vue sa stabilité aux pH acides et son activité contre *Helicobacter pylori* (De Vuyst et Vandamme, 1993). Trois autres bactériocines produites par *Lactobacillus johnsonii* LA1, *Lactobacillus casei* YIT 9029 et *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 ont également montré une activité inhibitrice contre l'agent pathogène gastrique humain *Helicobacter pylori* qui cause des ulcères gastriques (Avonts et De Vuyst, 2001). La Cinnamycine produite par différentes souches de *Streptomyces* spp. est impliquée dans l'immunité humaine (prolifération des leucocytes) et la régulation de la pression du sang avec l'intervention de phospholipase A2 et l'enzyme de conservation de l'angiotensine. De plus, ce groupe peut aussi être impliqué dans la protection contre le virus *Herpes simplex* (Avonts et De Vuyst, 2001).

La subtilosine A est un lantibiotique produit par *B. subtilis* (Babasaki *et al.*, 1985) actif contre des pathogènes parmi lesquels *L. monocytogenes*, *Gardnerella vaginalis*, *Streptococcus agalactiae* et *Micrococcus luteus* (Sutyak *et al.*, 2008). Son activité restreinte à *G. vaginalis* permet un maintien de la flore commensale intacte (Sutyak *et al.*, 2008). L'innocuité de la subtilosine A à la flore commensale vaginale ainsi qu'aux tissus humains la place parmi les meilleurs candidats à un futur traitement aux infections vaginales.

1.10.4 *Bacillus* spp. producteurs de bactériocines

Il existe une grande variété de bactériocines produites par les espèces du genre *Bacillus* dont la plupart appartient à la classe I des lantibiotiques (Tableau V).

Tableau V: Exemples de bactériocines produites par *Bacillus* spp.

<i>Bacillus</i> spp.	Bactériocines	Poids Moléculaire (kDa)	Classe	Références
<i>B. subtilis</i>	Subtiline	3,34	Classe I	Banerjee et Hansen, 1988
	Subtilosine A	3,39	Classe I	Zheng <i>et al.</i> , 1999
	Subtilosine A1	3,41	Classe I	Hang <i>et al.</i> , 2009
	Mersacidine	1,82	Classe I	Bierbaum <i>et al.</i> , 1995
	Sublancine 168	3,88	Classe I	Paik <i>et al.</i> , 1998
	Ericine S	3,44	Classe I	Stein <i>et al.</i> , 2002
	Ericine A	2,98	Classe I	Stein <i>et al.</i> , 2002
<i>B. licheniformis</i>	Lichenine	1,4	Classe II	Pattnaik <i>et al.</i> , 2001
<i>B. amyloliquefaciens</i>	Subtilosine A	3,39	Classe I	Sutyak <i>et al.</i> , 2008
<i>B. atrophaeus</i>	Subtilosine A	3,39	Classe I	Stein <i>et al.</i> , 2004
<i>B. coagulans</i>	Coaguline	4,6	Classe I	Le Marrec <i>et al.</i> , 2000
<i>B. cereus</i>	Cereine 7A	3,94	Classe II	Oscáriz et Pisabarro, 2000
<i>B. thuringiensis</i>	Thuricine H	3,14	Classe II	Lee <i>et al.</i> 2009
<i>B. megaterium</i>	Megacine A216	32,85	Classe III	Kiss <i>et al.</i> , 2008

1.11 Les lipopeptides

Les lipopeptides représentent probablement la classe la plus commune des métabolites secondaires produits par les *Bacillus* spp (Stachelhaus *et al.*, 2002). Ils sont classés en trois principales familles dépendant de la séquence des acides aminés : surfactines/lichenysines, iturines (mycosubtiline, iturine, bacillomycine) et fengycines/plipastatines (Ongena et Jacques, 2008). La production des lipopeptides est très largement répandue chez les *B. subtilis* (Besson et Michel, 1987 ; Peypoux *et al.*, 1999), une propriété qui est partagée avec d'autres *Bacillus* du même groupe, phylogénétiquement liés tels que *B. amyloliquefaciens* (Benitez *et al.*, 2010 ; Koumoutsi *et al.*, 2004 ; Sun *et al.*, 2006 ; Yu *et al.*, 2002).

1.11.1 Structure chimique des lipopeptides

-Les iturines : elles constituent la famille des lipopeptides constitués d'une séquence de 7 acides α -aminés cycliques et d'une chaîne d'acide gras β -aminé servant à la cyclisation de l'heptapeptide par deux liaisons amides impliquant le groupement aminé situé en β de l'acide gras et son groupement carboxylique. Les 7 acides α -aminés sont de configuration L ou D et s'enchaînent suivant l'ordre LDDLLDL (Peypoux, 1978).

D'autres antibiotiques apparentés à l'iturine A sont la mycosubtiline et la bacillomycine. La mycosubtiline diffère de l'iturine A par l'inversion de la séquence de 2 acides aminés : Asn⁶-Ser⁷-Acide gras β -aminé dans l'iturine devient Ser⁶-Asn⁷-acide gras β -aminé dans la mycosubtiline avec un acide gras en C₁₇ (antéiso) ou en C₁₆ (iso) (Peypoux *et al.*, 1986). Quant à la bacillomycine, plusieurs structures ont été identifiées : bacillomycine L, F et D. La séquence des 3 premiers acides aminés dans les bacillomycines F et D est identique à celle de l'iturine A.

-Les surfactines : la surfactine est une molécule lipopeptidique cyclique constituée par un heptapeptide lié à un acide gras β -hydroxylé. Les acides glutamiques et aspartiques, la leucine et la valine constituent la partie peptidique dans un enchaînement de 7 acides α -aminés de chiralité constante LDDLLDL. L'acide gras β -hydroxylé est relié à la partie peptidique par une liaison amide avec le premier acide aminé et une liaison ester avec le dernier acide aminé (L7) assurant ainsi la cyclisation. L'acide aminé impliqué dans la liaison ester est variable : soit la leucine (Surfactine standard) soit la valine, soit l'isoleucine.

-Les fengycines : elles constituent une troisième famille de lipopeptides produits par *B. subtilis*. Ce sont des lipopeptides constitués de 10 acides aminés L ou D et d'un acide gras β -hydroxylé à longue chaîne carbonée (C₁₅ à C₁₈) saturée ou insaturée. Il y a deux types de fengycines : la fengycine A et la fengycine B. Elles diffèrent par la composition en acides aminés du cycle peptidique (isoformes). Dans la fengycine B la D-Alanine en position 6 est remplacée par la D-valine. La chaîne lipidique de ces composés présente une longueur de 15 à 17 atomes de carbones. L'isomérisation est de nature iso, antéiso, ou n.

La structure primaire et l'organisation des gènes de biosynthèses des lipopeptides produits par les *Bacillus* spp. tels que la surfactine (*srf*), la plipastatine (*pps*), la fengycine (*fen*), la bacillomycine (*bmy*), l'iturine (*itu*), et la mycosubtiline (*myc*) ont été décrits (Duitman *et al.*, 1999; Galli *et al.*, 1994; Konz *et al.*, 1999; Koumoutsi *et al.*, 2004; Menkhaus *et al.*, 1993; Tapi *et al.*, 2010 ; Tosato *et al.*, 1997; Tsuge *et al.*, 2001). La figure 4 donne la structure détaillée des principaux membres des trois familles de lipopeptides produits par les *Bacillus* spp.

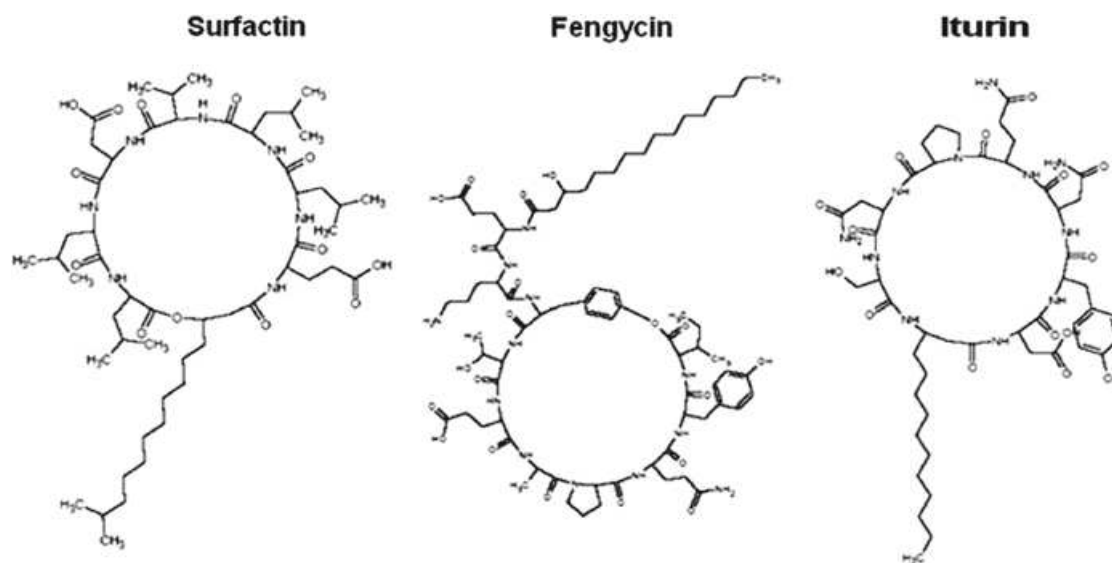


Figure 4 : Structure détaillée de la surfactine, de la fengycine et de l'iturine.

Source : Jacques, 2011

1.11.2 Biosynthèse des lipopeptides

L'absence de plasmides porteurs des gènes codant pour les lipopeptides indique que les gènes responsables de la biosynthèse de ces antibiotiques ne sont pas plasmidiques mais chromosomiques. Des études ont montré que la biosynthèse des lipopeptides se fait selon un mode de synthèse non ribosomiale (l'addition d'inhibiteur de la biosynthèse des protéines comme le chloramphénicol aux cultures de souches productrices de surfactine et d'iturine n'altère en rien la production de ces antibiotiques) (Menkhaus *et al.*, 1993 ; Duitman *et al.*, 1999). Ce mode de biosynthèse rencontré dans la plupart des antibiotiques des *Bacillus*, dépend d'un système multienzymatique (Besson *et al.*, 1989). Un tel mode de biosynthèse, est

communément appelé « Thiotemplate » (Menkhaus *et al.*, 1993 ; Duitman *et al.*, 1999). Son fonctionnement a été expliqué dans le cas de la biosynthèse de bon nombre d'antibiotiques peptidiques. Les principales réactions mises en œuvre sont l'activation des constituants (acides aminés) en adénylate, le transfert des acides aminés activés sur des groupements thiols présents au site actif de l'enzyme et capable de reconnaître plus ou moins spécifiquement les différents résidus, l'épimérisation ou la N-méthylation des thioesters obtenus et enfin la polymérisation du peptide qui se fait au travers d'une série de réaction de transpeptidation qui sera suivie d'une éventuelle cyclisation ou de modifications terminales (Jacques, 2011).

1.11.3 Propriétés des lipopeptides

Les lipopeptides de *B. subtilis* de par leur caractère amphiphile et leur nature peptidique présentent un certain nombre de propriétés qui en font leur intérêt. On peut classer ces propriétés en deux catégories : les propriétés physico-chimiques dont les plus importantes sont les propriétés tensioactives et les propriétés biologiques.

1.11.3.1 Propriétés physico-chimiques

Les propriétés tensioactives ou propriétés amphiphiles sont propres aux molécules à caractère à la fois polaire et apolaire. La partie polaire (hydrophile) est constituée par la partie peptidique et la partie apolaire (lipophile) par la chaîne hydrocarbonée de l'acide gras (β -aminé dans le cas des iturines ou β -hydroxylé dans le cas des surfactines et des fengycines). Ce pouvoir amphiphile permet aux lipopeptides de se positionner spontanément aux interfaces (limites de séparation entre deux phases non miscibles). Par exemple, en solution aqueuse elles s'agrègent pour former des micelles dans lesquelles les parties polaires sont orientées vers l'eau. Ces substances se comportent comme des substances tensioactives car elles sont capables de diminuer la tension superficielle d'une solution aqueuse par adsorption et formation de film à l'interface air-eau. Ces propriétés leur confèrent certaines aptitudes technologiques comme la formation de mousse (interface air-eau) ou des émulsions (interface eau-huile) (Razafindralambo *et al.*, 1996 ; Deleu *et al.*, 1999).

Pour les différentes familles de lipopeptides, plusieurs auteurs ont montré, d'une part, l'effet de ces molécules sur les propriétés de surface, d'autre part, la relation structure-propriétés tensioactives et enfin la recherche d'éventuels synergies ou antagonismes (Thimon *et al.*, 1992 ; Maget-Dana *et al.*, 1992 ; Razafindralambo *et al.*, 1996). Il apparaît ainsi que la surfactine est un des « biosurfactants » les plus efficaces, capable d'abaisser la tension superficielle des solutions aqueuses de 72 mN/m à 27mN/m (Razafindralambo *et al.*, 1996) tandis que l'iturine diminue celle-ci à 43mN/m (Deleu *et al.*, 1999).

D'autres propriétés physico-chimiques comme la solubilité dans un solvant ont été déterminées pour les lipopeptides. En effet dans l'optique d'une meilleure extraction des lipopeptides et de leur caractérisation par les différentes méthodes physiques d'analyse (chromatographie, spectrométrie, etc.), il a été nécessaire d'évaluer la solubilité de ces molécules dans différents solvants organiques ou aqueux. Il est ressortit que les lipopeptides sont solubles dans le méthanol, l'éthanol, le butanol et l'eau alcaline et insolubles dans l'eau, le benzène, et l'éther (Besson *et al.*, 1977).

1.11.3.2 Propriétés biologiques

L'engouement pour les lipopeptides de *B. subtilis* s'explique en partie par les potentialités biologiques que présentent ces molécules. En effet ce sont des antibiotiques puissants connus pour leurs multiples propriétés biologiques. Ces propriétés se répartissent traditionnellement en trois catégories : les propriétés antifongique, antibactérienne et hémolytique. En outre, des études ont permis d'élargir le spectre de leurs propriétés ; on leur reconnaît désormais des propriétés antivirales et anti-tumorales (Thonart *et al.*, 1994) et une activité contre le virus du SIDA (Itokawa *et al.*, 1994).

-Les surfactines : elles possèdent d'innombrables propriétés biologiques. Elles sont surtout connues pour leurs activités antibactérienne et hémolytique qui se manifestent par la lyse des cellules bactériennes gram+ et gram- et celle des érythrocytes humain *in vitro* (Thimon *et al.*, 1992). En outre, des activités antivirales (Kracht *et al.*, 1999), anti-inflammatoires (Kim *et al.*, 1998) et des effets immunomodulateurs (Park et Kim, 2009) ont été démontrés par les surfactines.

Douées d'une activité anti-tumorale et hypocholestérolémiante (Kameda *et al.*, 1974), les surfactines sont capables d'inhiber la dénaturation des protéines et la coagulation du sang par le blocage de la formation de caillots de fibrine. Même si elles manifestent une très faible activité antifongique, on leur reconnaît une activité cytolytique contre les champignons et les levures (Vater, 1986). L'halobacilline qui a été isolée récemment d'un *Bacillus* des fonds marins présente une activité cytotoxique modérée contre les cellules cancérigènes humaines (Trischman *et al.*, 1994). Très récemment, un lipopeptide surfactant produit par *B. subtilis natto* a été testé présentant une activité antimicrobienne contre *Salmonella* Typhimurium, *Micrococcus luteus* et *Staphylococcus aureus* (Cao *et al.*, 2009). Les surfactines ont également montré une capacité à stériliser *Escherichia coli* et à inactiver les spores de *B. cereus* (Huang *et al.*, 2007).

-Les iturines : ces lipopeptides présentent un large spectre d'activité antifongique (Leclère *et al.*, 2005 ; Mizumoto *et al.*, 2007 ; Romero *et al.*, 2007 ; Fickers *et al.*, 2009). Elles peuvent donc constituer une alternative très intéressante à l'utilisation des antifongiques chimiques en tant que biofongicides. Utilisée dans la conservation des grains, l'iturine A inhibe le développement d'*Aspergillus flavus* et d'*Aspergillus parasiticus* responsables de la production de substances cancérigènes (l'aflatoxine) dans les céréales et les arachides (Klich *et al.*, 1994). L'activité antibactérienne des iturines a toujours été décrite comme réduite à quelques souches que sont *M. luteus* et *Sarcina lutea* (Besson *et al.*, 1979 ; Peypoux *et al.*, 1979). Cependant, très récemment, une activité inhibitrice de l'iturine contre *Salmonella* Enteridis a été décrite (Huang *et al.*, 2009). Les membranes cytoplasmiques semblent être la première cible de ces lipopeptides qui interagissent avec les lipides membranaires (Besson *et al.*, 1989).

-Les fengycines : les fengycines sont antifongiques, essentiellement actives contre les champignons filamenteux (Vanittankom *et al.* 1986). Contrairement aux iturines au large spectre antifongique, les fengycines présentent une activité antifongique vis-à-vis spécialement de *Pyricularia oryzae* et *Rhizoctonia solani*. Ils sont hémolytiques mais beaucoup moins que l'iturine A.

1.12 Les polykétides

1.12.1 Définition

Les polykétides sont un groupe de métabolites secondaires, dont la diversité de leur structure et de leur activité biologique est remarquable (Gaitatzis *et al.*, 2002). Ils sont connus pour être des molécules ayant des activités pharmacologiques variées, y compris des activités antimicrobiennes, antifongiques, antiparasitaires, antitumorales et aussi des propriétés agrochimiques (Shen, 2003). Le spectre large d'activité des polykétides les rend économiquement, cliniquement et industriellement les plus recherchés parmi de nombreuses molécules. Beaucoup de polykétides sont des composés bien connus, tels que l'érythromycine A, un antibiotique macrolide qui possède un spectre large, l'immunosuppresseur FK506, les ochratoxines, l'épothilone B, la rifamycine B, etc. Parmi les polykétides synthétisés par les bactéries du genre *Bacillus*, les plus cités sont la difficidine, l'oxydifficidine, la bacilleane et la macrolactine. La production de ces polykétides a en effet été démontrée par plusieurs souches de *B. Subtilis* (Patel *et al.*, 1995 ; Zimmerman *et al.*, 1986) et de *B. amyloliquefaciens* (Chen *et al.*, 2006 ; Arguelles-Arias *et al.*, 2009). La figure 5 donne la structure de quelques polykétides.

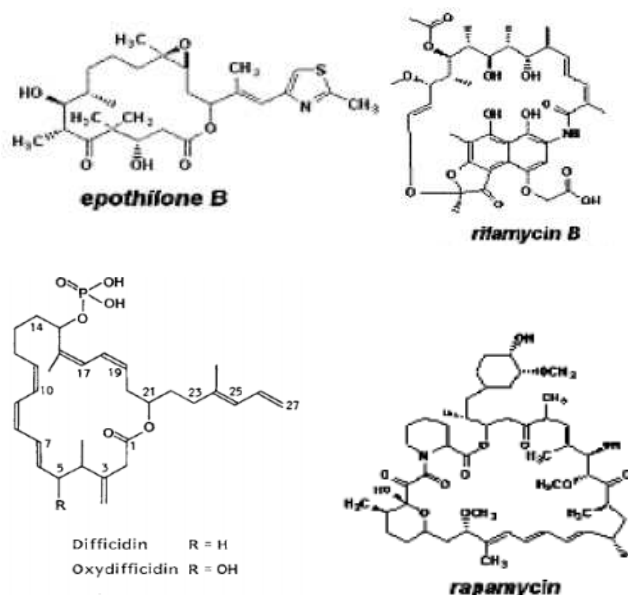


Figure 5 : Quelques exemples de polykétides

Source : Zimmerman *et al.*, 1986; Awad, 2005

1.12.2 Biosynthèse des polykétides

Les étapes initiales de la biosynthèse des polykétides sont assurées par des polykétides synthases (PKS). La réaction de condensation des acyl-CoA suit le même principe que la biosynthèse des acides gras par des acides gras synthases (AGS). La différence réside dans le fait que chez les AGS chaque cycle est complet et répétitif, alors que chez les PKS certaines réactions de réduction ou de déshydratation peuvent être supprimées (Hutchinson *et al.*, 2000; Gaitatzis *et al.*, 2001). Les polykétides fongiques dérivent exclusivement des unités acétyl-CoA contrairement aux polykétides bactériens qui peuvent incorporer également des unités propionyl, butyryl... (Simpson, 1995). La chaîne ainsi produite après élongation peut être transformée par cyclisation, lactonisation, ou formation des thioésters ou amides (Vining, 1990). Toutes ces transformations aboutissent à la production d'une gamme plus large de produits biologiquement actifs (O'Hagan, 1995).

1.13 Résistance des bactéries aux antibiotiques

1.13.1 Définition des antibiotiques

Les antibiotiques sont des molécules possédant la propriété de tuer (bactéricide) ou de limiter la propagation (bactériostatique) des bactéries. Lagrange et Reinert (1987) avaient défini les antibiotiques comme étant des composés chimiques, élaborés par un microorganisme ou produit par synthèse ou héli-synthèse et dont l'activité spécifique se manifeste à faible dose sur les microorganismes.

1.13.2 Mode d'action des antibiotiques

Les antibiotiques agissent à l'échelon moléculaire au niveau d'une ou de plusieurs étapes métaboliques indispensables à la vie de la bactérie. Ils agissent par :

- **Toxicité sélective au niveau de la :**

- Synthèse de la paroi bactérienne
- Membrane cytoplasmique
- Synthèse des protéines
- Synthèse des acides nucléiques

● **Inhibition compétitive** : dans ce cas l'antibiotique est un analogue structural, il interfère avec une fonction essentielle à la bactérie.

Une schématisation du mode d'action des antibiotiques est présentée dans la figure ci-dessous (Figure 6).

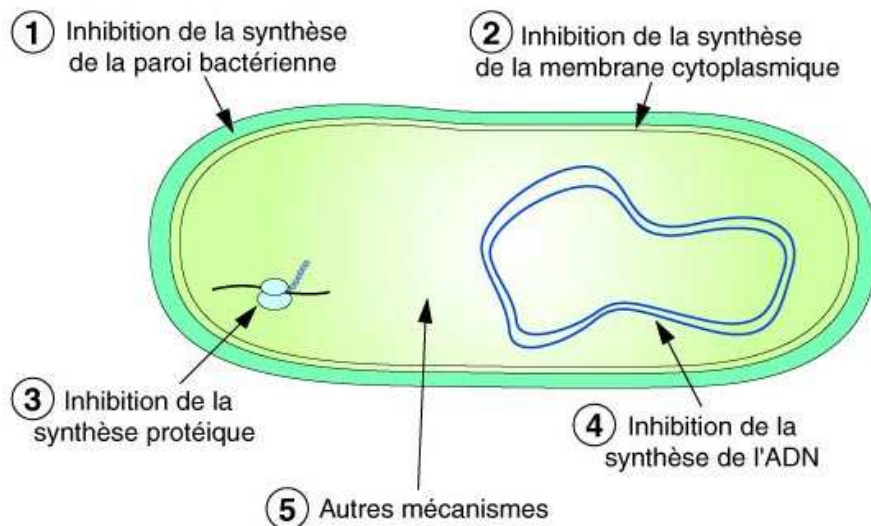


Figure 6 : Mode d'action des antibiotiques

Source : www.bacteriologie.net

1.13.3 Classification des antibiotiques

La classification des antibiotiques peut se faire selon :

-**L'origine** : élaboré par un organisme (naturel) ou produit par synthèse (synthétique ou semi synthétique)

-**Le mode d'action** : paroi, membrane cytoplasmique, synthèse des protéines, synthèse des acides nucléiques

-**Le spectre d'activité** : liste des espèces sur lesquelles les antibiotiques sont actifs (spectre étroit ou large)

-**La nature chimique** : très variable, elle est basée souvent sur une structure de base (ex : cycle β lactame) sur laquelle il y a hémi-synthèse. La classification selon la nature chimique permet de classer les antibiotiques en familles (β lactamines, aminosides, tétracyclines.....etc.).

Une classification selon le mode d'action est présentée dans le tableau ci-dessous (Tableau VI).

Tableau VI : Classification des antibiotiques selon le mode d'action (Cattoir, 2006 ; François *et al.*, 2003; Le Minor et Veron, 1989 ; Rabaud et May, 2000, 2007 ; Yala *et al.*, 2001)

Site d'action des antibiotiques	Famille des antibiotiques	Exemples d'antibiotiques
Inhibiteurs de la synthèse du peptidoglycane	β-lactamines	Pénicilline G, méthicilline, oxacilline, ampicilline, amoxicilline, céphalotine...
	Glycopeptides	Vancomycine
	Non classé	Fosfomycine
Inhibiteurs de la synthèse des protéines	Aminosides	Streptomycine, kanamycine, gentamycine...
	Macrolides-Lincosamides-Streptogramines	Erythromycine, clindamycine, virginiamycine...
	Tetracyclines	Tétracycline
	Phénicolés	Chloramphénicol
	Oxazolidinones	Linézolide
	Non classé	Acide fucidique
	Antibiotiques actifs sur les enveloppes membranaires	Polymixines
Inhibiteurs des acides nucléiques	Quinolones et fluoroquinolones	Acide nalidixique, ciprofloxacine
	Rifamycines	Rifamycine
	Nitrofuranes	Nitrofurantoiné
	Non classé	Novobiocine
	Inhibiteurs de la synthèse des folates	Sulfamides
2-4 diaminoptéridine		Triméthoprime
Sulfamides + triméthoprime		Sulfaméthoxazole+ Triméthoprime

1.13.4 Etude de la bactériostase : Détermination de la CMI

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est la plus faible concentration de l'antibiotique à laquelle le microorganisme testé ne présente aucune croissance visible à l'œil nu (Lei *et al.*, 2007). Cette valeur caractérise l'effet bactériostatique d'un antibiotique.

Des méthodes biologiques permettent de déterminer cette valeur pour chacun des antibiotiques vis à vis d'une souche bactérienne donnée; la détermination de la CMI par la méthode de dilution en milieu liquide est la plus facile ; une méthode par

diffusion en milieu solide utilisant des bandelettes imprégnées de gradients de concentration d'antibiotique (epsilomètre ou E-test) existe maintenant. La confrontation entre la CMI d'un antibiotique mesurée pour une souche bactérienne donnée et les concentrations habituelles connues de cet antibiotique dans le sérum de l'organisme humain lors des traitements antibiotiques permet de qualifier la souche bactérienne étudiée de « sensible » ou de « résistante » ou de « intermédiaire » à l'antibiotique étudié :

Une souche bactérienne est dite sensible (**S**) à un antibiotique quand la CMI de cet antibiotique pour cette souche est nettement inférieure aux concentrations usuelles de cet antibiotique obtenues *in vivo* lors d'un traitement par cet antibiotique administré aux doses usuelles.

Une souche bactérienne est dite résistante (**R**) à un antibiotique quand la CMI de cet antibiotique pour cette souche est supérieure aux concentrations maximales de cet antibiotique qui peuvent être atteintes *in vivo* lors d'un traitement par cet antibiotique administré aux doses maximales autorisées.

Une souche bactérienne est dite de sensibilité intermédiaire (**I**) à un antibiotique quand la CMI de cet antibiotique pour cette souche est inférieure mais proche des concentrations usuelles de cet antibiotique obtenues *in vivo* lors d'un traitement par cet antibiotique administré aux doses usuelles.

1.13.5 Les différents types de résistance aux antibiotiques

La résistance aux antibiotiques est la capacité d'un microorganisme à résister aux effets des antibiotiques. On distingue : La résistance naturelle ou intrinsèque qui est un caractère d'espèce qui touche toutes les bactéries de l'espèce considérée. Elle est stable, transmise à la descendance (elle a pour support génétique, le chromosome bactérien) mais elle n'est pas ou est peu transmissible sur un mode horizontal (d'une bactérie à l'autre au sein d'une même espèce ou entre espèces différentes) (Lozniewski *et al.*, 2010).

A côté de la résistance naturelle existe aussi des résistances acquises ; il s'agit d'un caractère qui ne concerne que quelques (ou parfois de nombreuses) souches d'une espèce donnée. La résistance acquise est moins stable, mais elle se propage souvent de façon importante dans le monde bactérien. Elle résulte d'une modification du capital génétique de la bactérie, lui permettant de tolérer une concentration d'antibiotique plus élevée que celle qui inhibe les souches sensibles

de la même espèce. Une bactérie peut ainsi acquérir une résistance aux antibiotiques par deux grands mécanismes génétiques. L'un a pour support le chromosome et définit une résistance chromosomique, l'autre a pour support les plasmides ou les éléments transposables ou les intégrons et ils définissent une résistance extra-chromosomique. La résistance chromosomique résulte d'une mutation et est transmissible selon un mode vertical de bactérie-mère à bactéries-filles. Par contre, la résistance extra-chromosomique ou plasmidique est liée à la synthèse de protéines additionnelles et non à une modification des constituants normaux de la bactérie et est transmissible selon un mode horizontal par conjugaison, transduction, transformation et modification (Lozniewski *et al.*, 2010).

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

2.1 Matériels

2.1.1 Les souches bactériennes et les conditions de culture

-Les souches testées : la présente étude a porté sur 13 souches dominantes de bactéries aérobies mésophiles comprenant 6 souches de *B. subtilis* (F1, C3, C6, H4, G2 et I7), 4 souches de *B. licheniformis* (E3, F9, J3 et E5) et 3 souches de *B. amyloliquefaciens* (A4, I8 et G3). Ces souches ont été isolées du *Bikalga* provenant de différents sites de production du Burkina Faso et identifiées dans des études préalables par Ouoba *et al.* (2008).

-les souches indicatrices : les souches indicatrices (40) obtenues de différentes sources et utilisées pour l'analyse des activités antimicrobiennes ont été offertes par le Department of Food Science, Food Microbiology de l'Université de Copenhague (Danemark) et la London Metropolitan University (Londres, UK) et sont listées dans le Tableau VII.

-Les souches de référence : *B. subtilis subsp. subtilis* DSM 10 (ATCC 6051), *B. subtilis subsp. spizizenii* DSM 15029, *B. licheniformis* DSM13 (ATCC 14580), *B. amyloliquefaciens* DSM7, *Bacillus vallismortis* DSM11031, *Bacillus atrophaeus* DSM7264, *Bacillus mojavensis* DSM9205, *Bacillus sonorensis* DSM 13779 et *B. pumilus* DSM27 utilisées comme souches de référence dans les essais PCR étaient la propriété du Department of Food Science, Food Microbiology de l'Université de Copenhague (Danemark).

Les souches bactériennes étaient conservées sous forme de stocks de culture congelées à -80°C dans un bouillon BHI (Oxoid CM113 5 Basingstoke, Hampshire, England) ou nutritif (Oxoid, CM0001) (pour *Micrococcus luteus*) supplémenté avec 20% de glycérol (v/v). Quand aux levures et moisissures, elles étaient conservées sous forme de stocks congelées à -80°C dans du bouillon Yeast Glucose Peptone et Malt Extract, respectivement. Avant leur utilisation, les souches de *Bacillus* étudiées et les souches de référence ont été repiquées 2 fois dans le bouillon BHI puis incubées à 37°C pendant 24 h tandis que les souches indicatrices ont été repiquées dans un bouillon approprié comme indiqué dans le tableau VII.

Tableau VII : Les souches indicatrices utilisées dans l'étude

Souches	Milieu*/ Température (°C)	Origine et/ou référence
Gram-positives		
<i>Bacillus cereus</i> MADM 1291	BHI/37	Gâteau d'anniversaire (intoxication alimentaire), Brésil
<i>Bacillus cereus</i> MADM 1561	BHI/37	Poulet cuit (intoxication alimentaire), Brésil
<i>Bacillus cereus</i> NVH391-98	BHI/37	Intoxication alimentaire, fourni par INRA, France ^a
<i>Bacillus cereus</i> 007525	BHI/37	Ragout (intoxication alimentaire) ^b
<i>Bacillus cereus</i> F4810-72	BHI/37	intoxication alimentaire ^c
<i>Bacillus cereus</i> NC 7401	BHI/37	intoxication alimentaire ^d
<i>Bacillus cereus</i> Ba18H2	BHI/37	Sonru ^e
<i>Bacillus cereus</i> F3752A/86	BHI/37	Collection de culture de l'Université métropolitaine de Londres
<i>Bacillus cereus</i> LMG13569	BHI/37	Collection de culture de l'Université métropolitaine de Londres
<i>Listeria monocytogenes</i> 057	BHI/37	Collection de culture de l'Université de Copenhague
<i>Listeria monocytogenes</i> L028	BHI/37	Collection de culture de l'Université de Copenhague
<i>Listeria monocytogenes</i> Scott A	BHI/37	Collection de culture de l'Université de Copenhague
<i>Listeria monocytogenes</i> NCTC 9863	BHI/37	Collection de culture de l'Université métropolitaine de Londres
<i>Micrococcus luteus</i> SKN 624	NA/30	Collection de culture de l'Université de Copenhague
<i>Micrococcus luteus</i> AT49732	NA/30	Collection de culture de l'Université métropolitaine de Londres
<i>Staphylococcus aureus</i> NCTC 10656	BHI/37	Collection de culture de l'Université métropolitaine de Londres
Gram-negatives		
<i>Salmonella</i> Typhimurium SKN 1155	BHI/37	Animale
<i>Salmonella</i> Typhimurium SKN 533	BHI/37	Collection de culture de l'Université de Copenhague
<i>Salmonella</i> Typhimurium O:1036340P/t49	BHI/37	Collection de culture de l'Université métropolitaine de Londres
<i>Salmonella</i> Nigeria SKN 1160	BHI/37	Graines de cacao
<i>Salmonella</i> Thompson SKN 565	BHI/37	Collection de culture de l'Université de Copenhague
<i>Salmonella</i> Oranienburg SKN 1157	BHI/37	Humaine
<i>Salmonella</i> Infantis SKN 557	BHI/37	Collection de culture de l'Université de Copenhague
<i>Salmonella</i> Enteridis P167807	BHI/37	Collection de culture de l'Université métropolitaine de Londres
<i>Yersinia enterocolitica</i> 6A28 SKN 599	BHI/37	Collection de culture de l'Université de Copenhague
<i>Yersinia enterocolitica</i> 8A30 SKN 601	BHI/37	Collection de culture de l'Université de Copenhague
<i>Yersinia enterocolitica</i> BT3ST5,27	BHI/37	Collection de culture de l'Université métropolitaine de Londres
<i>Escherichia coli</i> 81 nr.149 SKN 541	BHI/37	Collection de culture de l'Université de Copenhague
<i>Shigella dysenteriae</i> 370	BHI/37	Collection de culture de l'Université métropolitaine de Londres
<i>Shigella flexneri</i> USCC 2007	BHI/37	Collection de culture de l'Université métropolitaine de Londres
Levures et moisissures		
<i>Candida tropicalis</i>	YGP/30	Fura ^f
<i>Candida kefyr</i>	YGP/30	Fura ^f
<i>Candida krusei</i>	YGP/30	Fura ^f
<i>Candida albicans</i>	YGP/30	Sang
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i>	YGP/30	Collection de culture de l'Université de Copenhague
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> KVL 013	YGP/30	Collection de culture de l'Université de Copenhague
<i>Penicillium nordicum</i> 101763	PDA/25	Collection de culture de l'Université de Copenhague
<i>Penicillium camemberti</i> 112362	PDA/25	Collection de culture de l'Université de Copenhague
<i>Penicillium commune</i> 311.48	PDA/25	Collection de culture de l'Université de Copenhague
<i>Penicillium commune</i> 341.59	PDA/25	Collection de culture de l'Université de Copenhague

*BHI: Brain Heart Infusion; NA: Nutrient Agar; YGP: Yeast Glucose Peptone; PDA: Potato Dextrose Agar

^aLund et al., 2000; ^bStenfors and Granum, 2001; ^cTurnbull et al., 1979; ^dAgata et al. 1994; ^eThorsen et al., 2010;

^fLindegaard Pedersen et al., 2012.

2.1.2 Les milieux de culture (solides et liquides)

Ce sont :

- Bouillon Brain heart Infusion (BHI, Oxoid CM1135 Basingstoke, Hampshire, England)
- Gélose Brain Heart Infusion (BHI, Oxoid CM1136, Basingstoke, Hampshire, England)
- Bouillon nutritif (Oxoid CM0001, Basingstoke, Hampshire, England)
- Gélose nutritive (Oxoid CM0003, Basingstoke, Hampshire, England)
- Gélose Luria-bertani : 10% tryptone (Difco 0123-15-5; Sparks, MD, USA), 0,5% extrait de levure (Oxoid LP0021), 0,5 % NaCl et 1,5 % agar (Oxoid LP0013)
- Bouillon Yeast Glucose Peptone (YGP) : 1% (w/v) bactopeptone (211677, Becton, Dickinson, NJ, USA), 1% (w/v) glucose (Merck 38291142, Germany) et 0,5% (w/v) extrait de levure (Oxoid LP0021), pH 5,6 ± 2
- Gélose Yeast Glucose Peptone (YGP) : 1% (w/v) bactopeptone (211677, Becton, Dickinson, NJ, USA), 1% (w/v) glucose (Merck 38291142, Germany), 0,5% (w/v) extrait de levure (Oxoid LP0021) et 2% (w/v) agar, pH 5,6 ± 2
- Gélose potato dextrose (213400, Becton, Dickinson)
- Solution saline : 8,5 g/l NaCl et 1,5 g/l bactopeptone, pH 7
- 0,3% (w/v) oxgall bile (Sigma-Aldrich, Pcode: 30209037, Steinheim, Germany)

Tous les milieux de culture ont été préparés en suivant les instructions des fabricants.

2.1.3 Les tampons, les solutions et les enzymes

✓ Les tampons et les solutions

Ce sont :

- Ethylenediamine tétraacétique (EDTA)
- Tris-buffer : 20 mmol l⁻¹ Tris, 1 mmol l⁻¹ EDTA, pH 7
- 1xTE buffer : 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0
- 10x T.B.E : 108 g Trizma base ; 55 g acide borique ; 7,44 g EDTA ; H₂O distillée q.s.p 1 l, pH 8,3.
- 1x PBS (Phosphate Buffered Saline): 8 g NaCl ; 0,2 g KCl ; 1,44 g Na₂HPO₄ ; 0,24 g KH₂PO₄, pH 7,4.

- Bleu de Coomassie : 0,1 % Coomassie R-250, 40% éthanol, 10% acide acétique
- Solutions HCl et NaOH (1N)
- Acétone, éthanol, Acide trichloroacétique (TCA), éthylacétate, acétonitrile, beta-mercaptoéthanol, sulphate d'ammonium
- Les réactifs pour la PCR : 2x PCR Master Mix/Dream Taq Green, 25 mM MgCl₂, formamide, 2,5 mM dNTP, Dream Taq polymerase (Fermentas, Germany).

✓ **Les enzymes utilisées :**

- Trypsine du pancréas bovin (numéro de série T8003, Sigma -Aldrich),
- Papaïne lyophilisée (numéro de série P4762, Sigma -Aldrich),
- Protéase de *Streptomyces griseus* (numéro de série P6911, Sigma -Aldrich),
- Protéinase K de *Tritirachium album* (numéro de série P6556, Sigma -Aldrich),
- Catalase du foie bovin (numéro de série C1345, Sigma -Aldrich),
- Lipase II du pancréas de porc (numéro de série L3126, Sigma-Aldrich)
- α -amylase du pancréas de porc (numéro de série A3176)

2.1.4 Les graines d'*H. sabdariffa* L.

Les graines de d'*H. sabdariffa* utilisées dans la préparation du bouillon à base de graines broyées d'*H. sabdariffa* ont été achetées sur la place des marchés de Ouagadougou.

2.2 Protocole des études réalisées

2.2.1 Confirmation de l'identité des souches dominantes de *Bacillus* spp. isolées du *Bikalga*

2.2.1.1 Extraction de l'ADN bactérien

L'extraction d'ADN a été faite selon la méthode décrite par Hansen et Hendriksen (2001). Pour ce faire, les souches ont été repiquées sur la gélose Luria-Bertani (LB) puis incubées à 25°C pendant 18 h. Une masse de culture bactérienne a été ensuite mise en suspension dans 250 μ l de 1xTE buffer puis l'ensemble a été soumis à une lyse à 102°C pendant 10 minutes avant d'être centrifugé à 15 000 g pendant 10 minutes. Le surnageant contenant l'ADN a été collecté et conservé à 4°C pour être utilisé dans les essais PCR.

2.2.1.2 Regroupement des isolats par M13-PCR (Polymerase Chain Reaction)

Le M13-PCR a été réalisé selon le protocole décrit par Ehling-Schulz *et al.* (2005) en utilisant une amorce spécifique, le phage M13 ($5'$ GAGGGTGGCGGCTCT $_3'$) dérivé d'*E. coli*. Les PCR ont été conduites dans un volume final de 25 μ l contenant : 12.5 μ l de 2x PCR Master Mix/Dream Taq Green, 9,5 μ l d'eau pure stérile, 2 μ l d'amorce (10 pmol/ μ l) et 1 μ l de surnageant contenant l'ADN bactérien. Le programme d'amplification (Thermocycler; Applied Biosystems, 2720, Singapore) a été comme suit : une étape de dénaturation initiale de 3 minutes à 94°C, suivie de 35 cycles de 1 min à 94°C (dénaturation), 1 min à 40°C (hybridation), 8 min à 65°C (polymérisation), et une étape d'élongation finale de 16 min à 65°C. Les amplicons ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose (1,5%). Les fragments d'ADN révélés dans une solution de bromure d'éthidium (4 μ g/L) ont été visualisés aux rayons UV puis numérisés à l'aide d'un appareil photo numérique (Alphaimager system, Alpha Innotech, San Francisco, USA). Le groupage des souches selon la méthode de similarité de leurs profils d'ADN a été réalisé à l'aide du logiciel BioNumérics 4.50 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) comme décrit par Nielsen *et al.* (2007). Les ADN des souches de référence citées plus haut ont été utilisés dans les PCR pour la comparaison des profils.

2.2.1.3 Amplification et séquençage du gène *gyrB*

L'amplification du gène *gyrB* a été réalisée suivant la procédure décrite par Wang *et al.* (2007) en utilisant les amorces dégénérées UP1_F ($5'$ GAAGTCATCATGACCGTTCTGCAYGCNNGGNGNAARTTYGA $_3'$), et UP2R ($5'$ AGCAGGGTACGGATGTGCGAGCCRTCNCRTCNGCRTCNGTCAT $_3'$). Les PCR conduites dans un volume final de 50 μ l étaient constituées de: 5 μ l de 2x PCR Master Mix/Dream Taq Green, 4 μ l de 25 mM MgCl $_2$, 1 μ l de formamide, 4 μ l de 2.5 mM dNTP, 28,4 μ l d'eau pure stérile, 0.6 μ l de Dream Taq polymerase, 2 μ l de chaque amorce (forward et reverse de concentration 10 pmol/ μ l) et 3 μ l de surnageant contenant l'ADN bactérien. Le programme d'amplification (Thermocycler; Applied Biosystems, 2720, Singapore) a été comme suit: une étape de dénaturation

de 2 minutes à 94°C, suivi de 30 cycles de 1 min à 94 °C, 1 min à 66°C et 2 min à 72°C. L'amplification s'achevait avec une étape d'élongation finale de 7 min à 72°C. Le séquençage du gène *gyrB* a été réalisé par MacroGen Inc. Korea. Les séquences obtenues ont été analysées en utilisant le logiciel Chromas (<http://www.technelsysiu.com.au/chromas.html>). L'identification des espèces a ainsi été faite par comparaison avec des séquences de nucléotides du gène *gyrB* enregistrées dans la base de données GenBank en utilisant l'algorithme BLAST (Altschul *et al.*, 1997).

2.2.2 Etude de l'activité antimicrobienne des souches dominantes de *Bacillus* spp. isolées du *Bikalga*

2.2.2.1 Préparation des inocula des souches de *Bacillus* spp.

Les souches de *Bacillus* spp. conservées à -80°C dans du glycérol, ont été repiquées sur la gélose BHI et incubées à 37°C pendant 24 h. Pour chaque souche, un tube à essai contenant 10 ml de bouillon BHI stérile à pH 7 a été inoculé avec une boucle de culture prélevée sur une colonie isolée puis a été mis à incuber à 37°C sous agitation (120 tours/min) pendant 18 h. La culture obtenue a été centrifugée à 5 000 g / 4°C pendant 10 min à l'aide d'une centrifugeuse réfrigérante (Hettich Universal 30 RF). Le surnageant a été éliminé puis 10 ml de solution saline ont été ajoutés au culot. La concentration cellulaire (ufc/ml) des suspensions bactériennes obtenues a été déterminée par microscopie en utilisant une lame spéciale (Neubauer, Wertheim, Germany), puis des dilutions ont été effectuées en utilisant la solution saline pour obtenir une concentration bactérienne de 10⁵ ufc/ml.

2.2.2.2 Préparation des surnageants de culture des souches de *Bacillus* spp.

Chacune des souches de *Bacillus* spp. a été cultivée dans 50 ml de bouillon BHI contenus dans un flacon Erlenmeyer dans un bain-marie (GFL 1083; Bie and Berntsen, Rødovre, Denmark) sous agitation (120 tours/min) réglée à 37°C pendant 18 h. Après incubation, chaque culture a été centrifugée à 10000 g pendant 30 min à 4°C et le surnageant a été collecté. Le pH du surnageant a été ajusté à 7 avec du

NaOH 1N, puis le surnageant a été stérilisé par filtration à l'aide de filtres Millipore stériles de diamètre 0,45 µm (Tabbene *et al.*, 2009).

L'activité antimicrobienne a été déterminée pour les 13 souches dominantes de *Bacillus* spp. isolées du *Bikalga* contre 40 souches indicatrices.

2.2.2.3 Détermination de l'activité antimicrobienne par la méthode de diffusion de tache de culture dans l'agar

Les microorganismes indicateurs ont été cultivés une nuit (bactéries), ou 48 h (levures) ou 10 jours (moisissures) dans un milieu approprié et à une température adéquate tels que indiqués dans le tableau VII. Pour la détermination de l'activité antimicrobienne, 100 µl (approximativement 10^7 ufc/ml) de culture ont étéensemencés à la surface de la gélose potato dextrose (seulement pour les moisissures) ou mélangés avec 10 ml de gélose BHI, ou de gélose nutritive, ou encore de gélose YGP dans une boîte de Petri et laissés à solidifier. Puis, trois microlitres d'inoculum de *Bacillus* (approximativement 10^5 ufc/ml) ou 20µl (pour le test contre les moisissures) ont été déposés comme une tache sur la surface de la gélose et la boîte de Pétri a été incubée à la température optimale (comme indiqué dans le tableau VII) du microorganisme indicateur pendant 24 h (gélose BHI et nutritive), 48 h (gélose YGP) ou 7 jours (PDA). Après la période d'incubation, la présence d'une zone incolore autour de la tache a été observée et mesurée en mm. L'expérience a été réalisée en double en trois occasions séparées.

2.2.2.4 Détermination de l'activité antimicrobienne par la méthode de diffusion en puits du surnageant de culture dans l'agar

La méthode de diffusion en puits décrite par Motta et Brandelli (2002) et légèrement modifiée a été utilisée pour évaluer l'activité antimicrobienne des surnageants de culture des souches de *Bacillus* spp isolées du *Bikalga*. Brièvement, 100 µl (approximativement 10^7 ufc/ml) de culture de chaque indicateur ont été mélangés avec 10 ml de gélose BHI, ou de gélose nutritive ou encore de gélose YGP dans une boîte de Pétri. Après solidification, deux puits (diamètre 6 mm) ont été faits dans

chaque boîte de Pétri puis remplis avec 20 µl de surnageant filtré. Après incubation des boîtes à la température optimale du microorganisme indicateur (Tableau VII) pendant 24 h (gélose BHI et nutritif) et 48 h (gélose YGP), les diamètres des zones d'inhibition apparaissant autour des puits ont été mesurés en mm. Des bouillons BHI, nutritif, et YGP non inoculés ont été utilisés comme témoins négatifs sur chaque boîte de Pétri. Trois essais ont été réalisés en double.

2.2.3 Caractérisation physico-chimique des substances antimicrobiennes produites

Les propriétés physico-chimiques des substances antimicrobiennes produites par les *Bacillus* spp. du *Bikalga* ont été étudiées en utilisant les surnageants des souches H4, I8, A4 et G3. Les essais d'activité antimicrobienne ont été effectués en utilisant *B. cereus* NVH391-98 comme souche indicatrice.

2.2.3.1 Effet des enzymes, du pH, de la chaleur et des composés chimiques sur l'activité inhibitrice

La substance antimicrobienne présente dans le surnageant a été testée pour sa sensibilité vis-à-vis d'une variété d'enzymes (toutes obtenues de Sigma-Aldrich, Brøndby, Denmark) : la trypsine du pancréas bovin (numéro de série T8003), la papaïne lyophilisée (numéro de série P4762), la protéase de *Streptomyces griseus* (numéro de série P6911), la protéinase K de *Tritirachium album* (numéro de série P6556), la catalase du foie bovin (numéro de série C1345), la lipase II du pancréas de porc (numéro de série L3126) et l'α-amylase du pancréas de porc (numéro de série A3176). Toutes les enzymes ont été solubilisées dans des solutions tampons (phosphate buffered saline à 0,005M). La sensibilité de la substance inhibitrice a ainsi été testée en incubant à 37°C pendant 2 h, l'extrait de surnageant de culture de chaque souche additionné de l'enzyme à une concentration finale de 1mg/ml (Xie *et al.*, 2009). L'activité antimicrobienne résiduelle a ensuite été déterminée contre l'indicateur *B. cereus* NVH391-98 par la méthode de diffusion en puits. Le

surnageant non traité additionné de tampon, le tampon seul et les solutions d'enzymes ont été utilisés comme témoins. L'expérience a été conduite en double.

Pour analyser la résistance thermique de la substance inhibitrice, l'extrait de surnageant de culture a été exposé à des températures de 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 et 100°C pendant 30 min, autoclavage à 121°C pendant 15 min, 4°C pendant 30 jours et à -20°C pendant 30 jours. Après refroidissement à 37°C, l'activité antimicrobienne a été vérifiée vis-à-vis de *B. cereus* NVH391-98 par la méthode de diffusion en puits. L'expérience a été réalisée en double.

L'effet du pH sur l'activité antimicrobienne a été mis en évidence en variant le pH de l'extrait de surnageant de culture à des valeurs allant de 3 à 11 à l'aide de NaOH 1N et HCl 1N. Après incubation pendant 2 h à 37°C, le pH a été neutralisé à 7 (Cladera-Olivera *et al.*, 2004) et l'activité antimicrobienne a été testée contre *B. cereus* NVH391-98 par la méthode de diffusion en puits. Le surnageant non traité a été utilisé comme contrôle et l'essai a été réalisé en double.

Différentes solutions chimiques ont également été ajoutées au surnageant et les mélanges ont été incubés à 37°C pendant 1 h avant d'être testés pour leur activité contre *B. cereus* NVH391-98. Les solvants organiques tels que l'éthanol et l'acétone ont été utilisés à une concentration de 50% (v/v). L'EDTA, le beta-mercaptoéthanol et le TCA ont été utilisés à des concentrations de 10 mM, 10 mM et 100 mg/ml, respectivement (Motta *et al.*, 2007b). Après le traitement avec le TCA, les échantillons ont été centrifugés à 10,000g pendant 5 min et le surnageant a été neutralisé à pH 7. Après chaque traitement, les échantillons ont été testés pour leur activité résiduelle contre *B. cereus* NVH391-98 par la méthode de diffusion en puits. Les solutions chimiques et le surnageant dilué avec une solution saline (8.75g/LNaCl) ont été utilisés comme contrôles (Xie *et al.*, 2009) et les expériences ont été réalisées en double.

2.2.3.2 Estimation de la taille des composés antimicrobiens par SDS-PAGE

➤ Précipitation des protéines avec l'acide trichloroacétique

20 ml de surnageant de chaque souche H4, I8, A4 et G3 ont été précipités en y ajoutant 50% w/v d'acide trichloroacétique (TCA) pour obtenir une concentration finale de 11% TCA. Après centrifugation à 15, 000 g pendant 30 min à 4°C à l'aide

de la centrifugeuse Sorvall RC6, SS-34 (Norwalk, CT, USA), le culot de protéines a été lavé 2 fois avec 10 ml d'acétone. Les protéines ont ensuite été solubilisées dans 200 µl de solution tampon Tris avant d'être testées pour leur activité antimicrobienne contre *B. cereus* NVH391-98 par la méthode de diffusion en puits.

➤ **Précipitation des protéines avec le sulfate d'ammonium (purification partielle)**

Du sulfate d'ammonium a été ajouté à 20 ml de surnageant jusqu'à atteindre 20%, 30% et 40% de saturation. Après centrifugation à 10 000g pendant 15 min à 4°C les protéines obtenues ont été solubilisées dans 200 µl de tampon Tris et testées pour leur activité antimicrobienne contre *B. cereus* NVH391-98 en utilisant la méthode de diffusion en puits.

➤ **Détection directe de l'activité antimicrobienne sur gel d'électrophorèse**

Les protéines obtenues par précipitation avec le TCA, de même que celles obtenues par précipitation avec le sulfate d'ammonium ont été séparées sur le gel 20% RunBlue SDS-PAGE de la manière suivante : 10 µl de chaque échantillon en double ont été séparés avec le marqueur de protéine Mark 12 (LC5677, Invitrogen). Après électrophorèse (180 V, 90 mA, 50 min), le gel a été coupé en deux. Une partie a été traitée 1 heure durant par une solution de bleu de Coomassie, puis déteinte pendant 1 heure à l'aide d'une solution contenant 7,5 % d'acide acétique et 10 % d'éthanol avant d'être lavée dans l'eau distillée stérile pendant 4 heures. Le gel a ensuite été déposé dans une boîte de Pétri et recouverte avec 5 ml de gélose BHI (0,7% w/v) préalablement inoculé avec 10^5 cellules/ml de la souche indicatrice *B. cereus* NVH391-98. Après incubation de la boîte à 37°C pendant 24 h, le gel est observé pour la présence de zone d'inhibition (Motta *et al.*, 2007a).

L'autre partie du gel a subi une coloration à l'argent pour permettre une meilleure détection des bandes protéiques. Pour ce faire, le gel a été trempé pendant 1 h dans un mélange de solution (éthanol 40%, acide acétique 10%) puis lavé 3 fois dans de l'eau distillée. Le gel a ensuite été trempé dans une solution de thiosulfate de sodium 0,02% pendant 5 min avant d'être traité dans un mélange de solution glacée

(nitrate d'argent 0,1%; formaldéhyde 0,02%) pendant 1h. Après 3 rinçages d'1 min chacune, le gel a été développé dans un mélange de solution (carbonate de sodium 3%; formaldéhyde 0,05%) et la coloration s'est achevée dans une solution d'acide acétique 5% avec l'apparition des bandes peptidiques.

2.2.3.3 Analyse des substances antimicrobiennes par HPLC-MS

Les analyses HPLC-MS ont porté sur le surnageant des souches H4 et I8.

-Préparation des échantillons de la souche I8: les extraits de substances inhibitrices produites par la souche I8 ont été obtenus selon deux méthodes d'extraction :

Méthode 1 : Le surnageant de I8 a été préparé comme précédemment décrit et précipité avec 11% (w/v) de TCA. La suspension obtenue a été centrifugée à 15 000g pendant 30 min à 4°C. Ensuite, 10 ml d'acétone ont été ajoutés au culot de protéines obtenu et l'ensemble a été soumis à une centrifugation à 15 000g pendant 30 min à 4°C. Le surnageant résultant a ensuite été collecté et l'acétone évaporé sous hotte stérile avec le diazote (N₂) pour donner l'extrait qui sera utilisé pour les analyses HPLC-MS. Les extraits ont été préparés en double. L'un des extraits a été solubilisé dans 30% (v/v) d'éthanol et d'eau stérile avant d'être utilisé pour tester l'activité inhibitrice contre les microorganismes indicateurs tandis que l'autre a été conservé à -20°C pour l'analyse HPLC-MS. Le TCA collecté après la précipitation du surnageant de même qu'une solution de 30% d'éthanol et d'eau ont été utilisés comme témoins négatifs dans la détermination de l'activité antimicrobienne.

Méthode 2: Cinq ml de surnageant de culture de I8 ont été précipités avec 5 ml d'éthyl-acétate toute une nuit. Ensuite la phase supérieure (surnageant) a été transférée dans un nouveau récipient puis l'éthyl-acétate a été évaporé avec le N₂. Les échantillons ont été préparés en double. Comme précédemment, l'un d'eux a été solubilisé dans 30% (v/v) d'éthanol et d'eau et utilisé pour évaluer l'activité antimicrobienne pendant que l'autre a été conservé à -20°C pour les analyses

HPLC-MS. Une solution de 30% d'éthanol et d'eau et une solution d'éthyl-acétate ont été utilisées comme contrôles négatifs.

-Préparation des échantillons de la souche H4: le surnageant de culture précipité avec du sulfate d'ammonium à 20% de saturation a été séparé sur SDS-PAGE gel comme précédemment décrit. Cinq μg de BSA (Bovine Serum Albumin) ont également été séparés sur le gel comme témoin négatif pour vérifier la capacité d'extraction du gel. Puis le gel a été coloré au bleu de Coomassie. La bande protéique associée à l'activité antimicrobienne a été coupée et transférée dans un tube Eppendorf stérile. Le morceau de gel ainsi obtenu a été lavé avec 40% d'éthanol jusqu'à la décoloration puis traité avec une solution d'acétonitrile à 40% pendant 15 min. Après cette étape, le restant d'acétonitrile a été éliminée et une solution de bicarbonate d'ammonium 50 mM a été ajoutée au gel et le tube incubé à 37°C pendant une nuit. Enfin le surnageant a été transféré dans un nouveau tube Eppendorf, testé pour son activité antimicrobienne et conservé à -20°C pour l'analyse HPLC-MS.

-Analyses HPLC-MS

L'analyse des échantillons a été faite en utilisant un système Ultra High Performance Liquide Chromatography (UHPLC) (Dionex Ultime 3000, Sunnyvale, CA) couplée à une maxis G3 quadripolaire du spectromètre de masse (Bruker, Bremen, Allemagne) équipé d'une source électrospray (ESI). La séparation de 1-5 μl d'échantillon a été effectuée à 40°C en utilisant une colonne de 150 mm x 2,1mmID, 1,7 μm BEH C₁₈ (Waters, Milford, MA, USA). La phase mobile était constituée d'un mélange d'eau et d'acétonitrile (tous tamponnés avec 20mM d'acide formique) à un débit de 0,4mL/min avec un programme de gradient d'élution (commençant à partir de 10% d'acétonitrile et augmentant à 100% en 9 minutes, maintenu pendant 2 minutes). La spectrométrie de masse à haute résolution (High Resolution Mass Spectrometry : HRMS) a été réalisée en ESI⁺ avec une gamme d'acquisition de données de 10 balayages par seconde à 100-1500m/z et une résolution de 40000 FMWH. Le spectromètre de masse a été étalonné à l'aide de formate de sodium

automatiquement infusée avant chaque série d'analyses, fournissant une précision de masse de moins de 1,5 ppm en mode MS.

Les pics observés uniquement dans la base Chromatogramme de pointe des échantillons bioactifs ont été évalués pour la formation d'adduits, de $[M+H]^+$, $[M+2H]^{2+}$, $[M+NH_4]^+$, $[M+3H]^{4+}$, $[M+H+NH_4]^{2+}$, $[M+Na]^+$, $[M+H+Na]^{2+}$ et la masse précise ($\pm 0,005$ m/z) a été recherchée dans la base de données Antibase 2010 (37 185 métabolites secondaires microbiens) (Wiley & Sons, Hoboken, NJ). Des étalons d'iturine A (Sigma-Aldrich) et de surfactine (Sigma-Aldrich) ont été co-analysés. Les principaux pics du gel SDS ont également été manuellement inspectés pour l'état de charge et l'échantillon a été analysé avec des paramètres de masse élevée (m/z300-3500).

2.2.4 Recherche des gènes codant pour les bactériocines (subtiline, subtilosine, sublancine et éricine), les lipopeptides (iturine/mycosubtiline, surfactine/lichenysine et fengycine/plipastatine), les polykétides (difficidine, macrolantine et bacillaene) et la dipeptide bacilysine

Des PCR ont été réalisées pour déterminer la présence des gènes codant pour la synthèse de la subtiline, la subtilosine, l'ericine, la sublancine, l'iturine, la mycosubtiline/iturine, la surfactine/lichenysine, la fengycine, la plipastatine/fengycine, la bacillomycine, la difficidine, la bacillaene, la macrolactine et la bacilysine dans l'ADN des souches H4, I8, A4 et G3. L'ADN génomique de *B. amyloliquefaciens* DSM7 (*ituC*, *ituD*, *ituA*, *bacA/B*, *bmyA*, *baeA*), de *B. subtilis* subsp. *subtilis* DSM 10 (*srfA*, *sfp*, *ywiB*, *spoA*, *spoX*, *albA*) et de *B. subtilis* subsp. *spizizenii* DSM 15029 (*etnS*) ont été utilisés comme contrôles positifs. Les amorces oligonucléotidiques utilisées pour l'amplification sont consignées dans le tableau VIII.

Les réactions PCR ont été conduites dans un volume final de 25 μ l contenant : 12,5 μ l de 2x PCR Master Mix/Dream Taq Green (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Germany), 9,5 μ l d'eau pure stérile, 1 μ l de chaque reverse et forward primer (10 pmol/ μ l) et 1 μ l de surnageant contenant l'ADN bactérien. Les conditions de PCR

utilisées pour l'amplification (Thermocycler ; Applied Biosystems, 2720, Singapore) ont été celles décrites dans les références citées dans le tableau VIII.

Tableau VIII : Amorces oligo-nucléotidiques utilisées

Bactériocines/ Lipopeptides/ Polyketides	Gènes ciblés	Amorces	Séquence amorces (5'to 3')	Référence
Subtilosine	<i>ywiB, sboA albA</i>	Osbo P1N Osbo P2N	CCTCATGACCAGGACTTCGCCTT CGGTGCCGAGCGCTTCAGGT	Kaboré <i>et al.</i> 2012
Subtiline	<i>spaS</i>	SpaS_Fwd SpaS_Rev	CAAAGTTCGATGATTTTCGATTTGGAT GT GCAGTTACAAGTTAGTGTTTGAAGG AA	Sutyak <i>et al.</i> 2008
Ericine	<i>eriC, eriSa, eriSb</i>	Eric_F Eric_R	TCAACTGACCGGGCAGGAGC AAGTATTTGGCCTACAGCGACTCG	Kaboré <i>et al.</i> 2012
Sublancine	<i>sunT</i>	SUNT-F1 SUNT-R1	GCTTTGTTAGAAGGGGAGGAAT CTTGTCCCAACCCATAGGATAA	Chung <i>et al.</i> 2008
Iturine	<i>ituD</i>	ITUD-F1 ITUD-R1	TTGAAYGTCAGYGCSCCTTT TGCGMAAATAATGGSGTCGT	Chung <i>et al.</i> 2008
	<i>ituC</i>	ITUC-F1 ITUC-R1	CCCCCTCGGTCAAGTGAATA TTGGTTAAGCCCTGATGCTC	Chung <i>et al.</i> 2008
Iturine A	<i>ituA</i>	ITUD1F ITUD1R	GATGCGATCTCCTTGGATGT ATCGTCATGTGCTGCTTGAG	Saranghi <i>et al.</i> 2009
Surfactine	<i>srfA</i>	SRFA-F1 SRFA-R1	AGAGCACATTGAGCGTTACAAA CAGCATCTCGTTCAACTTTTAC	Chung <i>et al.</i> 2008
	<i>sfP</i>	SFP-F1 SFP-R1	ATGAAGATTTACGGAATTTA TTATAAAAGCTCTTCGTACG	Chung <i>et al.</i> 2008
	<i>srf/lch</i>	As1-F Ts2-R	CGCGGMTACCGVATYGAGC ATBCCTTTBTWDGAATGTCCGCC	Tapi <i>et al.</i> 2010
Mycosubtiline	<i>myc/itu</i>	Am1-F Tm1-R	CAKCARGTSAAAATYCGMGG CCDASATCAAARAADTTATC	Tapi <i>et al.</i> 2010
Fengycine	<i>fen</i>	Af2-F Tf1-R	GAATAYMTCGGMCGTMTKGA GCTTTWADKGAATSBCCGCC	Tapi <i>et al.</i> 2010
Pliopastatine	<i>pps</i>	Ap1-F Tp1-R	AGMCAGCKSGCMASATCMCC GCKATWWTGAARRCCGGCGG	Tapi <i>et al.</i> 2010
Bacillaene	<i>baeA</i>	baeR_F baeR_R	ATGTCAGCTCAGTTTCCGCA GATCGCCGTCTTCAATTGCC	Présente étude
Macrolactine	<i>mnIA</i>	mInA_F mInA_R	CCGTGATCGGACTGGATGAG CATCGCACCTGCCAAATACG	Présente étude
Bacily sine	<i>bacA/B</i>	bacA/B_F bacA/B_R	TGCTCTGTTATAGCGCGGAG GTCATCGTATCCCACCCGTC	Présente étude
Bacillomycine	<i>bmyA</i>	bmyA_F bmyA_R	CTCATTGCTGCCGCTCAATC CCGAATCTACGAGGGGAACG	Présente étude
Difficidine	<i>dfnA</i>	dfnA_F dfnA_R	GGATTCAGGAGGGGCATACCG ATTGATTAACGCGCCGAGC	Présente étude

Les amorces utilisées pour la détection des gènes de synthèse des polykétides macrolactine (*mInA*), bacillaene (*baeA*) et difficidine (*dfnA*), la dipeptide bacilysine (*bacA/B*) et la bacillomycine (*bmyA*) de la famille des iturines ont été désignées en se basant sur la séquence du génome de *B. amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* FZB42 (NC_009725) à l'aide du logiciel primer blast 3 (Ye *et al.*, 2012). Le programme d'amplification a été comme suit : une dénaturation initiale de 94°C pendant 4 min, suivie de 30 cycles de 94°C pendant 30 s, 57°C pendant 30 s, 72°C pendant 75 s et une élongation finale de 72°C pendant 7 min. Les amplicons ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose (1,5% (w/v), 120 V, 2 h). Les fragments d'ADN révélés dans une solution de bromure d'éthidium (4µg/L) ont été visualisés aux rayons UV puis numérisés à l'aide d'un appareil photo numérique (Alpha imager system, Alpha Innotech, San Francisco, USA).

2.2.5 Cinétique de croissance et de production des substances inhibitrices

Des inocula des souches A4, I8, G3 et H4 ont été préparés comme précédemment décrit. Puis un inoculum de chaque souche a été ensemencé dans un Erlenmeyer de 250 ml contenant 50 ml de bouillon BHI pour avoir une concentration initiale de 10^2 – 10^3 ufc/ml. Les Erlenmeyers contenant les cultures ont ensuite été incubés à 37°C dans un bain-marie (GFL 1083; Bie and Berntsen, Rødovre, Denmark) sous agitation (120 tpm). Des échantillons ont été aseptiquement prélevés chaque 2 h pendant 24 h pour déterminer la croissance bactérienne, le pH et l'activité antimicrobienne des surnageants de culture. La croissance bactérienne a été déterminée en mesurant la densité optique (DO_{600}) à l'aide d'un spectrophotomètre (O.D; Shimadzu, Kyoto, Japan) et en déterminant la population bactérienne (ufc/ml) par dénombrement sur gélose BHI. Le pH de chaque échantillon a également été enregistré (PHM 250, Radiometer Analytical, Brønshøj, Denmark). L'activité antimicrobienne des surnageants de culture de chaque échantillon a été évaluée par la méthode de diffusion en puits dans l'agar contre *B. cereus* NVH391-98.

2.2.6 Essais de production de substances inhibitrices par les souches A4, I8, G3 et H4 dans le bouillon des graines broyées d'*H. sabdariffa*

Le bouillon des graines broyées d'*H. sabdariffa* a été préparé comme suit : les graines d'*H. sabdariffa* obtenues sur la place des marchés de Ouagadougou ont été broyées en poudre à l'aide d'un broyeur (Bosch MKM 6003). Une quantité (5 g) de la poudre ainsi obtenue a été cuite dans de l'eau distillée (50 ml) dans un Erlenmeyer de 250 ml pendant 3-4 h. Après cuisson, le pH du bouillon a été ajusté à $7,4 \pm 0,2$ et le bouillon a été stérilisé à 121°C pendant 15 min. Pour l'essai, chaque souche a étéensemencée (1% v/v à une concentration initiale de 10^5 ufc/ml) dans un Erlenmeyer contenant le bouillon des graines broyées d'*H. sabdariffa* et le flacon a été incubé dans un bain-marie (GFL 1083; Bie and Berntsen, Rødovre, Denmark) à 37°C sous agitation (120 tpm). Des échantillons ont été collectés après 0, 12, 18 et 24 h d'incubation pour déterminer la croissance bactérienne (ufc/ml) et le pH (PHM 250, Radiometer Analytical, Brønshøj, Denmark). A partir de 2 ml de culture de chaque échantillon, le surnageant a été préparé comme précédemment décrit et a été utilisé pour déterminer l'activité antimicrobienne contre *B. cereus* NVH391-98 par la méthode de diffusion en puits dans l'agar. Les surnageants des souches A4, I8, G3 et H4 cultivées dans le bouillon BHI ont été utilisés comme témoins positifs. L'expérience a été réalisée en double en deux occasions différentes.

2.2.7 Résistance des *Bacillus* spp. dominantes du *Bikalga* aux antibiotiques

2.2.7.1 Détermination de la sensibilité des souches aux antibiotiques : détermination des concentrations Minimales Inhibitrices (CMI)

Les Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) ont été déterminées pour 24 antibiotiques (Tableau IX) en utilisant la méthode de dilution en milieu liquide et en milieu gélosé avec le bouillon BHI et l'agar BHI. Cela a été fait suivant les normes établies par le CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute, Wayne, Etats-Unis). Les concentrations critiques d'antibiotiques définies pour les *Bacillus* spp. ont été utilisées pour catégoriser les bactéries de sensibles ou de résistantes selon la description de l'autorité européenne de sécurité alimentaire (European Food safety Authority, EFSA, 2008). Pour les antibiotiques non inclus dans la liste de l'EFSA, les concentrations critiques pour des bactéries Gram-positives étroitement liées aux *Bacillus* spp. ont été utilisées (Tableau IX).

Tableau IX: Concentrations critiques des antibiotiques et les gènes de résistance investigués

Antibiotiques	Concentrations critiques proposées (µg/ml)	Source	Gènes de résistance recherchés
Avilamycin	≥ 16	CLSI (<i>Enterococcus</i>)	
Bacitracin	≥ 16	Jensen <i>et al.</i> (2001)	
Chloramphenicol	> 8	EFSA (2008)	<i>catpP501</i>
Ceftiofur	≥8	CLSI (<i>Staphylococcus</i>)	
Ciprofloxacin	≥ 4	Jensen <i>et al.</i> (2001)	
Daptomycin	≥ 8	CLSI (<i>Enterococcus</i>)	
Erythromycin	> 4	EFSA (2008)	<i>erm(A), erm(B), erm(C)</i>
Flavomycin	≥ 16	CLSI (<i>Enterococcus</i>)	
Florfenicol	≥ 32	CLSI (<i>Staphylococcus</i>)	
Gentamicin	> 4	EFSA (2008)	
Kanamycin	> 8	EFSA (2008)	<i>aph(3'')-I, aph(3'')-III, ant(2'')-I</i>
Linezolid	≥ 4	CLSI (<i>Staphylococcus</i>)	
Penicillin	≥ 0.25	Luna <i>et al.</i> (2007)	<i>blaZ</i>
Salinomycin	≥ 16	CLSI (<i>Enterococcus</i>)	
Spectinomycin	≥128	CLSI (<i>Staphylococcus</i>)	
Streptomycin	> 8	EFSA (2008)	<i>aadA, aadE, StrA, StrB,</i>
Sulphamethoxazol	≥ 256	CLSI (<i>Staphylococcus</i>)	
Synercid	> 4	EFSA (2008)	
Tetracyclin	> 8	EFSA (2008)	
Tiamulin	≥ 32	CLSI (<i>Staphylococcus</i>)	
Tigecycline	> 0.5	Luna <i>et al.</i> (2007)	
Trimethoprim	≥ 16	CLSI (<i>Staphylococcus</i>)	<i>dfr(A)</i>
TMP+SMX	≥4	Luna <i>et al.</i> (2007)	
Vancomycin	> 4	EFSA (2008)	

2.2.7.2 Recherche de quelques gènes de résistance aux antibiotiques

Pour certains antibiotiques vis-à-vis desquels les bactéries étudiées ont présenté une résistance, des PCR ont été réalisées pour voir si ces bactéries ne possédaient pas dans leur ADN les gènes de résistance à ces antibiotiques. De ce fait, une amplification des gènes associés à la résistance au chloramphénicol (*catpP501*), l'érythromycine (*erm(A), erm(B), erm(C)*), la kanamycine (*aph(3'')-I, aph(3'')-III, ant(2'')-I*), la pénicilline (*blaZ*), la streptomycine (*aadA, aadE, StrA, StrB*), et la triméthoprim (*dfr(A)*) a été faite selon le protocole décrit par Jensen *et al.* (1999). Toutes les PCR ont été conduites selon le programme de température suivant: une dénaturation initiale à 94°C pendant 3 min, 25 ou 35 cycles de dénaturation à 94°C pendant 1 min, 45–65°C pendant 1 min, selon la température d'hybridation de chaque amorce (Tableau X) et une étape d'élongation à 72°C pendant 1 min puis l'amplification a été achevée avec une étape d'élongation finale à 72°C pendant 10

min. 10 µl de produit PCR ont ensuite été séparés par électrophorèse sur 1.5% de gel d'agarose (120 V, 2 h) et visualisés après coloration au bromure d'éthyldium.

Tableau X : Amorces utilisées pour la détection des gènes de résistance aux antibiotiques

Gènes de résistance	Amorces	Température d'hybridation (°C)
<i>catpIP501</i>	5'-GGATATGAAATTTATCCCTC-3' 5'-CAATCATCTACCCTATGAAT-3'	47
<i>erm(A)</i>	5'-AAGCGGTAACCCCTCTGAG-3' 5'-TCAAAGCCTGTCGGAATTGG-3'	55
<i>erm(B)</i>	5'-CATTTAACGACGAAACTGGC-3' 5'-GGAACATCTGTGGTATGGCG-3'	52
<i>erm(C)</i>	5'-CAAACCCGTATTCCACGAGG-3' 5'-ATCTTTGAAATCGGCTCAGG-3'	48
<i>aph(3'')-I</i>	5'-AACGTCTTGCTCGAGGCCGCG-3' 5'-GGCAAGATCCTGGTATCGGTCTGCG-3'	68
<i>aph(3'')-III</i>	5'-GCCGATGTGGATTGCGAAAA-3' 5'-GCTTGATCCCCAGTAAGTCA-3'	52
<i>ant(2'')-I</i>	5'-GGGCGCGTCATGGAGGAGTT-3' 5'-TATCGCGACCTGAAAGCGGC-3'	67
<i>blaZ</i>	5'-CAGTTCACATGCCAAAGAG-3' 5'-TACACTCTTGCGGTTTC-3'	54
<i>aadA</i>	5'-ATCCTTCGCGCGATTTTG-3' 5'-GCAGCGCAATGACATTCTTG-3'	56
<i>aadE</i>	5'-ATGGAATTATTCCCACCTGA-3' 5'-TCAAACCCCTATTAAGCC-3'	50
<i>StrA</i>	5'-CTTGGTGATAACGGCAATTC-3' 5'-CCAATCGCAGATAGAAGGC-3'	55
<i>StrB</i>	5'-ATCGTCAAGGGATTGAAACC-3' 5'-GGATCGTAGAACATATTGGC-3'	56
<i>dfr(A)</i>	5'-CCTTGGCACTTACCAAATG-3' 5'-CTGAAGATTCTGACTTCCC-3'	50

2.2.8 Résistance à l'acide et tolérance à la bile des souches de *Bacillus* spp. dominantes du *Bikalga*

2.2.8.1 Préparation des inocula des souches de *Bacillus* spp.

Chacune des 13 souches de *Bacillus* spp. a été repiquée sur la gélose BHI et incubée à 37°C pendant 24 h. Une colonie a ensuite été ensemencée dans 10 ml de bouillon BHI, pH 7, puis le bouillon a été incubé sous agitation (120 tpm) à 37°C pendant 18 h. La culture obtenue a été centrifugée à 5000 g (4°C) pendant 10 min puis 10 ml de solution saline stérile à pH 7 ont été ajoutés au culot. La concentration cellulaire a ensuite été déterminée au microscope en utilisant la lame Neubauer

(Wertheim, Germany) et des dilutions ont été faites à l'aide de la solution saline pour obtenir une concentration cellulaire approximative de 10^6 ufc/ml.

2.2.8.2 Effet de l'acidité sur les souches

La résistance à l'acide a été évaluée en utilisant le bouillon BHI pH 2,5 selon la méthode décrite par Klingberg *et al.* (2005). 100 µl de suspensions cellulaires de chaque *Bacillus* contenant approximativement 10^6 ufc/ml ont été inoculés dans 10 ml de bouillon BHI, pH 2,5 puis incubés à 37°C. Le même volume a été inoculé dans du bouillon BHI à pH 7 pour servir de témoin. Des prélèvements ont été effectués à 0, 1, 2, 3 et 4 h. Chaque prélèvement a subi des dilutions décimales et a été ensemencé dans la gélose BHI, puis les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 24 h. Après la période d'incubation, les colonies ont été comptées et le nombre de cellules (ufc/ml) a été calculé selon la norme ISO 7218 (2007). Deux essais ont été réalisés pour chaque souche.

2.2.8.3 Effet de la bile sur les souches

La tolérance à la bile des souches de *Bacillus* spp. a été examinée en utilisant la méthode décrite par Klingberg *et al.* (2005). Pour ce faire, 100 µl de suspensions cellulaires de chaque souche de *Bacillus* contenant approximativement 10^6 ufc/ml ont été inoculés dans 10 ml de bouillon BHI, pH 7 contenant 0,3% (w/v) bile oxgall (Sigma-Aldrich, Pcode: 30209037, Steinheim, Germany). Le même volume a été inoculé dans du bouillon BHI sans bile oxgall pour servir de témoin. Les cultures ont ensuite été incubées à 37°C et des prélèvements ont été effectués à 0, 1, 2, 3 et 4 h. Chaque prélèvement a subi des dilutions décimales et a été ensemencé dans la gélose BHI, puis les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 24 h. Après la période d'incubation, les colonies ont été comptées et le nombre de cellules (ufc/ml) a été calculé selon la norme ISO 7218 (2007). Deux essais ont été réalisés pour chaque souche.

La tolérance des *Bacillus* à la bile après exposition à l'acide a également été étudiée. Pour ce faire, 100 µl d'inoculum de chaque *Bacillus* ont d'abord été ensemencés dans 10 ml de bouillon BHI, pH 2.5. Après incubation à 37°C pendant 3

h, la culture bactérienne a été centrifugée (5000g, 10 min), 10 ml de bouillon BHI contenant 0.3% (w/v) de bile oxgall ont été ajoutés au culot et le tube a été incubé à 37°C sous agitation. La croissance bactérienne a été vérifiée après 24 h d'incubation (en comptant à partir de la première période d'incubation) par dénombrement sur gélose BHI.

2.2.9 Méthodes d'analyses statistiques des données

Les données ont été analysées et traitées sur EXCEL suivant une statistique descriptive avec des calculs de paramètres de position (moyenne) et de dispersion (écart-type).

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

3.1 Résultats

Le présent travail a consisté à une caractérisation de plusieurs souches de *Bacillus* spp. en vue de la mise au point de starters pour une fermentation contrôlée du *Bikalga*. Ces souches identifiées par le séquençage du gène 16S rRNA comme *B. subtilis* et *B. licheniformis* dans des études antérieures (Ouoba *et al.*, 2008), représentent les microorganismes responsables de la fermentation naturelle du *Bikalga* provenant de différentes régions du Burkina Faso. En prélude à leur caractérisation, il était important de préciser l'identité des souches en utilisant des méthodes de biologie moléculaire plus discriminatoires telle que le séquençage du gène *gyrB*. Cela a ainsi permis de confirmer l'identité des *B. subtilis* G2, C3, C6, H4, F1, 17 et de montrer qu'ils appartiennent à la sous-espèce *subtilis*. L'identité des *B. licheniformis* E3 et F9 a également été confirmée. Cependant, les souches A4, I8 et G3 antérieurement identifiées comme *B. subtilis* ont été ré-identifiées comme *B. amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* tandis que les souches J3 et E5 auparavant identifiées comme *B. subtilis* ont été reclassées comme *B. licheniformis*. L'ensemble des souches ré-identifiées ont alors été caractérisées. Les premiers travaux de caractérisation ont porté uniquement sur les souches de *B. subtilis* ssp. *subtilis* et de *B. licheniformis* (Compaoré *et al.*, 2013a). L'article 1 décrit la capacité des six souches de *B. subtilis* ssp. *subtilis* et des quatre souches de *B. licheniformis* à inhiber la croissance d'une multitude de microorganismes pathogènes. Il renseigne en outre sur les caractéristiques et l'identité des substances antimicrobiennes produites par une souche sélectionnée de *B. subtilis* ssp. *subtilis* nommée H4. Ensuite, les trois souches de *B. amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* faisant également partie de la flore dominante du *Bikalga* ont été caractérisées par rapport à leurs propriétés antimicrobiennes (Compaoré *et al.*, 2013b). Cet article donne aussi les caractéristiques et l'identité des substances inhibitrices produites par ces souches. Enfin, la résistance des 13 souches de *Bacillus* spp. aux antibiotiques, au pH acide, ainsi que leur capacité à tolérer la bile ont également été déterminés comme critères complémentaires de sélection de nos cultures starters (Compaoré *et al.*, 2013c).

3.1.1 Résumé de l'article 1

Six souches de *B. subtilis* ssp. *subtilis* et quatre souches de *B. licheniformis* ont été étudiées par rapport à leur capacité d'inhiber une large gamme (36) d'indicateurs de bactéries pathogènes comprenant des bactéries Gram-positives et Gram-négatives ainsi que des levures pathogènes. L'inhibition a été examinée par des tests de diffusion de tache de culture et de diffusion en puits du surnageant de culture dans l'agar BHI. Après examen de l'activité inhibitrice des différentes souches, *B. subtilis* ssp. *subtilis* H4 a été sélectionné pour étudier en détail les caractéristiques de sa substance antimicrobienne. La capacité inhibitrice de H4 contre *B. cereus* a également été évaluée dans un bouillon préparé à base de graines broyées d'*H. sabdariffa* afin de tester sa capacité en milieu réel.

Les *Bacillus* spp. ont montré une capacité variable à inhiber la croissance des indicateurs selon la méthode utilisée. A partir de la méthode de diffusion de tache de culture dans l'agar, il a été observé que toutes les souches de *Bacillus* (à l'exception de *B. subtilis* ssp. *subtilis* C3) étaient capables d'inhiber la croissance d'au moins un indicateur de bactérie pathogène. Les bactéries pathogènes inhibées comprenaient des indicateurs Gram-positifs et Gram-négatifs à savoir *B. cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Oranienburg, *Salmonella* Nigeria, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Infantis, *M. luteus*, *Yersinia enterocolitica*. Quant aux surnageants de cultures pures, ils ont uniquement inhibé les indicateurs de bactéries pathogènes Gram-positifs dont *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *M. luteus* et *S. aureus*. Aucune souche de levure pathogène n'a été inhibée par les *Bacillus* étudiés. Des 10 souches étudiées, les surnageants de *B. subtilis* spp *subtilis* G2, H4 et F1 ont montré les meilleures capacités inhibitrices et H4 a été sélectionnée pour caractériser et identifier sa substance antimicrobienne.

La caractérisation de la substance antimicrobienne produite par H4 a révélé que l'activité inhibitrice était détectée en milieu de la phase exponentielle de croissance, qu'elle était sensible à la protéase et à la trypsine mais était résistante à l'action de la protéinase K et de la papaïne. Il a également été trouvé que le traitement à l' α -amylase et à la lipase II entraînait une perte complète de l'activité antagonistique du surnageant de H4 indiquant qu'un fragment de sucre et un fragment lipidique sont nécessaires à l'activité. Lorsque la substance inhibitrice de H4 a été soumise au

traitement avec le beta-mercaptoéthanol, une perte significative d'activité a été observée indiquant la présence de ponts disulfures. L'activité antimicrobienne de H4 était également résistante à la chaleur (jusqu'à 121°C pendant 15 min), au froid (4°C et -20°C pendant 30 jours), de même qu'aux pH acide et basique (pH 3-10). Les gènes de synthèse de la subtilosine (*yiwB*, *sboA*, *spoX*, *albA*), de la subtiline (*spaS*), de la surfactine (*srfA*, *SfP*, *Srf/lch*) et de la plipastatine (*pps*) ont été détectés dans l'ADN de H4 par PCR (annexe 2). L'analyse SDS-PAGE des protéines précipitées (avec le TCA et avec 20% de sulfate d'ammonium) du surnageant de H4 a révélé que l'activité inhibitrice de H4 était liée à une seule bande protéique de poids moléculaire d'environ 4000 Da. L'HPLC-MS conduite après extraction des composés antimicrobiens du morceau de gel contenant cette bande a cependant permis d'identifier des surfactines et une protéine ayant une masse monoisotopique de 3346,59 Da différant de la masse molaire de la subtilosine (3400,57 Da) et de la subtiline (3319,56 Da). En outre, aucune des bactériocines subtiline et subtilosine ne contient des résidus de lipide, des résidus de sucre ou des ponts disulfures. Ces résultats suggèrent que *B. subtilis* ssp. *subtilis* H4 produit une nouvelle bactériocine dont l'activité inhibitrice est probablement améliorée par la présence des surfactines. Au regard de ces résultats, *B. subtilis* ssp. *subtilis* H4 se présente comme un potentiel candidat pouvant être utilisé comme culture starter durant la fermentation contrôlée du *Bikalga* afin d'assurer la qualité sanitaire du produit. Cependant, malgré une bonne croissance de H4 dans le bouillon des graines broyées d'*H. sabdariffa*, aucune activité antimicrobienne du surnageant collecté à 12, 18 et 24 h n'a été observée.

Les résultats de ces travaux ont également été valorisés sous la forme d'un Poster (annexe 3) présenté à la conférence annuelle de l'Association Internationale de Protection des Aliments (IAFP 2013), 28-31 Juillet 2013, Charlotte, Caroline du Nord, Etats Unis d'Amérique.

3.1.2 Article 1 publié: Coproduction of surfactin and a novel bacteriocin by *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* H4 isolated from *Bikalga*, an African alkaline *Hibiscus sabdariffa* seed fermented condiment.

Compaoré, C.S., Nielsen, D.S., Ouoba, L.I.I., Berner, T.S., Nielsen, K.F., Sawadogo-Lingani, H., Diawara, B., Ouédraogo, G.A., Jakobsen, M., Thorsen, L., 2013.

Publié dans International Journal of Food Microbiology 162: 297-307.



Co-production of surfactin and a novel bacteriocin by *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* H4 isolated from *Bikalga*, an African alkaline *Hibiscus sabdariffa* seed fermented condiment

Clarisse S. Compaoré^{a,b,c,*}, Dennis S. Nielsen^b, Labia I.I. Ouoba^e, Torben S. Berner^b, Kristian F. Nielsen^d, Hagrétou Sawadogo-Lingani^a, Bréhima Diawara^a, Georges A. Ouédraogo^c, Mogens Jakobsen^b, Line Thorsen^b

^a Département Technologie Alimentaire (DTA/IRSAT/CNRST), Ouagadougou 03 BP 7047, Burkina Faso

^b Department of Food Science, Faculty of Science, University of Copenhagen, Rolighedsvej 30, 1958 Frederiksberg C, Denmark

^c Institut du Développement Rural/Université Polytechnique de Bobo, BAMS, 01 BP 10 91 Bobo-Dioulasso, Burkina Faso

^d DTU Systems Biology, Department of Systems Biology, Center for Microbial Biotechnology, Technical University of Denmark, 2800 Kgs. Lyngby, Denmark

^e London Metropolitan University, FLSC/SHS, Microbiology Research Unit, 166-220 Holloway Road, London N7 8DB, United Kingdom

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 December 2012

Received in revised form 19 January 2013

Accepted 21 January 2013

Available online 29 January 2013

Keywords:

Bacillus

Bikalga

Antimicrobial activity

Surfactin

Bacteriocin

ABSTRACT

Bikalga is a *Hibiscus sabdariffa* seed fermented condiment widely consumed in Burkina Faso and neighboring countries. The fermentation is dominated by *Bacillus subtilis* group species. Ten *B. subtilis* subsp. *subtilis* (six isolates) and *Bacillus licheniformis* (four isolates) isolated from traditional *Bikalga* were examined for their antimicrobial activity against a panel of 36 indicator organisms including Gram-positive and Gram-negative bacteria and yeasts. The *Bacillus* spp. isolates showed variable inhibitory abilities depending on the method used. Both Gram-positive and Gram-negative bacteria were inhibited in the agar spot assay while only Gram-positive pathogens were inhibited in the agar well diffusion assay. Cell free supernatants (CFS) of pure cultures of 3 *B. subtilis* subsp. *subtilis* (G2, H4 and F1) strains inhibited growth of *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*, while CFS of 2 *B. licheniformis* (E3 and F9) strains only inhibited *M. luteus*. The antimicrobial substance(s) produced by *B. subtilis* subsp. *subtilis* H4 was further characterized. The antimicrobial substance(s) produced by H4 was detected from mid-exponential growth phase. The activity was sensitive to protease and trypsin, but resistant to the proteolytic action of proteinase K and papain. Treatment with α -amylase and lipase II resulted in a complete loss of antimicrobial effect, indicating that a sugar moiety and lipid moiety are necessary for the activity. Treatment with mercapto-ethanol resulted in a significant loss, indicative of the presence of disulfide bridges. The antimicrobial activity of H4 was heat resistant and active at pH 3–10. PCR detection of *yiwB*, *sboA*, *spoX*, *albA* and *spaS*, *emS* genes and genes coding for surfactins and lipopstatins (fengycins) indicated a potential for subtilosin, subtilin and lipopeptide production, respectively. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was carried out and a single band of approximately 4 kDa had antimicrobial activity. Ultra high performance liquid chromatography-time of flight mass spectrometry (UHPLC-TOFMS) analysis of the 4 kDa band allowed identification of surfactin and a protein with a monoisotopic mass of 3346.59 Da, which is dissimilar in size to subtilosin and subtilin. Surfactin is a cyclic lipopeptide, which contains a β -hydroxy fatty acid, but no di-sulfide bridges or sugar residues. The complete loss of activity upon amylase treatment indicates that surfactin was not responsible for the observed antimicrobial effect. However, it cannot completely be ruled out that surfactin acts synergistically with the detected protein, though further investigations are needed to confirm this.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Bikalga is a fermented food condiment based on *Hibiscus sabdariffa* seeds that serves as a flavoring agent in soups and sauces or as low-

cost protein snack in Burkina Faso. It is also known in other African countries under different names such as dawadawa bosto in Niger, datou in Mali, furundu in Sudan and mbuja in Cameroun. The production of *Bikalga* is a traditional process and involves boiling, fermentation, steaming and drying. *Bacillus* spp., especially *Bacillus subtilis* group members have been shown to be the dominant bacteria involved in the fermentation of *H. sabdariffa* seeds into *Bikalga* (Ouoba et al., 2008a). *Bikalga*, like other fermented food condiments forms a

* Corresponding author at: Département Technologie Alimentaire (DTA/IRSAT/CNRST), Ouagadougou 03 BP 7047, Burkina Faso. Tel.: +226 70 04 78 96.
E-mail address: compadara@yahoo.fr (C.S. Compaoré).

significant part of the diets of many people in developing countries (Steinkraus, 1996). However, the fermentation step is spontaneous, uncontrolled and usually with varied fermentation times, temperatures and microbiological profiles, resulting in products inconsistent in quality attributes. Occasionally pathogenic bacteria such as *Bacillus cereus*, *Staphylococcus* spp., *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., and *Clostridium* spp. have been found in alkaline fermented foods giving rise to concern about the safety (Parkouda et al., 2009). There is consequently a need to apply modern biotechnological techniques like the use of starter cultures in improving traditional food processing technologies (Achi, 2005). The use of starter cultures with desirable technological properties dominating the fermentation process and preventing the growth of pathogenic and spoilage microorganisms during controlled fermentation of African fermented condiments would lead to products of consistent taste and quality, as well as improved marketability (Holzapfel, 2002; Oguntoyinbo et al., 2007; Ouoba et al., 2008b). Members of the *B. subtilis* group sensu lato include a variety of industrially important species that have a history of safe use in food and industry (Pedersen et al., 2002) and are considered good producers of antimicrobials including bacteriocins, Bacteriocin-like substance (BLS) and lipopeptide antibiotics (Abriouel et al., 2010; Stein, 2005). The proteinaceous natures of bacteriocins imply a putative degradation in the gastrointestinal tract of humans and animals, suggesting their use as natural preservatives in foods (Bizani et al., 2005; Cleveland et al., 2001). Subtilin (Banerjee and Hansen, 1988), subtilosin A (Stein et al., 2004; Sutyak et al., 2008), ericin (Stein et al., 2002) and sublancin (Paik et al., 1998) are bacteriocins produced by *B. subtilis* group species.

Lipopeptides probably represent the most common class of secondary metabolites produced by *Bacillus* spp. (Stachelhaus et al., 2002). They are classified into three different families depending on the amino acid sequence: surfactins/lichenysins, iturins (mycosubtilin, iturin A, and bacillomycin), and fengycins/plipastatins (Ongena and Jacques, 2008). The primary structure and gene organization of the operons encoding non-ribosomal peptide synthetases for the *Bacillus* cyclic lipopeptides surfactin, plipastatin, fengycin, bacillomycin, iturin, and mycosubtilin have been described (Duitman et al., 1999; Galli et al., 1994; Konz et al., 1999; Koumoutsis et al., 2004; Menkhaus et al., 1993; Nakano et al., 1991; Tosato et al., 1997; Tsuge et al., 2001). Recently, based on the alignment of nucleic sequences of adenylation and thiolation domains, Tapi et al. (2010) designed specific degenerated primers, which could detect non-ribosomal peptide synthetase genes particularly involved in lipopeptide biosynthesis in *Bacillus* strains.

The objective of the present study was to screen strains of *B. subtilis* subsp. *subtilis* and *B. licheniformis*, two species that are predominant during *Bikalga* fermentation, for their antimicrobial activity against various pathogenic microorganisms; Further to characterize and identify the antimicrobial compound(s) produced by a selected *B. subtilis* subsp. *subtilis* isolate. In addition the ability of the selected strain to produce antimicrobial substance(s) in *H. sabdariffa* based broth was investigated.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains and growth conditions

Ten *Bacillus* isolates (G2, C3, C6, H4, F1, I7, E3, F9, J3, E5) isolated from different productions of *Bikalga* (Ouoba et al., 2008a) were investigated in the present study. Bacterial strains used as indicator microorganisms included 30 Gram-positive and Gram-negative pathogenic bacteria and 6 pathogenic yeasts obtained from different sources (Table 1). Bacteria were maintained as stock cultures at -80°C in appropriate broth medium, Brain Heart Infusion (BHI, Oxoid CM1135 Basingstoke, Hampshire, England), or nutrient broth (Oxoid, CM0001) supplemented with 20% (v/v) glycerol. The yeast were maintained in Yeast Glucose Peptone (YGP) broth [made of 1% (w/v) bacto-peptone (211677, Becton, Dickinson, NJ, USA), 1% (w/v) glucose (Merck

Table 1
Indicator strains used in the present study.

Strains	Media*/ temperature ($^{\circ}\text{C}$)	Origin and/ or reference
<i>Gram-positive</i>		
<i>Bacillus cereus</i> MADM 1291	BHI/37	Birthday cake (food poisoning), Brazil
<i>B. cereus</i> MADM 1561	BHI/37	Cooked chicken (food poisoning), Brazil
<i>B. cereus</i> NVH391-98	BHI/37	Food poisoning, kindly provided by INRA, France ^a
<i>B. cereus</i> 007525	BHI/37	Stew (food poisoning) ^b
<i>B. cereus</i> F4810-72	BHI/37	Emetic food poisoning ^c
<i>B. cereus</i> NC 7401	BHI/37	Emetic food poisoning ^d
<i>B. cereus</i> Ba18H2	BHI/37	Cereulide producer isolated from Sonru ^e
<i>B. cereus</i> F3752A/86	BHI/37	Culture collection of London Metropolitan University
<i>B. cereus</i> LMG13569	BHI/37	Culture collection of London Metropolitan University
<i>Listeria monocytogenes</i> 057	BHI/37	Culture collection of Copenhagen University
<i>L. monocytogenes</i> L028	BHI/37	Culture collection of Copenhagen University
<i>L. monocytogenes</i> Scott A	BHI/37	Culture collection of Copenhagen University
<i>L. monocytogenes</i> NCTC 9863	BHI/37	Culture collection of London Metropolitan University
<i>Micrococcus luteus</i> SKN 624	NA/30	Culture collection of Copenhagen University
<i>M. luteus</i> AT49732	NA/30	Culture collection of London Metropolitan University
<i>Staphylococcus aureus</i> NCTC 10656	BHI/37	Culture collection of London Metropolitan University
<i>Gram-negative</i>		
<i>Salmonella</i> Typhimurium SKN 1155	BHI/37	Animal
<i>S. Typhimurium</i> SKN 533	BHI/37	Culture collection of Copenhagen University
<i>S. Typhimurium</i> O:1036340P/149	BHI/37	Culture collection of London Metropolitan University
<i>Salmonella</i> Nigeria SKN 1160	BHI/37	Cocoa beans
<i>Salmonella</i> Thompson SKN 565	BHI/37	Culture collection of Copenhagen University
<i>Salmonella</i> Oranienburg SKN 1157	BHI/37	Human
<i>Salmonella</i> Infantis SKN 557	BHI/37	Culture collection of Copenhagen University
<i>Salmonella</i> Enteridis P167807	BHI/37	Culture collection of London Metropolitan University
<i>Yersinia enterocolitica</i> 6A28 SKN 599	BHI/37	Culture collection of Copenhagen University
<i>Y. enterocolitica</i> 8A30 SKN 601	BHI/37	Culture collection of Copenhagen University
<i>Y. enterocolitica</i> BT3ST5.27	BHI/37	Culture collection of London Metropolitan University
<i>Escherichia coli</i> 81 nr.149 SKN 541	BHI/37	Culture collection of Copenhagen University
<i>Shigella dysenteriae</i> 370	BHI/37	Culture collection of London Metropolitan University
<i>Shigella flexneri</i> USCC 2007	BHI/37	Culture collection of London Metropolitan University
<i>Yeasts</i>		
<i>Candida tropicalis</i>	YGP/30	Isolated from Fura ^f
<i>Candida kefyri</i>	YGP/30	Isolated from Fura ^f
<i>Candida krusei</i>	YGP/30	Isolated from Fura ^f
<i>Candida albicans</i>	YGP/30	Blood sample
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i>	YGP/30	Culture collection of Copenhagen University
<i>S. cerevisiae</i> KVL 013	YGP/30	Culture collection of Copenhagen University

*BHI: Brain Heart Infusion; NA: Nutrient Agar; YGP: Yeast Glucose Peptone.

^fLund et al., 2000; ^bStenfor and Granum, 2001; ^cTurnbull et al., 1979; ^dAgata et al., 1994; ^eThorsen et al., 2010; ^fLindgaard Pedersen et al., 2012.

38291142, Germany), 0.5% (w/v) yeast extract (Oxoid LP0021), pH 5.6±2]. The *Bacillus* isolates were grown in BHI broth at 37 °C while indicator organisms were propagated in appropriate media and temperature as indicated in Table 1 before use.

2.2. Extraction of DNA

Genomic DNA was extracted according to a modified version of the protocol described by Hansen and Hendriksen (2001). Briefly, isolates were grown on Luria-Bertani (LB) agar (10% tryptone (Difco 0123-15-5; Sparks, MD, USA), 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl and 1.5% agar (Oxoid LP0013)) and incubated at room temperature (25 °C) for 18 h. One loopful of bacterial colony mass was suspended in 250 µl of 1×TE buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0), at 102 °C for 10 min and centrifuged at 15,000 g for 10 min. The supernatant containing the DNA was collected in a fresh Eppendorf tube and kept at 4 °C until use.

2.3. Re-identification of *Bacillus* isolates

Re-identification of the *Bacillus* isolates was performed by M13-PCR typing using *B. subtilis* group type strains as references according to Thorsen et al. (2011), and by *gyrB* gene sequencing according to Wang et al. (2007).

2.4. Screening for antimicrobial activity by agar spot and agar well diffusion assays

2.4.1. Antimicrobial activity as determined by agar spot assay

Inocula of the *Bacillus* isolates were prepared as follows: From BHI agar-plates incubated for 24 h at 37 °C, the isolates were subcultured under agitation for 18 h at 37 °C in 10 ml of BHI broth, pH 7. The cultures were centrifuged at 5000 g for 10 min and the pellet resuspended in 5 ml of sterile saline solution containing 8.5 g/l NaCl and 1.5 g/l bactopectone, pH 7.0. The number of cells was estimated by microscopy using a counting chamber (Neubauer, Wertheim, Germany) and dilutions were made in sterile saline to obtain a rate of inoculation of 10⁵ cells/ml.

The indicator organisms were grown overnight (bacteria) or 48 h (yeasts) in appropriate media and temperature as described in Table 1. For antimicrobial activity testing, 100 µl (about 10⁷ CFU/ml) of indicator was mixed with 10 ml BHI agar (Oxoid CM1136), or nutrient agar (Oxoid CM0003), or YGP agar [made of 1% (w/v) bactopectone, 1% (w/v) glucose, 0.5% (w/v) yeast extract, 2% (w/v) agar, pH 5.6±2] in a Petri dish and allowed to solidify. Three microliters of the *Bacillus* inoculum (approximately 10⁵ CFU/ml) was spotted on the surface and the dish was incubated at the optimal temperature (as described in Table 1) of the indicator organism for 24 h (BHI agar and nutrient agar) or 48 h (YGP agar). The presence of a clear zone around the spot was measured and the results reported in mm. The experiment was performed in duplicate on three separate occasions.

2.4.2. Antimicrobial activity as determined by agar well diffusion method

Cell-free supernatants (CFS) were obtained by cultivating each investigated *Bacillus* isolate overnight (18 h) in 50 ml of BHI medium at 37 °C in a rotary shaker at 120 rotations per min. Cells were pelleted by centrifugation at 10,000 g for 30 min at 4 °C. The pH of the supernatants was adjusted to 7, and the supernatants were sterile filtered through a 0.45 µm pore-size filter (Tabbene et al., 2009).

Antimicrobial activity against the indicator strains was examined by the agar well-diffusion method following a modified version of a previously published protocol (Bizani and Brandelli, 2002). Briefly, 100 µl of indicator strain (approximately 10⁷ CFU/ml) was mixed with 10 ml BHI agar, or nutrient agar or YGP agar in a Petri dish. After cooling, 6 mm diameter wells were cut into the agar plates and filled with 20 µl of CFS. The plates were incubated at the optimal

temperature of the indicator organism (Table 1) and inhibition zone diameters were measured after appropriate time as described above. Un-inoculated BHI broth, or nutrient broth or YGP broth were used as negative controls. The experiment was conducted in duplicate on three separate occasions.

2.5. Physical and chemical properties of antimicrobial substance(s) produced by isolate H4

2.5.1. Effect of enzymes, heat, pH and chemicals on antimicrobial activity

The antimicrobial substance(s) in CFS of H4 obtained as described above was tested for sensitivity to a range of enzymes (all obtained from Sigma-Aldrich): Trypsin from bovine pancreas (T8003), papain lyophilized (P4762), protease from *Streptomyces griseus* (P6911), proteinase K from *Tritirachium album* (P6556), catalase from bovine liver (C1345), lipase II from porcine pancreas (L3126) and α-amylase from porcine pancreas (A3176). All enzymes were dissolved in buffers as recommended by the supplier. Aliquots of CFS were treated with each enzyme at 37 °C for 2 h at a final concentration of 1 mg/ml (Xie et al., 2009). After incubation, the CFS was assayed for residual activity using *B. cereus* NVH391-98 as indicator strain. Untreated CFS plus buffer, buffer alone, and enzyme solutions served as controls. The experiments were conducted in duplicate.

To analyze the thermal stability, aliquots of H4 CFS were exposed to temperatures of 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 and 100 °C for 30 min, autoclaving at 121 °C for 15 min, 4 °C for 30 days and −20 °C for 30 days. The antimicrobial activity was then tested against *B. cereus* NVH391-98 by the agar well diffusion method and the experiments conducted in duplicate.

The effect of pH on the antimicrobial activity was tested by adjusting H4 supernatants to pHs from 3 to 11 (with an increment of one pH unit) with sterile 1 N NaOH or HCl, incubated for 2 h at 37 °C and then neutralized to pH 7 (Cladera-Olivera et al., 2004). After each treatment, residual activity was determined using the agar well diffusion method with *B. cereus* NVH391-98 as indicator organism. All experiments were done in duplicate. Untreated CFS served as controls in each test.

Different chemicals were also added to the CFSs of H4 and the samples were incubated for 1 h at 37 °C before being tested for antimicrobial activity against *B. cereus* NVH391-98. Organic solvents (ethanol and acetone) were used at the working concentration of 50% (v/v). Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), 2-mercaptoethanol and trichloroacetic acid (TCA) were used at 10 mM, 10 mM and 100 mg/ml, respectively (Motta et al., 2007b). After treatment with TCA, samples were centrifuged at 10,000 g for 5 min and the supernatant was neutralized to pH 7.0. After each treatment the samples were tested for residual activity against *B. cereus* NVH391-98 using the agar well diffusion method. Chemicals and CFS diluted with 8.75 g/L NaCl were used as controls (Xie et al., 2009). All experiments were done in duplicate.

2.5.2. Estimation of the size of the antimicrobial compound(s) from H4 by SDS-PAGE

2.5.2.1. Precipitation of proteins with Trichloroacetic acid (TCA). Proteins from 20 ml CFS of isolate H4 were precipitated on ice by adding 50% w/v trichloroacetic acid (TCA) to reach a final concentration of 11% TCA. Proteins were pelleted by centrifugation at 15,000 g for 30 min at 4 °C and washed twice in 1/3 volume ice-cold acetone. Protein pellets were dissolved in 200 µl Tris-buffer (20 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7) and their activity evaluated by the well diffusion test against *B. cereus* NVH391-98 as the indicator strain. Supernatants collected after TCA precipitation and acetone washing were used as negative controls as well as Tris-buffer.

2.5.2.2. Precipitation of proteins with ammonium sulfate (partial purification). Ammonium sulfate was added to 20 ml of H4 supernatant while

stirring to reach 20%, 30% and 40% saturation. Precipitated protein was pelleted by centrifugation at 10,000 g for 15 min at 4 °C. The protein pellets were dissolved in 200 µl Tris-buffer. The activity of the dissolved protein pellets was tested using the well diffusion test against *B. cereus* NVH391-98 as the indicator strain as described above.

2.5.2.3. Direct detection of antimicrobial activity on SDS-PAGE gels. TCA precipitated proteins as well as ammonium sulfate precipitated proteins were separated on a 20% RunBlue SDS-page gel as described below. The same volume (10 µl) from duplicate samples was separated under reducing conditions with Mark 12 (LC5677, Invitrogen) as standard. Following electrophoresis (180 V, 90 mA, 50 min) the gel was stained with Coomassie brilliant blue (0.1% Coomassie R-250, 40% ethanol, 10% acetic acid) for 1 h, de-stained for 1 h (7.5% acetic acid, 10% ethanol) and washed for 4 h in sterile distilled water to replace separation SDS and separation buffer in the gel. The gel was overlaid with 5 ml of soft BHI agar (0.7% w/v) inoculated with 10⁵ cells/ml of the indicator strain *B. cereus* NVH391-98. The overlaid gel was incubated at 37 °C for 24 h and observed for the presence of an inhibition zone (Motta et al., 2007a).

For enhanced protein detection of peptide bands, silver staining of a corresponding gel was performed. In brief, after electrophoresis proteins were fixed to the gel for 1 h (40% ethanol, 10% acetic acid) and washed for 30 s. The gel was then sensitized for 5 min (0.02% sodium thiosulfate) before being stained for 1 h with cold staining solution (0.1% silver nitrate, 0.02% formaldehyde). After this step, the gel was washed and developed in 3% sodium carbonate, 0.05% formaldehyde. The staining was achieved in 5% acetic acid with the appearance of peptide bands.

2.5.3. UHPLC-TOFMS analysis of H4 antimicrobial substance

H4 CFS precipitated with 20% ammonium sulfate was separated on a SDS-PAGE gel as described above. 5 µg BSA was also loaded on the gel as negative control to test the extraction from the gel. The gel was stained with Coomassie brilliant blue. The band associated with the antimicrobial activity was cut out of the gel with a clean scalpel and transferred to a sterile Eppendorf tube. The gel piece was then washed with 40% ethanol until colorless. The residual ethanol was removed and 100% acetonitrile was added to the gel piece for 15 min. When the gel piece had shrunk, the acetonitrile was removed and 50 mM of ammonium bicarbonate was added to the gel and the Eppendorf tube was incubated at 37 °C overnight. The supernatant was transferred to a sterile Eppendorf tube, tested for antimicrobial activity and stored at –20 °C for HPLC analysis.

UHPLC-HRMS was conducted on an Ultimate 3000 UHPLC system (Dionex, Sunnyvale, CA) coupled with a maXis G3 quadrupole time of flight mass spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) equipped with an electrospray (ESI) source. Separation of 1–5 µl samples were performed at 40 °C on a 150 mm × 2.1 mm ID, 1.7 µm BEH C₁₈ column (Waters, Milford, MA, USA) using a linear water-acetonitrile gradient (both buffered with 20 mM formic acid) at a flow of 0.4 mL/min starting from 10% acetonitrile and increased to 100% in 9 minutes, keeping this for 2 minutes. HRMS was performed in ESI⁺ with a data acquisition range of 10 scans per sec at m/z 100–1500 and a resolution of 40 000 FWHM. The MS was calibrated using sodium formate automatically infused prior to each analytical run, providing a mass accuracy of less than 1.5 ppm in MS mode.

Peaks only observed in the Base Peak Chromatograms of the bioactive samples were assessed for adduct formation, of [M+H]⁺, [M+2H]²⁺, [M+NH₄]⁺, [M+3H]⁴⁺, [M+H+NH₄]²⁺, [M+Na]⁺, [M+H+Na]²⁺ and the accurate mass (±0.005 m/z) searched in Antibase2010 (37 185 microbial secondary metabolites) (Wiley & Sons, Hoboken, NJ). Reference standards of iturin A (Sigma-Aldrich) and surfactin (Sigma-Aldrich) were co-analyzed. Major peaks from the SDS gel were also inspected manually for charge state and the sample was analyzed with high mass settings (m/z 300–3500).

2.6. PCR detection of bacteriocin and lipopeptide synthetase genes

Polymerase chain reactions (PCR) were performed to determine the presence of subtilin, subtilosin, ericin, subblancin, iturins/mycosubtilins, surfactins/lichenysins, and fengycins/plipastatins structural genes in the DNA of isolate H4. Genomic DNA of *Bacillus amyloquelificans* DSM7 (*ituC*, *ituD*, *ituA*), *B. subtilis* subsp. *subtilis* DSM10 (*sunT*, *srjA*, *sfp*, *ywiB*, *spoA*, *spoX*, *albA*) and *B. subtilis* subsp. *spizizenii* DSM15029 (*etsS*) were used as positive controls. PCR-amplifications were carried out in 25 µl reaction mixtures containing 2x PCR Master Mix/Dream Taq Green (12.5 µl) (Fementas, Germany), sterile high purity water (9.5 µl), 1 µl of each forward and reverse primer (10 pmol/µl) (Table 4) and 1 µl of template DNA. The amplifications were performed in a thermocycler (Applied Biosystems, 2720) using the cycles conditions as previously described in the indicated references (Table 4). The amplified products were detected by agarose gel electrophoresis (1.5% agarose, 120 V, 2 h) followed by ethidium bromide staining and documented under UV light visualization. PCR was scored positive when a band of the appropriate size was visualized.

2.7. Production of antimicrobial activity during growth of the isolate H4

With the aim of determining timing of initiation of production of the antimicrobial compound(s) during growth, isolate H4 was cultivated in a 100 ml Erlenmeyer flask containing 50 ml of BHI medium with an initial cell concentration of 10²–10³ CFU/ml. The culture was incubated at 37 °C in a rotary shaker at 120 cycles per min. Samples were aseptically taken with 2 h intervals over 24 h. Growth was monitored by determining the optical density using a spectrophotometer (O.D; Shimadzu, Kyoto, Japan) and by plate counting on BHI agar (CFU/ml). The pH of the samples was recorded (PHM 250, Radiometer Analytical) and antimicrobial activity of CFS evaluated by the agar well diffusion method described above with *B. cereus* NVH391-98 as indicator strain.

2.8. Antimicrobial activity of *B. subtilis* subsp. *subtilis* H4 in *H. sabdariffa* seeds based broth

Isolate H4 was tested for its ability to produce antimicrobial substance during growth in a *H. sabdariffa* seeds based broth. *H. sabdariffa* seeds were ground in a crusher (Bosch MKM 6003). *H. sabdariffa* seeds based broth was prepared by cooking the flour of *H. sabdariffa* seeds in distilled water for 3–4 h (5 g flour/50 ml MQ water in a 250 ml Erlenmeyer flask). The pH was adjusted to 7.4 ± 0.2 and the broth autoclaved at 121 °C for 15 min. For the assay H4 was inoculated (1% v/v at an initial concentration of 10⁵ CFU/ml) in the flask containing the *H. sabdariffa* seeds based broth and incubated at 37 °C under shaking conditions (120 cycles per min). Samples were collected at 0, 12, 18 and 24 h to determine growth (CFU/ml) by plate counting on BHI agar and pH (PHM 250, Radiometer Analytical, Denmark). From 2 ml of each sample, cells were harvested by centrifugation at 10,000 g for 30 min at 4 °C. Supernatants were sterile filtered through a 0.45 µm filter (Tabbene et al., 2009) and tested for antimicrobial activity against *B. cereus* NVH391-98. CFS of H4 cultivated in BHI broths were used as positive controls and the experiment was conducted in duplicate on two separate occasions.

2.9. Sequence accession numbers

The *gyrB* sequences determined in the present study have been deposited under Genbank accession numbers JX946687–JX946692.

3. Results

3.1. Re-identification of strains

The studied *Bacillus* isolates previously identified by 16S rRNA gene sequencing (Ouoba et al., 2008a) as *B. subtilis* (G2, C3, C6, H4,

F1, I7, J3, E5) and *Bacillus licheniformis* (E3, F9) were re-identified as *B. subtilis* subsp. *subtilis* (G2, C3, C6, H4, F1, I7) and *B. licheniformis* (E3, F9, J3, E5) based on *gyrB* gene sequencing (more than 99% similarity to GenBank sequences). Comparison of their M13 PCR fingerprints with the type strains of closely related species supported this, as it was found that the isolates in each group clustered with the corresponding type strain (results not shown).

3.2. Antimicrobial activity in BHI medium

The ability of the *Bacillus* isolates to inhibit pathogenic bacteria and yeasts (indicator organisms) varied according to the *Bacillus* isolate and the method used for the detection (Table 2). From the agar spot assay, it was observed that except for *B. subtilis* subsp. *subtilis* C3, all of the studied *Bacillus* spp. isolates were able to inhibit growth of at least one of the indicator bacteria, while none of the yeasts were inhibited. Both Gram-positive and Gram-negative bacteria such as *B. cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Micrococcus luteus*, and *Yersinia enterocolitica* were inhibited. Different inhibitory spectra were obtained with the supernatant of pure cultures of the *Bacillus* isolates where antimicrobial activity of the studied *Bacillus* CFS was detected against only the Gram-positive pathogenic bacteria. Among the isolates screened, CFS of *B. subtilis* subsp. *subtilis* H4, F1 and G2 showed the largest inhibitory capacity being able to inhibit growth of pathogenic bacteria such as *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *M. luteus* and *Staphylococcus aureus*. CFS of *B. licheniformis* E3 and F9 were also shown to be active against some of the indicator strains and their strongest inhibition was observed against *M. luteus*. Some *Bacillus* isolates such as C6, I7, J3 and E5 showed inhibitory activity on the agar spot test but did not produce

antimicrobial substance against any indicator strain in the well diffusion assay (Table 2). Based on its inhibitory capacity, *B. subtilis* subsp. *subtilis* H4 was selected for the characterization of its antimicrobial activity.

3.3. Effect of enzymes, heat, pH and chemicals on H4 antimicrobial activity

The antimicrobial substance(s) produced by H4 was completely lost after treatment with protease, trypsin, α -amylase and lipase II. However, little or no change in the size of the inhibitory zone was observed when the same samples were treated with proteinase K, papain and catalase. The activity was stable following temperature exposure up to 100 °C for 30 min, 121 °C for 15 min, storage for up to 30 days at refrigerated temperature (4 °C) and after freezing (−20 °C for 30 days). Furthermore, the antimicrobial substance was shown to retain about 100% of its initial activity within the pH range of 3–10. When samples of CFS of *B. subtilis* subsp. *subtilis* H4 were treated with TCA, no inhibitory activity was observed. After treatment with 2-mercaptoethanol, residual activity decreased significantly, while organic solvents and EDTA showed no effect on the antibacterial activity (Table 3).

3.4. Direct detection of antimicrobial activity on gels

The CFS of *B. subtilis* subsp. *subtilis* H4 was precipitated with TCA, and following electrophoresis, several proteins were detected in the CFS as seen in Fig. 1. By overlaying the gel with BHI agar containing *B. cereus* NVH391-98 as indicator an apparent single protein band associated with the antimicrobial activity was revealed (Fig. 1A).

Table 2
Inhibitory spectrum of predominant *Bacillus* spp. from *Bikalga* in BHI medium as determined by agar spot test (*) and agar well diffusion test (**).

Indicator organisms ^b	Inhibition zone (in mm)									
	<i>Bacillus subtilis</i>									
	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> ^a					<i>Bacillus licheniformis</i>				
	G2	C6	H4	F1	I7	E3	F9	J3	E5	
<i>Gram-positive</i>										
<i>B. c.</i> MADM 1291	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>B. c.</i> MADM 1561	–	+	–	–	++	–	–	–	–	–
<i>B. c.</i> NVH391-98	+	–	–	+	+++	+	+	+	+	+
<i>B. c.</i> 007525	–	+	–	–	++	–	–	–	–	–
<i>B. c.</i> F4810-72	–	–	–	–	++	–	–	–	–	–
<i>B. c.</i> NC 7401	–	–	–	–	++	–	–	–	–	–
<i>B. c.</i> Ba181H2	–	–	–	–	++	–	–	–	–	–
<i>B. c.</i> F3752A/86	–	–	–	–	++	–	–	–	–	–
<i>B. c.</i> IMG13569	–	–	–	–	++	+	–	–	–	–
<i>L. m.</i> 057	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>L. m.</i> ID28	–	++	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>L. m.</i> Scott A	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>L. m.</i> NCTC 9863	–	+	–	–	+	+	+	+	+	+
<i>M. l.</i> SKN 624	–	–	–	–	+++	–	–	–	–	–
<i>M. l.</i> AT49732	–	+	–	–	+++	+	+	+	+	+
<i>S. a.</i> NCTC 10656	–	–	–	–	++	–	–	–	–	–
<i>Gram-negative</i>										
<i>S. T.</i> SKN 533	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–
<i>S. T.</i> O:1036340P/149	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>S. N.</i> SKN 1160	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–
<i>S. O.</i> SKN 1157	–	–	+++	–	–	++	–	–	–	–
<i>S. I.</i> SKN 557	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–
<i>Y. e.</i> 6A28 SKN 599	+	–	+++	–	–	+++	–	–	–	–
<i>Y. e.</i> 8A30 SKN 601	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Y. e.</i> BT3ST5,27	–	–	–	–	–	++	–	–	–	–

– = no inhibition; + = 1 ≤ inhibition < 3 mm; ++ = 3 ≤ inhibition < 6 mm; +++ = 6 ≤ inhibition < 10 mm;

^a Strain of *B. subtilis* C3 did not show inhibition against the indicator organisms tested.

^b B.C. = *Bacillus cereus*; L.m. = *Listeria monocytogenes*; M.l. = *Micrococcus luteus*; S.a. = *Staphylococcus aureus*; S.T. = *Salmonella* Typhimurium; S.N. = *Salmonella* Nigeria; S.O. = *Salmonella* Oranienburg; S.I. = *Salmonella* Infantis; Y.e. = *Yersinia enterocolitica*; Strains of the following indicator organisms were not inhibited: *Salmonella typhimurium* SKN 1155, *Salmonella thompson* SKN 565, *Salmonella enteridis* P 167807, *Escherichia coli* 81 nr.149 SKN 541, *Shigella dysenteriae* 370, *Shigella flexneri* USCC 2007, *Candida tropicalis*, *Candida kefyr*, *Candida krusei*, *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*, *Saccharomyces cerevisiae* KVL 013.

Table 3
Effect of enzymes, heat, pH and some chemicals on H4 antimicrobial activity^a.

Treatment	Residual activity % ^b
Enzyme	
Protease	0
Proteinase K	100
Papain	90
Trypsin	0
Catalase	100
A-amylase	0
Lipase II	0
Heat	
30 °C	100
40 °C	100
50 °C	100
60 °C	100
70 °C	100
80 °C	100
90 °C	100
100 °C	100
121 °C/15 min	95
4 °C/30 d	100
−20 °C/30 d	100
pH	
3–10	100
11	22.2
Chemicals	
Ethanol	100
Acetone	100
EDTA	100
Trichloroacetic acid	0
β-mercaptoethanol	25.4

^a Results are means of two individual assays with an SD less than 5% about the mean.

^b Residual activity compared with antimicrobial activity before treatment.

The antimicrobial compound was partially purified by adding ammonium sulfate to *B. subtilis* subsp. *subtilis* H4 CFS to obtain 20%, 30% and 40% saturation. The maximum antagonistic activity was found in the resolved precipitate with 20% saturation of ammonium sulfate. The fraction precipitated with 30% ammonium sulfate exhibited weak inhibition while the supernatant fluid precipitated with 40% ammonium sulfate did not exhibit any antimicrobial activity. Both precipitates were analyzed by SDS-PAGE but no proteins were detected (Fig. 1). As shown in the Coomassie brilliant blue stained gel, following electrophoresis of the 20% ammonium sulfate protein fraction, one protein band was detected in the CFS of H4 (Fig. 1B). This band was associated with the antimicrobial activity when the gel was overlaid with BHI agar containing *B. cereus* NVH391-98 as indicator (Fig. 1A). Silver staining of the corresponding gel showed several weak protein bands in addition to the protein band associated with the antimicrobial activity (Fig. 1C). As shown in Fig. 1A the peptide band associated with antimicrobial activity from the TCA precipitated proteins as well as the 20% ammonium sulfate precipitated proteins had an apparent molecular mass of approximately 4 kDa.

3.5. UHPLC-TOFMS analysis of H4 gel piece

UHPLC-TOFMS analysis of the extract obtained from the gel piece with the protein of apparent mass of 4 kDa and which was associated with antimicrobial activity revealed the presence of surfactin lipopeptides. These were confirmed by both accurate mass (better than 1.5 ppm) of the $[M + Na]^+$, $[M + H]^+$, $[M + 2H]^{2+}$, $[M + Na + H]^{2+}$, isotopic fit (Sigma fit better than 30), and with the major peaks matching the retention times of an authentic reference standard (Fig. 2). The extract did not seem to contain other lipopeptides even though searching

for approx. 350 different bacterial lipopeptides by targeting their pseudo molecular ions. Using the high mass settings (where especially the ion-cooler settings shifts intensity dramatically upwards) a major chromatographic peak was detected with m/z 837.6552 and a charge state of 4 as well as an ion at m/z 670.3178 with a charge state of 4, both pointing at a monoisotopic mass of 3346.59.

3.6. PCR detection of bacteriocin and lipopeptide biosynthesis genes

Bacillus subtilis subsp. *subtilis* H4 was found to be negative for the functional genes encoding the sublancin ABC transporter (*subT*), and genes involved in the biosynthesis of ericin (*eriC*), iturins (*ituA*, *ituD*, *ituC*), fengycin (*fen*) and mycosubtilin (*myc/itu*) as determined by PCR (Table 4). However, amplicons of the expected sizes were obtained with the primer pairs designed to detect genes involved in biosynthesis of subtilin (*spaS*, *etnS*), subtilosin (*yiwB*, *sbaA*, *spoX*, *albA*), surfactin (*srjA*, *sfp*, *srf/lch*) and plipastatin (*pps*) (Table 4).

3.7. Production of antimicrobial activity during growth of *B. subtilis* subsp. *subtilis* H4

In order to study the production of antimicrobial compounds during growth of *B. subtilis* subsp. *subtilis* H4 the inhibitory activity present in cell-free samples taken at different time intervals was determined. Stationary phase was reached after 10 h of growth. When using *B. cereus* NVH391-98 as indicator strain, the antimicrobial activity could be detected from the middle of the exponential growth phase, and the maximum activity was obtained at the early stationary growth phase. The antagonistic activity declined considerably in the stationary phase and was not detectable from 22 to 24 h (Fig. 3). It was observed that pH values after a slight decrease rose from 7 to about 9 at the end of the incubation (Fig. 3).

3.8. Antimicrobial activity in *H. sabdariffa* seeds based broth

Although the number of viable cells increased during the cultivation period (from 5.33 ± 0.17 to 9.43 ± 0.31 log₁₀ CFU/ml), no antimicrobial activity was observed against *B. cereus* NVH391-98 with the supernatants obtained when H4 was cultivated in *H. sabdariffa* based broth (results not shown). The pH of the culture rose from 6.6 ± 0.02 to 7.83 ± 0.1 at the end of the incubation (24 h) (results not shown).

4. Discussion

An agar spot and an agar well diffusion assay were used to assess the production of antimicrobial compounds by 10 *Bacillus* spp. isolates belonging to the predominant spore formers isolated from *Bikalga* against a panel of indicator bacteria. Although antimicrobial activity was detected for most of the strains, there was considerable difference in their spectra and degrees of inhibition. Indeed, both Gram-positive and Gram-negative indicator bacteria were inhibited in the agar spot assay while only Gram-positive pathogens were inhibited in the agar well diffusion assay. The fact that CFS of the studied *Bacillus* spp. isolates inhibited only Gram-positive bacteria is in accordance with the results reported by He et al. (2006) and Kaboré et al. (2012) for strains of *B. licheniformis* and *B. subtilis*, respectively. It is well known that activity of bacteriocins produced by Gram-positive bacteria is often restricted to other Gram-positive bacteria (Riley and Wertz, 2002). Among the isolates screened, supernatants of *B. subtilis* subsp. *subtilis* H4, F1 and G2 showed the strongest and largest inhibitory spectrum being inhibitory to relevant pathogenic Gram-positive bacteria such as *B. cereus* and *L. monocytogenes*.

L. monocytogenes is a foodborne pathogen of great concern for the food producing companies (Olesen et al., 2009) while *B. cereus* is considered an opportunistic human pathogen with the potential for causing food borne illnesses such as vomiting through the production of

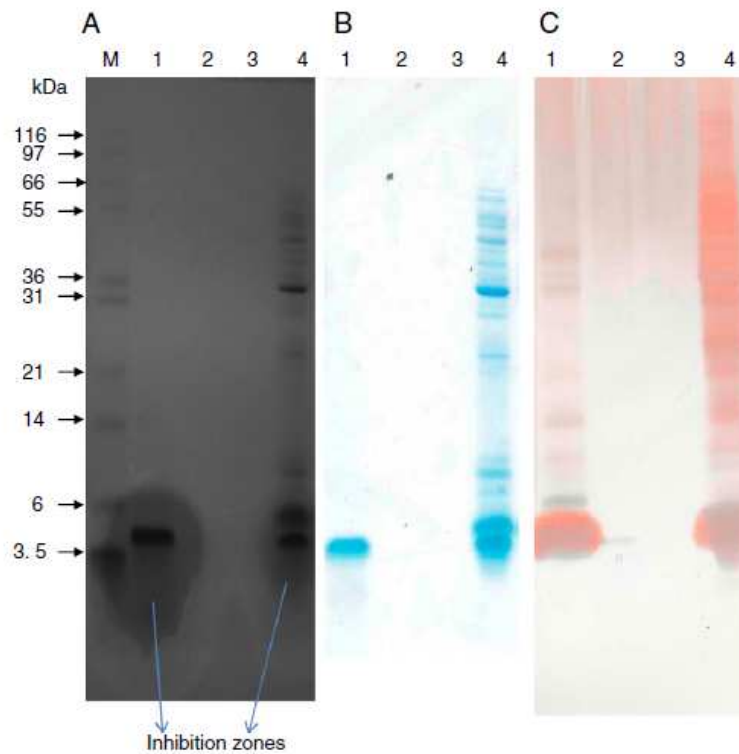


Fig. 1. SDS-PAGE gel of precipitated proteins from cell free supernatants of *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* H4. 1A): Direct detection of antimicrobial activity by overlaying the gel with soft BHI agar containing the indicator organism *Bacillus cereus* NVH391-98. Inhibition zones were observed after 24 h incubation at 37 °C. 1B): Coomassie brilliant blue stained gel 1C): Silver staining of a corresponding gel for increased protein detection. M: Mark12, Novex molecular weight marker. Lanes 1: Proteins precipitated using 20% (w/v) ammonium sulfate; Lanes 2: Proteins precipitated using 30% (w/v) ammonium sulfate; Lanes 3: Proteins precipitated using 40% (w/v) ammonium sulfate; Lanes 4: TCA precipitated protein. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

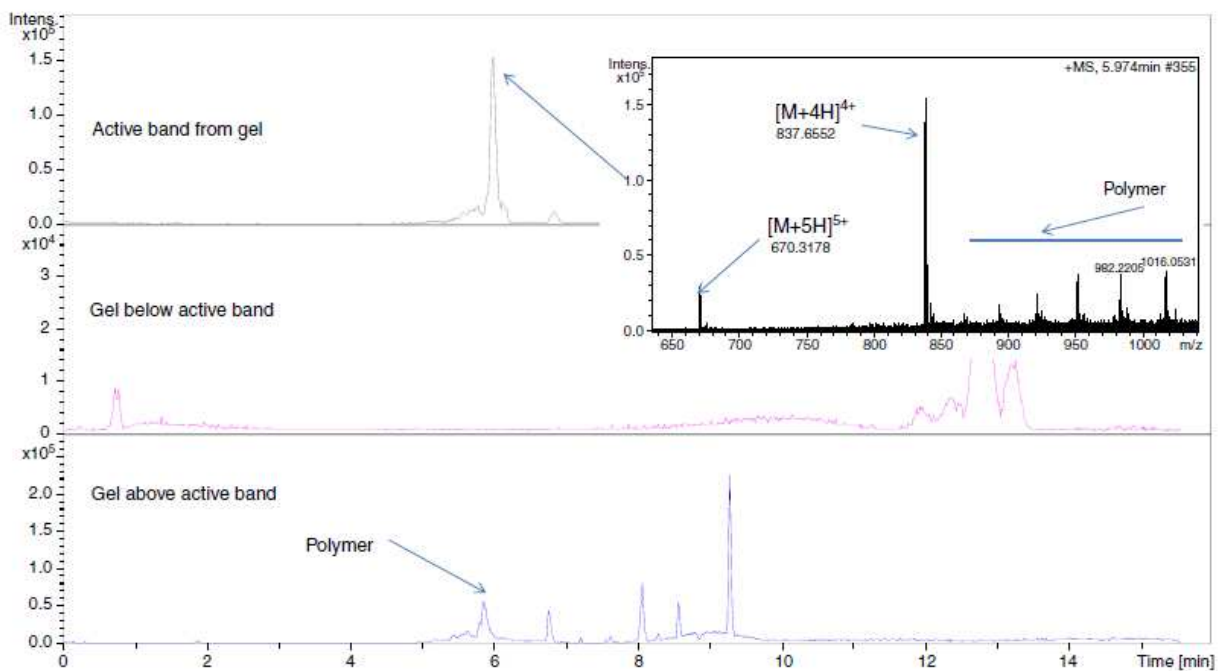


Fig. 2. Identification of the protein extracted from the gel. Upper chromatographic trace shows the active band and the two other traces the band just above and below the active band where the small protein peaks is unique. ESI⁺ mass spectrum of the protein is inserted.

Table 4
PCR detection of bacteriocin and lipopeptide biosynthesis genes from *B. subtilis* subsp. *subtilis* H4.

Bacteriocins/lipopeptides	Genes	Primers	Primer sequence (5' to 3')	Annealing temperature (°C)	PCR product size expected/detected	Reference
Subtilosin	<i>ywiB</i> <i>sboA</i> <i>SboX</i> <i>albA</i>	Osbo_P1N	CCTCATGACCAGACTTCGCCTT	60	1200 bp/yes	Kaboré et al., 2012
		Osbo_P2N	CGGTGCCGAGCGCTTCAGGT			
Subtilin ^a	<i>SpaS</i>	SpaS_Fwd SpaS_Rev	CAAAGTTCGATGATTCGATTGGATGT GCAGTTACAAGTTAGTGTGTTGAAGGAA	55	152 bp/yes	Sutyak et al., 2008
Ericin	<i>eriC</i> <i>eriSa</i> <i>eriSb</i>	Eric_F	TCAACTGACCGGGCAGGAGC	58	1440 bp/no	Kaboré et al., 2012
		Eric_R	AAGTATTGGCTACAGCGACTCG			
Sublancin	<i>sunT</i>	SUNT-F1 SUNT-R1	GCTTTGTTAGAAGGGGGAAT CTTGCCCAACCCATAGGATAA	58	974 bp/no	Chung et al., 2008
Iturin	<i>ituD</i>	ITUD-F1	TGAAAYGTCAGYGCSCCTTT	55	482 bp/no	Chung et al., 2008
		ITUD-R1	TGCGMAAATAATGGSGTCGT			
Iturin A	<i>ituA</i>	ITUC-F1	CCCCCTCGGTCAAGTAATA	55	594 bp/no	Chung et al., 2008
		ITUC-R1	TGGTTAAGCCTTGATGCTC			
Surfactin	<i>sfA</i>	ITUD1F	GATGCGATCTCCTTGGATGT	55	647 bp/no	Sarangi et al., 2009
		ITUD1R	ATCGTCATGTGCTGCTGAG			
Mycosubtilin	<i>myc/itu</i>	SRFA-F1	AGAGCACATTGAGCGTTACAAA	55	626 bp/yes	Chung et al., 2008
		SRFA-R1	CAGCATCTCGTCAACTTTCAC			
		SFP-F1	ATGAAGATTACGGAATTTA			
Fengycin	<i>fen</i>	SFP-R1	TTATAAAAGCTCTTCGTACG	52	675 bp/yes	Chung et al., 2008
		As1-F	CGCGMTACCGVATYAGC			
		Ts2-R	ATBCCTTBTWDGAATGTCGGCC			
Plipastatin	<i>pps</i>	Am1-F	CAKARGTSAAAATYCGMGG	45	416, 419/no	Tapi et al., 2010
		Tm1-R	CCDASATCAARAADTTATC			
Plipastatin	<i>pps</i>	Af2-F	GAATAYMTCCGMCMTKGA	45	443, 452/no	Tapi et al., 2010
		Tf1-R	GCTTWWADKGAATSBCCGCC			
Plipastatin	<i>pps</i>	Ap1-F	AGMCAGCKSGCMASATCMCC	58	1029/yes	Tapi et al., 2010
		Tp1-R	GCKATWWTGAARRCCGGCGG			

^a The *spas* primers target both *spas* and *etnS* a *spas*-like gene in DSM15029. Targeting of *etnS* (also 152 bp) of DSM15029 has been confirmed by sequencing (unpublished results).

cereulide, and diarrhea through the production of various enterotoxins (Stenfors et al., 2008). *Bacillus cereus* is often isolated from fermented African food condiments such as *Bikalga*, *Maari*, and *Afitin* among others and might constitute a safety problem for the consumers (Ouoba et al., 2008b; Parkouda et al., 2010; Thorsen et al., 2010, 2011). In this sense, identification of isolates producing antimicrobial compounds active against *B. cereus* addresses an important

aspect of *Bikalga* and other African fermented food condiments protection.

Some of the *Bacillus* isolates (C6, I7, J3 and E5) exhibited antagonistic effects on agar but not in liquid medium. Similar results have been reported by other authors (Harris et al., 1989; Schillinger and Lücke, 1989; Schillinger and Holzapfel, 1990) who tested strains of lactic acid bacteria. The inhibitory activity observed only in the agar test could be explained by the competition for nutrients from the environment leading the microorganisms to develop different strategies, one of which could be the production of antimicrobial substances (McAuliffe et al., 2001). In addition, the synthesis of bacteriocins can be stimulated when a producer strain recognizes a common substance (inducing factor) present due to a sensitive strain (Papagianni, 2003).

The antimicrobial substance(s) produced by *B. subtilis* subsp. *subtilis* H4 was further characterized and was shown to be stable under extreme temperature and pH stresses. These observations increase the likelihood of this compound being considered for food preservation (Sutyak et al., 2008).

In the present study, the antagonistic activity of H4 CFS was completely lost after protease and trypsin treatment, indicating its proteinaceous nature (Bizani and Brandelli, 2002), further indicating that the antimicrobial substance is a bacteriocin or a bacteriocin-like substance (BLS) (Hyronimus et al., 1998). However, the BLS produced by *B. subtilis* subsp. *subtilis* H4 was resistant to proteinase K and papain indicating that this BLS may be a cyclic peptide containing unusual amino acids, and therefore is more resistant to protease hydrolysis (Bizani and Brandelli, 2002). In comparison, subtilin, a bacteriocin produced by *B. subtilis* was found to be resistant to proteinase K, while ericin S also produced by *B. subtilis* was found to be resistant to trypsin and pepsin (Stein et al., 2002). Sutyak et al. (2008) reported that subtilosin activity was completely lost in the presence of pepsin and proteinase K, and significantly decreased by trypsin and chymotrypsin.

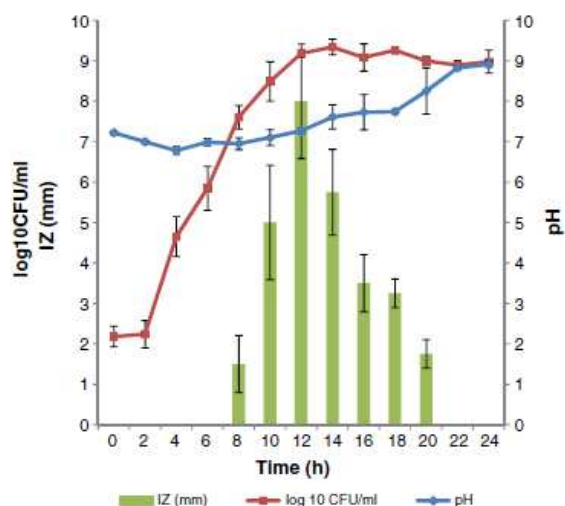


Fig. 3. Production of antimicrobial activity during the growth of *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* H4 in BHI broth at 37 °C for 24 h. Bacterial growth (\log_{10} CFU/ml), inhibition zone against *Bacillus cereus* NVH391-98 (IZ in mm) and pH were recorded each 2 h. Each point represents the mean of 2 repeated measurements from 2 independently replicated experiments.

The sensitivity of H4 antimicrobial substance to lipase suggests that a lipid moiety may be involved in the antimicrobial activity (Motta et al., 2007b). Based on the sensitivity to α -amylase it is possible that the compound(s) contain sugar residues (Munambazi and Bullerman, 1998). The fact that the antimicrobial activity was significantly inactivated by β -mercaptoethanol suggests the presence of disulfide bonds (Motta et al., 2007b). This agrees with the heat stability and pH resistance of the inhibitory compound(s).

The decrease and later disappearance of H4 antimicrobial activity at the late stationary phase could be associated to adsorption by producer cells or to degradation by extracellular proteases, which are often produced by *Bacillus* spp. (Bizani and Brandelli, 2002; Parente and Ricciardi, 1999).

An inhibition zone was observed clearly in the direct detection of antimicrobial activity on SDS-PAGE gels and revealed that the partially purified protein from H4 CFS was associated with a single protein band with an apparent molecular mass of about 4000 Da. UHPLC-TOFMS analysis however revealed the presence of both a lipopeptide surfactin (approximate size 1000 Da) and a protein with a mono-isotopic mass of 3346.59 Da. The discrepancy between the protein size observed by UHPLC-TOFMS and SDS-analysis can be explained on the basis of the abnormal behavior of some highly hydrophobic proteins in SDS-PAGE (Kaufman et al., 1984). This property has been associated with bacteriocins and BLS presenting a strong hydrophobic nature (Bizani et al., 2005).

Following genetic analysis, *B. subtilis* subsp. *subtilis* H4 was shown to harbour genes involved in the synthesis of subtilisin and subtilin. Subtilin is a 32-amino-acid pentacyclic lantibiotic, structurally related to the widely utilized biopreservative nisin (Ross et al., 2002) while subtilisin A is a macrocyclic bacteriocin with unusual thioether linkages (Marx et al., 2001). These bacteriocins have been reported to be produced by several species of the *B. subtilis* group and have proven to be effective against pathogenic bacteria including *L. monocytogenes* and *B. cereus* (Banerjee and Hansen, 1988; Stein et al., 2004; Sutyak et al., 2008; Kaboré et al., 2012). However, the molecular mass of the protein extracted from the gel piece with antimicrobial activity and analyzed by UHPLC-TOFMS in the present study was 3346.59 Da. This size is different from the reported molecular weights of subtilin (3319.56 Da; Stein, 2008) and subtilisin (3400.57 Da; Marx et al., 2001). Further none of the bacteriocins subtilin and subtilisin contain lipid residues, sugar residues or di-sulfide bridges (Stein, 2008) which in the present study were indicated to be important for the antimicrobial activity of H4 CFS. Altogether the results obtained suggest that H4 may produce a novel bacteriocin.

The presence of the lipopeptide surfactin biosynthesis genes was detected in the DNA of H4 and the production was confirmed in the gel piece (with antimicrobial activity) extract by UHPLC-TOFMS analysis. Surfactin has previously been reported to have some antimicrobial properties (Huang et al., 2008; Sivapathasekaran et al., 2010). Surfactin is a cyclic lipopeptide, which contains a β -hydroxy fatty acid, but no di-sulfide bridges or sugar residues (Stein, 2008). Although surfactin could lose its potential antimicrobial activity through lipase treatment, the complete loss of activity upon amylase treatment of H4 CFS suggests that surfactin was not responsible for the observed antimicrobial effect. Further, the antimicrobial activity of H4 CFS was sensitive to trypsin, whereas surfactin as also the two other main families of *Bacillus* spp. lipopeptides (iturin and fengycin) are very resistant to proteolytic enzymes treatment (Benitez et al., 2010). However it cannot be ruled out that surfactin could act synergistically and increases the activity of the extracted protein, although further studies are needed to confirm this.

Surfactins could play other roles in the food products. Indeed, their remarkable emulsifying and biosurfactant properties could, for example, impact the organoleptic properties of the products by modifying, the solubility of different hydrophobic compounds (Savadogo et al., 2011). Similarly, surfactins producing *B. subtilis* group strains have

recently been identified in *Soumbala* and *Bikalga* fermented condiments from Burkina Faso (Savadogo et al., 2011) using PCR and MALDI-TOF-MS analysis. In addition, *B. subtilis natto*, which is industrially used for *Natto* production in Japan, is known to produce surfactin (detection of several mg of surfactin/100 g of *Natto* wet weight, Sumi et al., 2000).

Although *B. subtilis* subsp. *subtilis* H4 grew well in the *H. sabdariffa* seeds based broth, no antimicrobial activity of the CFS was observed throughout the incubation period. Similar to our observations, in the study by Motta and Brandelli (2008) antimicrobial activity production by a *Bacillus* strain (*Bacillus* sp. P34) was influenced by culture media, being produced in BHI broth, soybean protein, peptone and trypticase soy broth, but not in fish meal, feather meal, whey and grape waste. The effect of growth conditions has been studied for the production of bacteriocins and maximum production usually require complex medium and well controlled physical factors such as temperature and pH (Moita et al., 2005; Parente et al., 1994). The non-detection of antimicrobial activity in the CFS when H4 was cultured in *H. sabdariffa* seeds based broth could be due to interactions of the antimicrobial compound(s) with certain substrate components, such as fat (Muñoz et al., 2004).

5. Conclusion

The predominant *B. subtilis* subsp. *subtilis* and *B. licheniformis* isolated from *Bikalga* were investigated and the results revealed that 3 *B. subtilis* subsp. *subtilis* (G2, H4, F1) isolates showed the most interesting antimicrobial properties, being able to produce in agar spot test antimicrobial substance(s) active against both Gram-positive and Gram-negative pathogens such as *B. cereus*, *Salmonella* spp., *Lmonocytogenes*, *Y. enterocolitica*, *M. luteus* and *S. aureus*. Results from the agar well diffusion showed that only Gram-positive bacteria were inhibited by the CFS of these isolates. In addition, CFS of 2 *B. licheniformis* (E3, F9) demonstrated inhibitory capacity against *M. luteus*. The antimicrobial activity produced by *B. subtilis* subsp. *subtilis* H4 was further characterized and it was shown that the isolate possessed the genes involved in subtilin, subtilisin, surfactin and plipastatin biosynthesis. UHPLC-TOFMS analysis allowed identification of the lipopeptide surfactin and showed that the bacteriocin produced by H4 had a molecular mass of 3346.59 Da. The antimicrobial substance was heat stable, and suggested to have di-sulfide bonds, and a sugar and lipid moiety important for antimicrobial activity. In conclusion, this study indicates that *B. subtilis* subsp. *subtilis* H4 isolated from traditional *Bikalga* co-produces surfactin and a bacteriocin, with a mass size of 3346.59 Da. The physical and chemical properties suggest a potential usage in the food industry.

Acknowledgment

This work was supported by DANIDA (Danish International Development Agency) through the project "Capability Building for Research and Quality Assurance in Traditional Food Processing in West Africa". Département Technologie Alimentaire (DTA/IRSAT/CNRST in Ouagadougou, Burkina Faso) and Department of Food Science (Faculty of Sciences, University of Copenhagen, Denmark) are acknowledged for their assistance.

References

- Abriouel, H., Franz, C.M.A.P., Omar, N.B., Gálvez, A., 2010. Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. *Federation of European Microbiological Societies (FEMS) Microbiology Reviews* 35, 201–232.
- Achi, O.K., 2005. Review: traditional fermented protein condiments in Nigeria. *African Journal of Biotechnology* 4, 1612–1621.
- Agata, N., Mori, M., Ohta, M., Suwan, S., Ohtani, I., Isobe, M., 1994. A novel dodecadepsipeptide, cereulide, isolated from *Bacillus cereus* causes vacuole formation in HEP-2 cells. *Federation of European Microbiological Societies (FEMS) Microbiology Letters* 121, 31–34.

- Banerjee, S., Hansen, J.N., 1988. Structure and expression of a gene encoding the precursor of subtilin, a small protein antibiotic. *Journal of Biological Chemistry* 263, 9508–9514.
- Benitez, L.B., Velho, V.R., Lisboa, P.M., da Costa Medina, F.L., Brandelli, A., 2010. Isolation and characterization of a antifungal peptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* LBM5006. *The Journal of Microbiology* 48, 7791–7797.
- Bizani, D., Brandelli, A., 2002. Characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus* sp. strain 8A. *Journal of Applied Microbiology* 93, 512–519.
- Bizani, D., Dominguez, A.P.M., Brandelli, A., 2005. Purification and partial chemical characterization of the antimicrobial peptide cerein 8A. *Letters in Applied Microbiology* 41, 269–273.
- Chung, S., Kong, H., Buyer, J.S., Lakshman, D.K., Lydon, J., Kim, S.-D., Roberts, D.P., 2008. Isolation and partial characterization of *Bacillus subtilis* ME488 for suppression of soilborne pathogens of cucumber and pepper. *Applied Microbiology and Biotechnology* 80, 115–123.
- Cladera-Olivera, F., Caron, G.R., Brandelli, A., 2004. Bacteriocin-like substance production by *Bacillus licheniformis* strain P40. *Letters in Applied Microbiology* 38, 251–256.
- Cleveland, J., Montville, T.J., Nes, I.F., Chikindas, M.L., 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology* 71, 1–20.
- Duitman, E.H., Hamoen, L.W., Rembold, M., Venema, G., Seitz, H., Saenger, W., Bernhard, F., Reinhardt, R., Schmidt, M., Ullrich, C., Stein, T., Leenders, F., Vater, J., 1999. The mycosubtilin synthetase of *Bacillus subtilis* ATCC6633: a multifunctional hybrid between a peptide synthetase, an amino transferase, and a fatty acid synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 13294–13299.
- Galli, G., Rodriguez, F., Cosmina, P., Pratesi, C., Nogarotto, R., Grandi, G., 1994. Characterization of the surfactin synthetase multi-enzyme complex. *Biochimica et Biophysica Acta* 1205, 19–28.
- Hansen, B.M., Hendriksen, N.B., 2001. Detection of enterotoxigenic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains by PCR analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 185–189.
- Harris, L.J., Daeschel, M.A., Stiles, M.E., Klaenhammer, T.R., 1989. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection* 52, 384–387.
- He, L., Chen, W., Liu, Y., 2006. Production and partial characterization of bacteriocin-like peptides by *Bacillus licheniformis* ZJU12. *Microbiological Research* 161, 321–326.
- Holzappel, W.H., 2002. Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries. *International Journal of Food Microbiology* 75, 197–212.
- Hyonimus, B., Le Marrec, C., Urdad, M.C., 1998. Coagulin, a bacteriocin-like inhibitory substance produced by *Bacillus coagulans* 14. *Journal of Applied Microbiology* 85, 42–50.
- Huang, X.Q., We, Z.Y., Gao, X.P., Yang, S.J., Cui, Y.H., 2008. Optimization of inactivation of endospores of *Bacillus cereus* in milk by surfactin and fengycin using a response surface method. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* 14, 89–95.
- Kaboré, D., Thorsen, L., Nielsen, S.D., Bemer, S.T., Sawadogo-Lingani, H., Diawara, B., Dicko, H.M., Jakobsen, M., 2012. Bacteriocin formation by dominant aerobic sporeformers isolated from traditional *maari*. *International Journal of Food Microbiology* 154, 10–18.
- Kaufman, E., Geisler, N., Weber, K., 1984. SDS-PAGE strongly overestimates the molecular masses of the neurofilament proteins. *Federation of European Biochemical Societies Letters* 170, 81–84.
- Konz, D., Doekel, S., Marahiel, M.A., 1999. Molecular and biochemical characterization of the protein template controlling biosynthesis of the lipopeptide lichenysin. *Journal of Bacteriology* 181, 133–140.
- Koumoutsis, A., Chen, X.H., Henne, A., Liesegang, H., Hitzeroth, G., Franke, P., Vater, J., Borris, R., 2004. Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42. *Journal of Bacteriology* 186, 1084–1096.
- Lindegård Pedersen, L., Owusu-Kwarteng, J., Thorsen, L., Jespersen, L., 2012. Biodiversity and probiotic potential of yeasts isolated from *Fura*, a West African spontaneously fermented cereal. *International Journal of Food Microbiology* 159, 144–151.
- Lund, T., De Buyser, M.L., Granum, P.E., 2000. A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. *Molecular Microbiology* 38, 254–261.
- Marx, R., Stein, T., Entian, K.-D., Glaser, S.J., 2001. Structure of the *Bacillus subtilis* peptide antibiotic subtilin A determined by ¹H-NMR and matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Protein Chemistry* 20, 501–506.
- McAuliffe, O., Ross, R.P., Hill, C., 2001. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *Federation of European Microbiological Societies (FEMS) Microbiology Reviews* 25, 285–308.
- Menkhaus, M., Ullrich, C., Kluge, B., Vater, J., Vollenbroich, D., Kamp, R.M., 1993. Structural and functional organization of the surfactin synthetase multienzyme system. *Journal of Biological Chemistry* 268, 7678–7684.
- Moita, C., Feio, S.S., Nunes, L., Curto, M.J.M., Roseiro, J.C., 2005. Optimisation of physical factors on the production of active metabolites by *Bacillus subtilis* 355 against wood surface contaminant fungi. *International Biodeterioration and Biodegradation* 55, 261–269.
- Motta, A.S., Lorenzini, D.M., Brandelli, A., 2007a. Purification and partial characterization of an antimicrobial peptide produced by a novel *Bacillus* sp. isolated from the Amazon Basin. *Current Microbiology* 54, 282–286.
- Motta, A.S., Cannavan, F.S., Tsai, S., Brandelli, A., 2007b. Characterization of a broad range antibacterial substance from a new *Bacillus* species isolated from Amazon basin. *Archives of Microbiology* 188, 367–375.
- Motta, A.S., Brandelli, A., 2008. Evaluation of environmental conditions for production of bacteriocin-like substance by *Bacillus* sp. strain P34. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24, 641–646.
- Munambazi, C., Bullerman, L.B., 1998. Inhibition of aflatoxin production of *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 by *Bacillus pumilus*. *Mycopathologia* 140, 163–169.
- Muñoz, A., Maqueda, M., Gálvez, A., Martínez-Bueno, M., Rodríguez, A., Valdivia, E., 2004. Biocontrol of psychrotrophic enterotoxigenic *Bacillus cereus* in a non fat hard cheese by an enterococcal strain producing enterocin AS-48. *Journal of Food Protection* 67, 1517–1521.
- Nakano, M.M., Magnuson, R., Myers, A., Curry, J., Grossman, A.D., Zuber, P., 1991. srfA is an operon required for surfactin production, competence development, and efficient sporulation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 173, 1770–1778.
- Olesen, I., Vogensen, F.V., Jespersen, L., 2009. Gene transcription and virulence potential of *Listeria monocytogenes* strains after exposure to acidic and NaCl stress. *Foodborne Pathogens and Disease* 6, 669–680.
- Oguntoyinbo, F.A., Sanni, A.I., Franz, C.M.A.P., Holzappel, W.H., 2007. In vitro fermentation studies for selection and evaluation of *Bacillus* strains as starter cultures for the production of *okpepe*, a traditional African fermented condiment. *International Journal of Food Microbiology* 113, 208–218.
- Ongena, M., Jacques, P., 2008. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease control. *Trends in Microbiology* 16, 115–125.
- Ouoba, L.L.I., Parkouda, C., Diawara, B., Scotti, C., Varnam, A.H., 2008a. Identification of *Bacillus* spp from *Bikalga*, fermented seeds of *Hibiscus sabdariffa*: phenotypic and genotypic characterization. *Journal of Applied Microbiology* 104, 122–131.
- Ouoba, L.L.I., Thorsen, L., Varnam, A.H., 2008b. Enterotoxins and emetic toxins production by *Bacillus cereus* and other species of *Bacillus* isolated from *Soumbala* and *Bikalga*, African alkaline fermented food condiments. *International Journal of Food Microbiology* 124, 224–230.
- Paik, S.H., Chakicherla, A., Hansen, J.N., 1998. Identification and characterization of structural and transporter genes for, and the chemical and biological properties of Sublancin 168, a novel lantibiotic produced by *Bacillus subtilis* 168. *Journal of Biological Chemistry* 273, 134–142.
- Papagianni, M., 2003. Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function, and applications. *Biotechnology Advances* 21, 465–499.
- Parente, E., Ricciardi, A., Addario, G., 1994. Influence of pH on growth and bacteriocin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 140NWC during batch fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 41, 388–394.
- Parente, E., Ricciardi, A., 1999. Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* 52, 628–638.
- Parkouda, C., Nielsen, D.S., Azokpota, P., Ouoba, L.L.I., Amoa-Awua, W.K., Thorsen, L., Hounhouigan, J.D., Jensen, J.S., Tano-Debrah, K., Diawara, B., Jakobsen, M., 2009. The microbiology of alkaline-fermentation of indigenous seeds used as food condiments in Africa and Asia. *Critical Reviews in Microbiology* 35, 139–156.
- Parkouda, C., Thorsen, L., Compaoré, C.S., Nielsen, D.S., Tano-Debrah, K., Jensen, J.S., Diawara, B., Jakobsen, M., 2010. Microorganisms associated with *maari*, a Baobab seed fermented product. *International Journal of Food Microbiology* 142, 292–301.
- Pedersen, P.B., Bjørnvad, M.E., Rasmussen, M.D., Petersen, J.N., 2002. Cytotoxic potential of industrial strains of *Bacillus* sp. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 36, 155–161.
- Riley, M.A., Wertz, J.E., 2002. Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Annual Review of Microbiology* 56, 117–137.
- Ross, R.P., Morgan, S., Hill, C., 2002. Preservation and fermentation: past, present and future. *International Journal of Food Microbiology* 79, 3–16.
- Sarangi, N.P., Athukorala, W.G., Dilantha, F., Khalid, Y.R., 2009. Identification of antifungal antibiotics of *Bacillus* species isolated from different microhabitats using polymerase chain reaction and MALDI-TOF mass spectrometry. *Canadian Journal of Microbiology* 55, 1021–1032.
- Savadogo, A., Tapé, A., Chollet, M., Wathelet, B., Traoré, A.S., 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. *International Journal of Food Microbiology* 151, 299–306.
- Schillinger, U., Lücke, F.K., 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Applied and Environmental Microbiology* 55, 1901–1906.
- Schillinger, U., Holzappel, W.H., 1990. Antibacterial activity of carnobacteria. *Food Microbiology* 7, 305–310.
- Sivapathasekaran, C., Mukherjee, S., Ramkrishna, S., 2010. Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectral analysis of marine lipopeptides with potential therapeutic implications. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* 16, 79–85.
- Stachelhaus, T., Mootz, H.D., Marahiel, M.A., 2002. Nonribosomal assembly of peptide antibiotics on modular protein templates. In: Sonenshein, A.L., Hoch, J.A., Losick, R. (Eds.), *Bacillus subtilis and Its Closest Relatives: From Genes to Cells*. American Society for Microbiology Press, Washington, D.C., U.S.A., pp. 415–435.
- Stein, T., Borchert, S., Conrad, B., Feesche, J., Hofemeister, B., Hofemeister, J., Entian, K.D., 2002. Two different lantibiotic-like peptides originate from the ericin gene cluster of *Bacillus subtilis* A 1/3. *Journal of Bacteriology* 184 (1703–1711), 1.
- Stein, T., Dusterhus, S., Stroh, A., Entian, K.D., 2004. Subtilosin production by two *Bacillus subtilis* subspecies and variance of the *sbo-α1b* cluster. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 2349–2353.
- Stein, T., 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology* 56, 845–857.
- Stein, T., 2008. Whole-cell matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry for rapid identification of bacteriocin/lantibiotic-producing bacteria. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 22, 1146–1152.
- Steinkraus, K.H., 1996. *Handbook of Indigenous Fermented Foods*, Second ed Marcel Dekker, New York (Revised and Expanded).
- Stenfor, L.P., Granum, P.E., 2001. Psychrotolerant species from the *Bacillus cereus* group are not necessarily *Bacillus weihenstephanensis*. *Federation of European Microbiological Societies (FEMS) Microbiology Letters* 197, 223–228.

- Stenfors, L.P., Fagerlund, A., Granum, P.E., 2008. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. Federation of European Microbiological Societies (FEMS) Microbiology Reviews 32, 579–606.
- Sumi, H., Sasaki, T., Yatagai, C., Kozaki, Y., 2000. Determination and properties of the fibrinolysis accelerating substance (FAS) in Japanese fermented soybean Natto. Nippon No'gei Kagakukaishi 74, 1259–1264.
- Sutyak, K.E., Wirawan, R.E., Aroutcheva, A.A., Chikindas, M.L., 2008. Isolation of the *Bacillus subtilis* antimicrobial peptide subtilosin from the dairy product-derived *Bacillus amyloliquefaciens*. Journal of Applied Microbiology 104, 1067–1074.
- Tabbene, O., Slimene, B.J., Djebali, K., Mangoni, A.-L., Urdaci, M.-C., Limam, F., 2009. Optimization of medium composition for the production of antimicrobial activity by *Bacillus subtilis* B38. Biotechnology Program 25, 1267–1274.
- Tapi, A., Chollet-Imbert, M., Scherens, B., Jacques, P., 2010. New approach for the detection of non-ribosomal peptide synthetase genes in *Bacillus* strains by polymerase chain reaction. Applied Microbiology and Biotechnology 85, 1521–1531.
- Thorsen, L., Azokpota, P., Hansen, B.M., Hounhouigan, D.J., Jakobsen, M., 2010. Identification, genetic diversity and cereulide producing ability of *Bacillus cereus* group strains isolated from Beninese traditional fermented food condiments. International Journal of Food Microbiology 142, 247–250.
- Thorsen, L., Abdelgadir, W.S., Rønsbo, M.H., Abban, S., Hamad, S.H., Nielsen, D.S., Jakobsen, M., 2011. Identification and safety evaluation of *Bacillus* species occurring in high numbers during spontaneous fermentations to produce Gergoush, a traditional Sudanese bread snack. International Journal of Food Microbiology 146, 244–252.
- Tosato, V., Albertini, A.M., Zotti, M., Sonda, S., Bruschi, C.V., 1997. Sequence completion, identification and definition of the fengycin operon in *Bacillus subtilis* 168. Microbiology 143, 3443–3450.
- Tsuge, K., Akiyama, T., Shoda, M., 2001. Cloning, sequencing, and characterization of the iturin A operon. Journal of Bacteriology 183, 6265–6273.
- Turnbull, P.C., Kramer, J.M., Jorgensen, K., Gilbert, R.J., Melling, J., 1979. Properties and production characteristics of vomiting, diarrheal, and necrotizing toxins of *Bacillus cereus*. American Journal of Clinical Nutrition 32, 219–228.
- Wang, L.T., Lee, F.L., Tai, C.J., Kasai, H., 2007. Comparison of *gyrB* gene sequences, 16S rRNA gene sequences and DNA-DNA hybridization in the *Bacillus subtilis* group. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 57, 1846–1850.
- Xie, J., Zhang, R., Shang, C., Guo, Y., 2009. Isolation and characterization of a bacteriocin produced by an isolated *Bacillus subtilis* IFB112 that exhibits antimicrobial activity against domestic animal pathogens. African Journal of Biotechnology 8, 5611–5619.

3.1.3 Résumé de l'article 2

Dans notre étude précédente, nous avons caractérisé les souches de *B. subtilis* ssp. *subtilis* et de *B. licheniformis* dominantes du *Bikalga*. Puis, la souche de *B. subtilis* ssp. *subtilis* H4 a été sélectionnée comme potentiel culture starter sur la base de son pouvoir antimicrobien grâce à la production d'une nouvelle bactériocine et des surfactines. Dans la présente étude, nous nous sommes intéressés à la caractérisation des trois souches de *B. amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* (A4, I8 et G3) également identifiées parmi les *Bacillus* spp. dominants du *Bikalga*. Cette caractérisation a porté sur l'évaluation de leur activité antimicrobienne contre les indicateurs de microorganismes pathogènes testés dans l'étude précédente, en plus de six souches de *Penicillium* spp. Cela a été fait par la méthode de diffusion de tache de culture et celle de diffusion en puits du surnageant de culture. La capacité inhibitrice des trois souches contre *B. cereus* a également été évaluée dans un bouillon préparé à base de graines broyées d'*H. sabdariffa* afin de tester leur capacité en milieu réel. En outre, les caractéristiques et la nature des substances antimicrobiennes produites par les trois souches dans le bouillon BHI ont été examinées par des analyses physico-chimiques et PCR.

Les résultats ont montré que quel que soit la méthode utilisée, les trois souches de *B. amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* présentaient à peu près les mêmes capacités inhibitrices. Elles ont exprimé une forte activité antimicrobienne contre toutes les souches de *Penicillium* spp. et contre tous les indicateurs de bactéries pathogènes Gram-positifs (excepté *Staphylococcus aureus*) et Gram-négatifs comprenant *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *M. luteus*, *E. coli*, *S. Typhimurium*, *S. Nigeria*, *S. Thompson*, *S. Oranienburg*, *S. Enteridis*, *Shigella dysenteria*, *Shigella flexneri* et *Y. enterocolitica*.

Les analyses physico-chimiques des substances inhibitrices ont montré qu'elles étaient résistantes au pH variant de 3 à 11, à la chaleur (jusqu'à 80°C pendant 30 min), ainsi qu'à l'action enzymatique de la trypsine, la papaïne, la protéase, la protéinase K, la catalase, la lipase II et l' α -amylase. Il a également été trouvé que l'activité antimicrobienne des trois souches ne pouvait pas être visualisée par SDS-PAGE, confirmant leur nature non protéique. Les résultats des essais PCR ont révélé la présence des gènes codant pour la synthèse des lipopeptides iturine (*ituA*,

ituD, *ituC*), mycosubtiline (*myc/itu*), bacyllomycine (*bmyA*), surfactine (*srf/lch*) et fengycine (*fen*), les polykétides difficidine (*dfnA*), macrolactine (*mlnA*), bacillaene (*baeA*) et la dipeptide bacilysine (*bacA/B*) dans le génome de chaque souche, ce qui montre que les souches ont la capacité de produire ces composés antimicrobiens. Quant aux gènes codant pour la synthèse des bactériocines de *Bacillus* spp. tels que la subtilosine (*yiwB*, *sboA*, *albA*), la subtiline (*spaS*), l'ericine (*eriC*, *eriSa* et *eriSb*) et la sublancine (*sunT*), elles y étaient absentes (annexe 2). L'analyse HPLC-MS des substances actives a permis d'identifier les lipopeptides iturine, surfactine et fengycine ainsi que certains de leurs dérivés (plipastatine).

En conclusion, cette étude montre que les *B. amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* A4, I8 et G3 ont un large spectre d'activité contre une gamme variée de microorganismes pathogènes. Cette importante activité inhibitrice pourrait être due à une synergie d'action des différents composés produits (lipopeptides iturine, surfactine et fengycine) ou pouvant être produits (polykétides et dipeptide détectés par PCR). En plus, utilisant le bouillon des graines broyées d'*H. sabdariffa* comme seul substrat pour leur croissance, toutes les souches étaient capables de produire une activité inhibitrice contre *B. cereus* indiquant leur capacité à produire des substances antimicrobiennes en milieu réel de fermentation du *Bikalga*. Ces souches pourraient donc constituer un consortium de cultures starters pour la bio-préservation du *Bikalga* contre les microorganismes pathogènes et d'altération des aliments.

Une partie des résultats de ces travaux a également été valorisée sous forme de Poster (annexe 4) présenté au 23^{ème} Symposium International de ICFMH, FoodMicro 2012, 3-7 Septembre 2012, Istanbul, Turquie.

3.1.4 Article 2 publié: *Bacillus amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* strains as potential protective starter cultures for the production of *Bikalga*, an alkaline fermented food.

Compaoré, C.S., Nielsen, D.S., Sawadogo-Lingani, H., Berner, T.S., Nielsen, K.F., Adimpong, D.B., Diawara, B., Ouédraogo, G.A., Jakobsen, M., Thorsen, L., 2013.

Publié dans Journal of Applied Microbiology, 115: 133-146.

ORIGINAL ARTICLE

***Bacillus amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* strains as potential protective starter cultures for the production of *Bikalga*, an alkaline fermented food**

C.S. Compaoré^{1,2,3}, D.S. Nielsen², H. Sawadogo-Lingani¹, T.S. Berner², K.F. Nielsen⁴, D.B. Adimpong², B. Diawara¹, G.A. Ouédraogo³, M. Jakobsen² and L. Thorsen²

¹ Département Technologie Alimentaire (DTA/IRSAT/CNRST), Ouagadougou, Burkina Faso

² Department of Food Science, Faculty of Science, University of Copenhagen, Frederiksberg C, Denmark

³ Institut du Développement Rural/Université Polytechnique de Bobo, BAMSB, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso

⁴ DTU Systems Biology, Department of Systems Biology, Center for Microbial Biotechnology, Technical University of Denmark, Lyngby, Denmark

Keywords

antimicrobial activity, *Bacillus amyloliquefaciens* ssp. *plantarum*, bikalga, lipopeptides, polyketides, starter cultures.

Correspondence

Clarisse S. Compaoré, Département Technologie Alimentaire (DTA/IRSAT/CNRST), Ouagadougou 03 BP 7047, Burkina Faso.
E-mail: compaclara@yahoo.fr

2013/2241: received 15 December 2012, revised 4 March 2013 and accepted 2 April 2013

doi:10.1111/jam.12214

Abstract

Aims: To identify and screen dominant *Bacillus* spp. strains isolated from *Bikalga*, fermented seeds of *Hibiscus sabdariffa* for their antimicrobial activities in brain heart infusion (BHI) medium and in a *H. sabdariffa* seed-based medium. Further, to characterize the antimicrobial substances produced.

Methods and Results: The strains were identified by *gyrB* gene sequencing and phenotypic tests as *B. amyloliquefaciens* ssp. *plantarum*. Their antimicrobial activity was determined by the agar spot and well assay, being inhibitory to a wide range of Gram-positive and Gram-negative pathogenic bacteria and fungi. Antimicrobial activity against *Bacillus cereus* was produced in *H. sabdariffa* seed-based medium. PCR results revealed that the isolates have potential for the lipopeptides iturin, fengycin, surfactin, the polyketides difficidin, macrolactin, bacillaene and the dipeptide bacilysin production. Ultra-high-performance liquid chromatography-time of flight mass spectrometry analysis of antimicrobial substance produced in BHI broth allowed identification of iturin, fengycin and surfactin.

Conclusions: The *Bacillus amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* exhibited broad-spectrum antifungal and antibacterial properties. They produced several lipopeptide antibiotics and showed good potential for biological control of *Bikalga*.

Significance and Impact of the Study: Pathogenic bacteria often occur in spontaneous food fermentations. This is the first report to identify indigenous *B. amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* strains as potential protective starter cultures for safeguarding *Bikalga*.

Introduction

There is an increased interest in searching for bacteria with new antimicrobial properties that can be used as: (i) protective starter cultures for foods; (ii) as new probiotics or as producers of alternatives to existing antibiotics; (iii) against antibiotic resistant pathogenic bacteria (Guo *et al.* 2012). *Bikalga* is a traditional food condiment obtained by a spontaneous and alkaline fermentation of the plant *H. sabdariffa* seeds. It is widely used in Burkina Faso as a

flavouring agent in soups and sauces and constitutes an affordable source of proteins (22–30%), lipids, carbohydrates, essential amino, fatty acids and vitamins (Bengaly *et al.* 2006). *Bacillus subtilis* group species are the main micro-organisms involved in the fermentation of *H. sabdariffa* seeds into *Bikalga* (Ouoba *et al.* 2008a). The spontaneous nature of the fermentation processes sometimes results in the occurrence of pathogenic and spoilage micro-organisms, leading to products that are unsafe and of varying quality (Ouoba *et al.* 2008b; Agbatinkpo

et al. 2013). In order to control the fermentation process, starter cultures producing antimicrobial compounds active against relevant pathogens and spoilage organisms could be used (Holzapfel 2002; Ouoba *et al.* 2007). Currently, no suitable starter cultures for *Bikalga* production have been developed.

Many studies have reported that the predominant *B. subtilis* group species isolated from African alkaline fermented food products such as *Soumbala*, *Netetu* and *Maari* could exhibit potent antimicrobial effects towards harmful bacteria and fungi (Ouoba *et al.* 2007; Savadogo *et al.* 2011; Kaboré *et al.* 2012), though only a few of the antimicrobial substances produced were further identified (Savadogo *et al.* 2011; Kaboré *et al.* 2012).

Bacillus subtilis group species can produce a wide variety of antimicrobial compounds with different chemical structures including bacteriocins, bacteriocin-like substances (BLIS), polyketides and lipopeptide antibiotics (Zimmerman *et al.* 1986; Patel *et al.* 1995; Stein 2005; Abriouel *et al.* 2010). The bacteriocins (and BLIS) including, for example subtilin (Stein 2005), subtilosin A (Sutyak *et al.* 2008), ericin (Stein *et al.* 2002) and sublancin (Paik *et al.* 1998) are ribosomally produced. The antimicrobial activity of subtilin, subtilin, ericin and sublancin has been reported against various Gram-positive and Gram-negative pathogens such as *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* (Paik *et al.* 1998; Sutyak *et al.* 2008). A variety of nonribosomally produced lipopeptides grouped into three main families: surfactins/lichenysins, iturins/bacillomycins/mycosubtilins and fengycins/plipastatins are also produced by *Bacillus subtilis* group species (Ongena and Jacques 2008). These lipopeptides have been reported to have antifungal and antibacterial activity (Huang *et al.* 2007; Ongena and Jacques 2008; Cao *et al.* 2009). The primary structure and gene organization of the operons encoding peptide synthetases for the *Bacillus* cyclic lipopeptides surfactin (*urf*), plipastatin (*pps*), fengycin (*fen*), bacillomycin (*bmy*), iturin (*itu*) and mycosubtilin (*myc*) have been described (Tosato *et al.* 1997; Tsuge *et al.* 2001; Koumoutsi *et al.* 2004). Recently, based on the alignment of nucleic sequences of Adenylation and Thiolation domains, specific degenerated primers which could detect non-ribosomal peptide synthetase genes particularly involved in lipopeptide biosynthesis in *Bacillus* strains were designed (Tapi *et al.* 2010). Compared to chemical agents, lipopeptides are safer for the environment and several reports have described their valuable role in the use of *Bacillus* spp. strains as biocontrol agents of plant diseases (Ongena and Jacques 2008; Chen *et al.* 2009).

The aim of the present work was to investigate the antimicrobial activity against various fungi and foodborne bacterial pathogens of *Bacillus* spp. isolates belonging to the predominant *Bacillus subtilis* group spp.

isolated from *Bikalga*; to biochemically characterize the antimicrobial compounds produced and to identify these compounds by using PCR and UHPLC-TOFMS techniques. Further, to test the antimicrobial activity production in a *H. sabdariffa* seed-based broth medium.

Materials and methods

Bacterial strains and growth conditions

Three aerobic spore formers previously identified by 16S rRNA gene sequencing as *Bacillus subtilis* (A4, 18, G3) (Ouoba *et al.* 2008a) were investigated. Target microorganisms for the analysis of antimicrobial activities by the agar spot and agar well diffusion test described below were obtained from different sources (Table 1). One of the sensitive target organisms, *Bacillus cereus* NVH391-98 was used as indicator (highlighted in bold in Table 1), when analysing physical and chemical properties, and kinetics of antimicrobial substance production. Bacteria were maintained as stock cultures at -80°C in appropriate broth medium (brain heart infusion (BHI), Oxoid CM1135, Basingstoke, UK), or nutrient broth (Oxoid CM0001) supplemented with 20% (v/v) glycerol. The yeast were maintained in yeast glucose peptone broth made of 1% (w/v) bacto-peptone (211677; Becton, Dickinson, Sparks, MD, USA), 1% (w/v) glucose (Merck 38291142, Darmstadt, Germany), 0.5% (w/v) yeast extract (Oxoid LP0021), pH 5.6 ± 2 , while the moulds were maintained in malt extract broth (Oxoid CM0057) supplemented with 20% (v/v) glycerol. The *Bacillus* spp. isolates were grown in BHI broth at 37°C before use. Indicator organisms were propagated in appropriate media and temperature as indicated in Table 1.

DNA extraction

DNA for PCR was extracted by boiling 1 loopful of bacterial colony mass, obtained from an overnight culture grown at 30°C on Luria Bertani agar (5 g l^{-1} yeast extract, 10 g l^{-1} tryptone (Becton, Dickinson), 10 g l^{-1} NaCl, 15 g l^{-1} Bacto Agar (Becton, Dickinson) in $250\text{ }\mu\text{l}$ Tris-EDTA-buffer pH 7.5 for 10 min. The cell debris was pelleted by centrifugation at $15\text{ }000\text{ g}$ for 10 min. The supernatant containing the DNA was transferred to a fresh Eppendorf tube and stored at 4°C .

Re-identification of the isolates

Re-identification of the *Bacillus* isolates was performed by *gyrB* gene sequencing (Wang *et al.* 2007) and by phenotypic tests, including growth in 4, 7 and 10% (w/v) NaCl in nutrient broth (Merck 1.05443.0500) at 30 and 37°C ,

Table 1 Inhibitory spectrum of *Bacillus amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* A4, I8 and G3 in BHI medium as determined by agar spot test (*) and agar well diffusion test (**)

Target organisms†	Media‡/Temp (°C)	Inhibition zone (mm)					
		A4		I8		G3	
		*	**	*	**	*	**
Gram-positive							
<i>Bacillus cereus</i> MADM 1291 (8)	BHV37	–	++	–	++	–	++
<i>Bacillus cereus</i> MADM 1561 (7)	BHV37	–	++	–	++	–	++
<i>Bacillus cereus</i> NVH391-98 (6)^a	BHV37	+	++++	+	++++	+	+++
<i>Bacillus cereus</i> 007525 (5) ^b	BHV37	–	++	+	++	–	++
<i>Bacillus cereus</i> F4810-72 (4)	BHV37	–	++	–	++	–	++
<i>Bacillus cereus</i> NC 7401 (4) ^c	BHV37	–	++	–	++	–	++
<i>Bacillus cereus</i> Ba18H2 (9) ^d	BHV37	–	++	–	++	–	++
<i>Bacillus cereus</i> F3752A/86 (2)	BHV37	–	++	–	++	–	++
<i>Bacillus cereus</i> LMG13569 (2)	BHV37	++	++	+	++	+	++
<i>Listeria monocytogenes</i> 057 (1)	BHV37	–	+++	–	+++	–	++
<i>Listeria monocytogenes</i> L028 (1)	BHV37	+	+++	+	+++	+	++
<i>Listeria monocytogenes</i> Scott A (1)	BHV37	++	+++	+	++	+	+++
<i>Listeria monocytogenes</i> NCTC 9863 (2)	BHV37	++	++++	++	++++	++	+++
<i>Micrococcus luteus</i> SKN 624 (1)	NA/30	+	++	+	++	+	++
<i>Micrococcus luteus</i> AT49732 (2)	NA/30	+	++	+	++	+	++
<i>Staphylococcus aureus</i> NCTC 10656 (2)	BHV37	–	–	–	–	–	–
Gram-negative							
<i>Salmonella</i> Typhimurium SKN 1155 (10)	BHV37	+++	+	+++	+	+++	+
<i>Salmonella</i> Typhimurium SKN 533 (1)	BHV37	+++	+	+++	+	+++	+
<i>Salmonella</i> Typhimurium O:1036340P/t49 (2)	BHV37	+	–	–	–	–	–
<i>Salmonella</i> Nigeria SKN 1160 (11)	BHV37	+++ (p)	+	++ (p)	+	++ (p)	+
<i>Salmonella</i> Thompson SKN 565 (1)	BHV37	++	–	++	–	++	–
<i>Salmonella</i> Oranienburg SKN 1157 (12)	BHV37	+++	–	++	–	++	–
<i>Salmonella</i> Infantis SKN 557 (1)	BHV37	+++	–	++	–	+++	–
<i>Salmonella</i> Enteridis P 167807 (2)	BHV37	+	–	+	–	+	–
<i>Yersinia enterocolitica</i> 6A28 SKN 599 (1)	BHV37	+++	++	+++	++	+++	++
<i>Yersinia enterocolitica</i> 8A30 SKN 601 (1)	BHV37	++	++	–	++	–	++
<i>Yersinia enterocolitica</i> BT35T5,27 (2)	BHV37	+++	++	+++	++	+++	++
<i>Escherichia coli</i> 81 nr.149 SKN 541 (1)	BHV37	–	+	–	+	–	+
<i>Shigella dysenteriae</i> 370 (2)	BHV37	+	++	+	++	+	++
<i>Shigella flexneri</i> USCC 2007 (2)	BHV37	–	++	–	++	–	++
Fungi							
<i>Candida tropicalis</i> (3) ^f	YGP/30	–	–	–	–	–	–
<i>Candida kefyr</i> (3) ^f	YGP/30	–	–	–	–	–	–
<i>Candida krusei</i> (3) ^e	YGP/30	–	–	–	–	–	–
<i>Candida albicans</i> (13)	YGP/30	–	–	–	–	–	–
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i> (1)	YGP/30	–	–	–	–	–	–
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> KVL 013 (1)	YGP/30	–	–	–	–	–	–
<i>Penicillium nordicum</i> 101763 (1)	PDA/25	++	ND	+++	ND	++	ND
<i>Penicillium camemberti</i> 112362 (1)	PDA/25	++	ND	++	ND	++	ND
<i>Penicillium commune</i> 311.48 (1)	PDA/25	++	ND	+++	ND	++	ND
<i>Penicillium commune</i> 341.59 (1)	PDA/25	++	ND	++	ND	++	ND

–, no inhibition; +, 1 ≤ inhibition < 3 mm; ++, 3 ≤ inhibition < 5 mm; +++, 5 ≤ inhibition < 7 mm; +++++, inhibition ≥ 7; (p), partial, i.e. inhibition zone was not totally clear; ND, not determined.

†Origin and/or reference: (1): Culture collection of Copenhagen University; (2): Culture collection of London Metropolitan University; (3): Isolated from Fura; (4): Emetic food poisoning; (5): Stew (food poisoning); (6): Food poisoning, kindly provided by INRA, France; (7): Cooked chicken (food poisoning), Brazil; (8): Birthday cake (food poisoning), Brazil; (9): Cereulide producer isolated from Sonru; (10): Animal; (11): Cocoa beans; (12): Human; (13): Blood sample. ^{a, b, c, d, e} = references, ^a: Lund *et al.* 2000; ^b: Stenfors and Granum 2001; ^c: Agata *et al.* 1994; ^d: Thorsen *et al.* 2010; ^e: Lindegaard Pedersen *et al.* 2012.

‡BHI, brain heart infusion; NA, nutrient agar; YGP, yeast glucose peptone; PDA, potato dextrose agar.

and at 50°C on nutrient agar (Merck 1.05450.0500) to discriminate between *B. amyloliquefaciens* and *B. methylophilicus* (Madhaiyan et al. 2010).

Screening for antimicrobial activity by agar spot and agar well diffusion assays

Antimicrobial activity as determined by agar spot assay

Inocula of the *Bacillus* spp. isolates A4, I8, G3 were prepared as follows: from BHI agar plates incubated for 24 h at 37°C, the isolates were subcultured under agitation for 18 h at 37°C in 10 ml of BHI broth, pH 7. The cultures were centrifuged at 5000 g for 10 min and the pellet re-suspended in 5 ml of sterile saline solution containing 8.5 g l⁻¹ NaCl and 1.5 g l⁻¹ bactopectone, pH 7.0. The number of cells was estimated by microscopy using a counting chamber (Neubauer, Wertheim, Germany) and dilutions were made in sterile saline to obtain a rate of inoculation of 10⁵ cells ml⁻¹.

The target organisms were grown overnight (bacteria), 48 h (yeasts) or 10 days (moulds) in appropriate media and temperature as described in Table 1. For antimicrobial activity testing, 100 µl (about 10⁷ CFU ml⁻¹) of indicator was spread-plated on potato dextrose agar plates (213400; Becton, Dickinson) (only when testing for moulds inhibition) or mixed with 10 ml BHI agar (Oxoid CM1136) or nutrient agar or yeast glucose peptone agar [made of 1% (w/v) bactopectone, 1% (w/v) glucose, 0.5% (w/v) yeast extract, 2% (w/v) agar (Oxoid LP0013), pH 5.6 ± 2] poured in a Petri dish and then allowed to solidify. Three microlitre of the *Bacillus* spp. inoculum (approximately 10⁵ CFU ml⁻¹) or 20 µl (for inhibition test against moulds) was spotted on the surface and the dish was incubated at the optimal temperature (as described in Table 1) of the indicator organism for 24 h (BHI agar and nutrient agar), 48 h (YGP agar) or 7 days (PDA). The presence of a clear zone around the spot was measured and the results reported in mm. The experiment was performed in duplicate on three or two (for moulds inhibition test) separate occasions.

Antimicrobial activity as determined by agar well diffusion method

Cell-free supernatants (CFS) were obtained by cultivating strains A4, I8 and G3 overnight (18 h) in 50 ml of BHI broth at 37°C in a rotary shaker at 120 cycles per min. Cells were pelleted by centrifugation at 10 000 g for 30 min at 4°C. The pH of the supernatants was adjusted to 7 with 1 mol l⁻¹ NaOH, and the supernatants were sterile filtered through a 0.45 µm pore-size filter (Tabbene et al. 2009).

The agar well diffusion method used was a modified version of a previously published protocol (Bizani and

Brandelli 2002). Briefly, 100 µl of indicator (approximately 10⁷ CFU ml⁻¹) was mixed with 10 ml BHI agar or nutrient agar or YGP agar in a Petri dish. After cooling, 6 mm diameter wells were cut into the agar plates and filled with 20 µl of CFS. The plates were incubated at the optimal temperature of the indicator organism (Table 1) and inhibition zone diameters were measured after appropriate time as described above. Un-inoculated BHI broth or nutrient broth or YGP broth was used as negative controls. The experiment was conducted in duplicate on three separate occasions.

Physical and chemical properties of antimicrobial substances

Effect of heat, pH and enzymes on antimicrobial activity

To analyse the thermal stability of the antimicrobial substance produced by isolates A4, I8 and G3, aliquots of CFS obtained as described above were exposed to temperatures of 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 and 100°C for 30 min, autoclaving at 121°C for 15 min, 4°C for 30 days and -20°C for 30 days. The effect of pH on the antimicrobial activity was tested by adjusting CFS to pH's between 3 and 11 (with an increment of one pH unit) using 1 mol l⁻¹ NaOH or HCl. The CFS with adjusted pH were then incubated for 2 h at 37°C before being neutralized to pH 7. After each treatment, residual activity was determined using the agar well diffusion method with *B. cereus* NVH391-98 as indicator organism. All experiments were done in duplicate on two separate occasions. An untreated CFS served as controls in each test.

The stability of the antimicrobial substance was also tested against a range of enzymes (all obtained from Sigma-Aldrich, Brøndby, Denmark): Trypsin from bovine pancreas (T8003), papain lyophilized (P4762), protease from *Streptomyces griseus* (P6911) and proteinase K from *Tritirachium album* (P6556) (all proteolytic); catalase from bovine liver (C1345), lipase II from porcine pancreas (L3126) and α-amylase from porcine pancreas (A3176) (nonproteolytic enzymes). All enzymes were dissolved in buffers as recommended by the supplier. Samples of CFS obtained as described above were treated with each enzyme at 37°C for 2 h at a final concentration of 1 and 2 mg ml⁻¹ and assayed for antimicrobial activity against *B. cereus* NVH391-98. Untreated CFS plus buffer, buffer alone, and enzyme solutions served as controls. The experiments were conducted in duplicate on two separate occasions.

Direct detection of antimicrobial activity on SDS-PAGE gels
Proteins from 20 ml CFS of isolates A4, I8 and G3 (grown in BHI broth) were precipitated on ice with 11%

(w/v) trichloroacetic acid (TCA). The protein precipitates were pelleted by centrifugation at 15 000 g for 30 min at 4°C and washed twice in 1/3 volume ice-cold acetone. Supernatants were collected after each centrifugation step to test their antimicrobial activity. Protein pellets were solubilized in 200 µl Tris-buffer (20 mmol l⁻¹ Tris, 1 mmol l⁻¹ EDTA, pH 7). The activity of the supernatants (TCA and acetone) and the dissolved protein pellets was tested by the well diffusion test against the indicator organism *B. cereus* NVH391-98. Tris-buffer was used as negative control.

SDS-PAGE analysis was performed by separating proteins on a 20% RunBlue SDS-page gel. Ten microlitres of sample (from each strain) was loaded on the gel together with a Sharp Novex marker, range 3.5–260 kDa (LC5801; Invitrogen). Following electrophoresis (180 V, 90 mA, 50 min), the gel was stained with coomassie brilliant blue (0.1% Coomassie R-250, 40% ethanol, 10% acetic acid) for 1 h, destained for 1 h (7.5% acetic acid, 10% ethanol) and washed for 4 h in sterile distilled water to replace separation SDS and separation buffer in the gel. The gel was overlaid with 5 ml of soft BHI agar (0.7% w/v) inoculated with 10⁵ cells ml⁻¹ of the indicator strain *B. cereus* NVH391-98. The overlaid gel was incubated at 37°C for 24 h and observed for the presence of an inhibition zone (Motta *et al.* 2007a).

UHPLC-TOFMS analysis of antimicrobial substances

The isolate I8 was randomly chosen for this experiment. The strain was grown in BHI broth and two different methods were used for the extraction of antimicrobial substance(s).

Method 1

Duplicate samples of I8 CFS were prepared as previously described and precipitated with 11% (w/v) TCA. The suspensions were subjected to centrifugation at 15 000 g for 30 min at 4°C. Ice-cold acetone (10 ml) was added to each precipitate and samples were centrifuged at 15 000 g for 30 min at 4°C. The resulting supernatant was evaporated to dryness with N₂. One set of the samples was dissolved in 30% (v/v) ethanol in 1 ml of water before being used to test the antimicrobial activity against the target micro-organisms (Table 1); the other sample set was kept at -20°C for chemical analysis. TCA collected after CFS precipitation and solution of 30% ethanol in water were used as negative controls in the antimicrobial activity assay.

Method 2

Duplicate samples were prepared, 5 ml of the test strain CFS was precipitated with 5 ml ethyl-acetate while stir-

ring overnight. The upper phase was transferred to a new vial and evaporated to dryness using N₂. One of the samples was dissolved in 30% (v/v) ethanol in 1 ml water before being used to test for antimicrobial activity against the target micro-organisms (Table 1) while the other was kept at -20°C for UHPLC-TOFMS analysis. Solutions of 30% (v/v) ethanol in water and ethyl-acetate were used as negative controls.

UHPLC-TOFMS was conducted on an Ultimate 3000 UHPLC system (Dionex, Sunnyvale, CA, USA) coupled with a maXis G3 quadrupole time of flight mass spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) equipped with an electrospray (ESI) source. Separation of 1–5 µl samples was performed at 40°C on a 150 mm × 2.1 mm ID, 1.7 µm BEH C₁₈ column (Waters, Milford, MA, USA) using a linear water-acetonitrile gradient (both buffered with 20 mM formic acid) at a flow of 0.4 ml min⁻¹ starting from 10% acetonitrile and increased to 100% in 9 min, keeping this for 2 min. HRMS was performed in ESI⁺ with a data acquisition range of 10 scans per sec at *m/z* 100–1500 and a resolution of 40 000 FMWH. The MS was calibrated using sodium formate automatically infused prior to each analytical run, providing a mass accuracy of <1.5 ppm in MS mode. Peaks only observed in the base peak chromatograms of the bioactive samples were assessed for adduct formation of [M+H]⁺, [M+2H]²⁺, [M+NH₄]⁺, [M+H+NH₄]²⁺, [M+Na]⁺, [M+H+Na]²⁺ and the accurate mass (±0.005 *m/z*) searched in Antibase2010 (37 185 microbial secondary metabolites) (Wiley & Sons, Hoboken, NJ, USA). Reference standards of iturins and surfactins (Sigma-Aldrich) were co-analysed.

Detection of bacteriocin, lipopeptide and polyketide synthesis genes by PCR

Polymerase chain reactions were performed to determine the presence of subtilin, subtilosin, ericin, sublancin, iturin, mycosubtilin/iturin, surfactin/lichenysin, fengycin, plipastatin, bacillomycin, diffcadin, bacillaene, macrolactin and bacilycin biosynthesis genes in the DNA of isolates A4, I8 and G3. Genomic DNA of *B. amyloliquefaciens* DSM7 (*ituC*, *ituD*, *ituA*, *bacA/B*, *bmyA*, *baeA*), *B. subtilis* subsp. *subtilis* DSM 10 (*srfA*, *sfp*, *ywiB*, *spoA*, *albA*) and *B. subtilis* subsp. *spizizenii* DSM 15029 (*etnS*) were used as positive controls. PCR-amplifications were carried out in a 25-µl reaction mixture containing 2 × PCR Master Mix/Dream Taq Green (12.5 µl) (Fermentas GmbH, St Leon-Rot, Germany), sterile high purity water (9.5 µl), 1 µl of each forward and reverse primer (10 pmol µl⁻¹) (Table 2) and 1 µl of template DNA. The amplifications were performed in a thermocycler (Applied Biosystems, 2720, Singapore) using the PCR

Table 2 PCR detection of bacteriocin, lipopeptide and polyketide biosynthesis genes from *B. amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* strains A4, G3 and I8

Bacteriocins/Lipopeptides/Polyketides	Genes	Primers	Primer sequence (5'-3')	PCR product size expected/ detected*	Reference
Subtilisin	<i>ywiB</i> <i>sboA</i>	Osbo P1N	CCTCATGACCAGGACTTCGCCTT	1200 bp/no	Kaboré et al. (2012)
		Osbo P2N	CGGTGCCGAGCGCTTCAGGT		
Subtilin†	<i>spaS</i>	SpaS_Fwd SpaS_Rev	CAAAGTTCGATGATTTTCGATTTGGATGT GCAGTTACAAGTTAGTGTGAAGGAA	152 bp/no	Sutyak et al. (2008)
Ericin	<i>eriC</i> <i>eriSa</i> <i>eriSb</i>	Eric_F	TCAACTGACC GGGCAGGAGC	1440 bp/no	Kaboré et al. (2012)
		Eric_R	AAGTATTTGGCTACAGCGACTCG		
Sublancin	<i>sunT</i>	SUNT-F1 SUNT-R1	GCTTTGTTAGAAGGGGAGGAAT CTTGTCACAAACCATAGGATAA	974 bp/no	Chung et al. (2008)
Iturin	<i>ituD</i> <i>ituC</i>	ITUD-F1 ITUD-R1	TTGAAAGTTCAGYGCSCCTTT TGCGMAAATAATGGSGTCGT	482 bp/yes	Chung et al. (2008)
		ITUC-F1 ITUC-R1	CCCCCTCGGTCAAGTGAATA TTGGTTAAGCCCTGATGCTC	594 bp/yes	
Iturin A	<i>ituA</i>	ITUD1F ITUD1R	GATGCGATCTCCTTGGATGT ATCGTCATGTGCTGCTTGAG	647 bp/yes	Sarangi et al. (2009)
		Surfactin	<i>srfa</i> <i>sfp</i>	SRFA-F1 SRFA-R1	AGAGCACATTGAGCGTTACAAA CAGCATCTCGTTCAACTTTCAC
SFP-F1 SFP-R1	ATGAAGATTACGGAATTTA TTATAAAGCTCTTCGTACG			675 bp/no	
Mycosubtilin	<i>myclitu</i>	As1-F Ts2-R	CGCGGTMACC GVATYAGC ATBCCTTTBTWDGAATGTCGCC	419, 422, 425, 431/yes	Tapi et al. (2010)**
		Am1-F Tm1-R	CAKARGTSAAAATYCGMGG CCDASATCAARAADTTATC	416, 419/yes	Tapi et al. (2010)
Fengycin	<i>fen</i>	Af2-F Tf1-R	GAATAYMTCGGMCGTMTKGA GCTTTWADKGAATSBCGCC	443, 452/yes	Tapi et al. (2010)
Plipastatin	<i>pps</i>	Ap1-F Tp1-R	AGMCAGCKSGCMASATCMCC GCKATWWTGAARRCCGGCGG	893, 959, 929/yes‡	Tapi et al. (2010)
Bacillaene	<i>baeA</i>	baeR_F baeR_R	ATG TCA GCT CAG TTT CCG CA GAT CGC CGT CTT CAA TTG CC	688 bp/yes	This study
Macrolactin	<i>mlnA</i>	mlnA_F mlnA_R	CCG TGA TCG GAC TGG ATG AG CAT CGC ACC TGC CAA ATA CG	668 bp/yes	This study
Bacilysin	<i>bacA/B</i> <i>bacB</i>	bacA/B_F bacA/B_R	TGC TCT GTT ATA GCG CGG AG GTC ATC GTA TCC CAC CCG TC	910 bp/yes	This study
Bacillomycin	<i>bmyA</i>	bmyA_F bmyA_R	CTC ATT GCT GCC GCT CAA TC CCG AAT CTA CGA GGG GAA CG	853 bp/yes	This study
Difficidin	<i>dfnA</i>	dfnA_F dfnA_R	GGA TTC AGG AGG GCA TAC CG ATT GAT TAA ACG CGC CGA GC	653 bp/yes	This study

*PCR product detected for all *B. amyloliquefaciens* (A4, I8, G3) and for *B. amyloliquefaciens* ssp. *amyloliquefaciens* DSM7 (except for with the primers Ap1-F/Tp1-R, mlnA_F/R, bmy_F/R and dfnA_F/R) type strain.

†The *spaS* primers target both *spaS* and *etsS* a *spaS*-like gene in DSM15029. Targeting of *etsS* (also 152 bp) of DSM15029 has been confirmed by sequencing (Line Thorsen, unpublished results).

‡PCR product detected for only isolate I8.

**The primer pair As1-F, Ts2-R may anneal to both surfactin and lichenysin synthesis genes, Am1-F, Tm1-R may anneal to both mycosubtilin and iturin synthesis genes, while Af2-F, Tf1-R may anneal to fengycin, plipastatin synthesis genes.

conditions as previously described in the indicated references (Table 2). Primers for the detection of genes involved in the synthesis of the polyketide antibiotics macrolactin (*mlnA*), bacillaene (*baeA*) and difficidin (*dfnA*), the dipeptide bacilysin (*bacA/B*) and bacillomycin (*bmyA*) of the iturin family were designed based on the genome sequence of *B. amyloliquefaciens* ssp. *amylolique-*

faciens FZB42 (NC_009725) using primer blast 3 (Ye et al. 2012). PCR conditions were as follows: 94°C for 4 min, 30 cycles of 94°C for 30 s, 57°C for 30 s, 72°C for 75 s. Final elongation was at 72°C for 7 min. The amplified products were detected by agarose gel electrophoresis (1.5% (w/v) agarose, 120 V, 2 h) followed by ethidium bromide staining and documented under UV light visual-

ization. PCR was scored positive when a band of the appropriate size was visualized.

Kinetics of antimicrobial substance production in BHI broth

To study the kinetics of the antimicrobial substance production, each strain (A4, I8 and G3) was inoculated into 50 ml of BHI medium, in 250 ml Erlenmeyer flasks, at a concentration of 10^2 – 10^3 CFU ml⁻¹. The cultures were incubated at 37°C in a water bath (GFL 1083; Bie and Berntsen, Rødovre, Denmark) under shaking conditions (120 cycles per min). Samples were aseptically taken at 2 h intervals over 24 h. Growth was monitored by determining the optical density using a spectrophotometer (O.D; Shimadzu, Kyoto, Japan) and by plate counting on BHI agar (CFU ml⁻¹), and the pH of each sample was recorded (PHM 250; Radiometer Analytical, Brønshøj, Denmark). Antimicrobial activity of CFS was evaluated by the agar well diffusion method as described above with *B. cereus* NVH391-98 as indicator strain.

Antimicrobial activity in *H. sabdariffa* seed-based broth

The *Bacillus* spp. isolates A4, I8 and G3 were tested for their ability to produce antimicrobial substance(s) during growth in *H. sabdariffa* seed-based broth, prepared as described in the following: *H. sabdariffa* seeds purchased at a market in Ouagadougou, Burkina Faso, were ground into flour using a crusher (Bosch MKM 6003). The flour was cooked in distilled water for 3–4 h (5 g flour per 50 ml MQ water in a 250 ml Erlenmeyer flask); the pH was adjusted to 7.4 ± 0.2 and the broth was autoclaved at 121°C for 15 min. The *Bacillus* spp. isolates were inoculated into the broth at an initial concentration of 10^5 CFU ml⁻¹, and incubated in a water bath (GFL 1083; Bie and Berntsen) overnight (18 h) at 37°C under shaking conditions (120 cycles per min). Samples were collected to determine viable counts (CFU ml⁻¹), pH and antimicrobial activity of CFS against *B. cereus* NVH391-98 by the agar well diffusion assay as described above. CFS of the isolates A4, I8 and G3 cultivated in BHI broth were used as positive controls. The experiment was conducted in duplicate on two separate occasions.

Additionally, the kinetics of antimicrobial substance (s) production in *H. sabdariffa* seed-based broth was studied as described for the study in BHI broth using the isolate A4.

Sequence accession numbers

The *gyrB* sequences determined in the present study have been deposited under Genbank accession numbers JX843448–JX843450.

Results

Re-identification of *Bacillus* isolates

The *gyrB* gene sequences of A4, I8 and G3 showed 99% identity to *B. amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* strains CAU B946 (NC_016784), YAU B9601-Y2 (NC_017061), 98% to the *B. amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* type strain FZB42 (CP000560) and 96% identity to the *B. amyloliquefaciens* ssp. *amyloliquefaciens* type strain DSM7 (FN597644) and *Bacillus siamensis* KCTC 13613 (AJVF01000039). Although the identity to the recently described species *B. methylotrophicus* was also 98%, the phenotypic traits of strains A4, I8 and G3 were typical of *B. amyloliquefaciens* (growth in 10% (w/v) NaCl and at 50°C). The studied *Bacillus* isolates previously identified by 16S rRNA gene sequencing as *B. subtilis* were therefore re-identified as *B. amyloliquefaciens* ssp. *plantarum*.

Antimicrobial activity in BHI medium

As seen in Table 1, *B. amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* A4, I8 and G3 showed almost the same inhibitory capacity in the agar spot test as compared to in the agar well test. Antimicrobial activity was observed towards *Penicillium* spp. and a wide range of Gram-positive and Gram-negative bacteria, including the pathogens *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., and *Yersinia enterocolitica*. The differences observed between the two methods used resided in the fact that most of the *Salmonella* spp. were strongly inhibited in agar spot test, but not in the agar well diffusion assay. By contrast, most of the *B. cereus* strains were not inhibited in the agar spot test, but their growth was strongly inhibited by the CFS of the studied *B. amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* isolates.

Effect of enzymes, heat and pH on antimicrobial activity

The antimicrobial substance(s) produced by the studied isolates was resistant (100% activity against *B. cereus* NVH391-98) to the proteolytic enzymes trypsin, papain, protease and proteinase K, and to catalase, lipase II and α -amylase. The antimicrobial substance was also shown to retain 100% of its initial activity within the pH range of 3 to 11 and following exposure to temperatures of up to 80°C for 30 min, storage for up to 30 days at refrigerated temperature (4°C) and at freezing temperature (–20°C) for 30 days. However, the inhibitory activity decreased to 75% and 50% when exposed for 30 min to 90°C and 100°C, respectively and was completely lost after autoclaving at 121°C for 15 min.

Direct detection of antimicrobial activity on gels

The protein profiles obtained by SDS gel electrophoresis of TCA precipitates of CFS of isolates G3, I8 and A4 were highly similar, showing several bands of between approximately 160 and 3 kDa (results not shown). No inhibition zones were observed in the part of the gel overlaid by the indicator *B. cereus* NVH391-98 (results not shown). When TCA precipitates were washed with ice-cold acetone, a yellow pigmented supernatant was obtained showing 80–90% antimicrobial activity (compared to antimicrobial activity of crude CFS, results not shown) against *B. cereus* NVH391-98.

UHPLC-TOFMS analysis of antimicrobial compounds

The antimicrobial substances produced in BHI broth by *B. amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* I8 and which were extracted using acetone (from TCA precipitated proteins) and ethyl-acetate (directly from CFS) were tested for antimicrobial activity against the target micro-organisms before being analysed by UHPLC-TOFMS. The acetone extract was active against most of the Gram-positive pathogenic bacteria and all the yeasts, while the ethyl-acetate extract was active against both Gram-positive and Gram-negative pathogenic bacteria (results not shown). UHPLC-TOFMS analysis of acetone and ethyl-acetate extracts revealed the presence of iturins, fengycins,

surfactins and their derivatives in addition to other compounds (Figs 1 and 2).

PCR detection of bacteriocin, lipopeptide and polyketides biosynthesis genes

As seen in Table 2, all the *B. amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* isolates A4, G3 and I8 were found to be negative for the genes involved in the biosynthesis of the bacteriocins subtilin and entianin (*spaS*, *etnS*), sublancin (*sunT*), ericin (*eriC*, *eriSa* and *eriSb*) and subtilosin (*yiwB*, *sboA*, *albA*). However, they harboured genes involved in the biosynthesis of the lipopeptides iturins (*ituA*, *ituD*, *ituC*), mycosubtilin/iturin (*myc*), bacillomycin (*bmyA*), surfactin (*srf*) and fengycin (*fen*), the polyketides macrolactin (*mlnA*), bacillane (*baeA*) and difficidin (*dfnA*) and the dipeptide bacilysin (*bacA/B*).

Production of antimicrobial compound(s) during growth in BHI broth

Results for the kinetics of antimicrobial substance production by isolate I8 are shown in Fig. 3. Growth reached the stationary phase after 12 h of incubation. When using *B. cereus* NVH391-98 as indicator strain, antibacterial activity could be detected from the middle of the exponential growth phase and maximum activity was observed in the stationary growth phase. The same kinetics of anti-

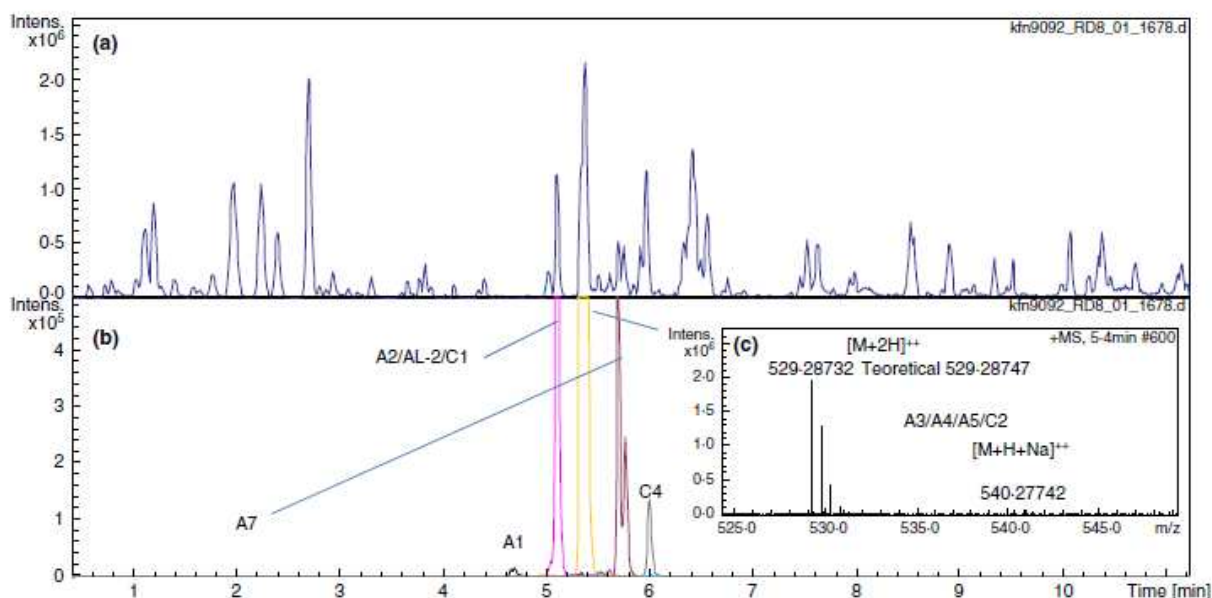


Figure 1 (a) base peak chromatogram of the ethyl-acetate extract of strain I8 and (b) extracted ion chromatograms of [M+2H]⁺⁺ (± 0.005 m/z) of iturins with the major ones marked. (c) shows the mass spectrum of iturin A4, A3, A5 or C2 from the major iturin peak in the chromatogram, a peak at least consisting of two components as judged by the preshoulder seen in (a).

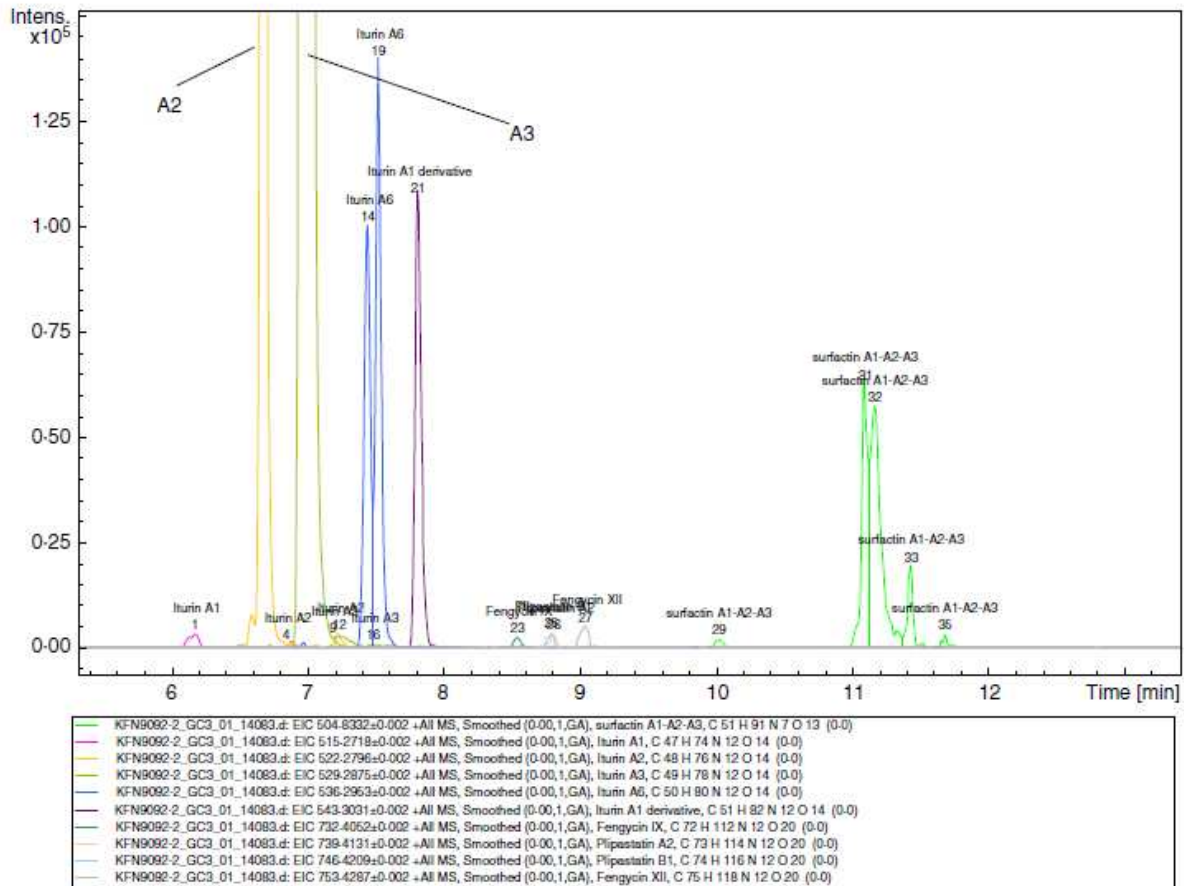


Figure 2 Extracted ion chromatograms of $[M+2H]^{++}$ (± 0.005 m/z) of the detected lipopeptides found in the ethyl-acetate extract of strain I8.

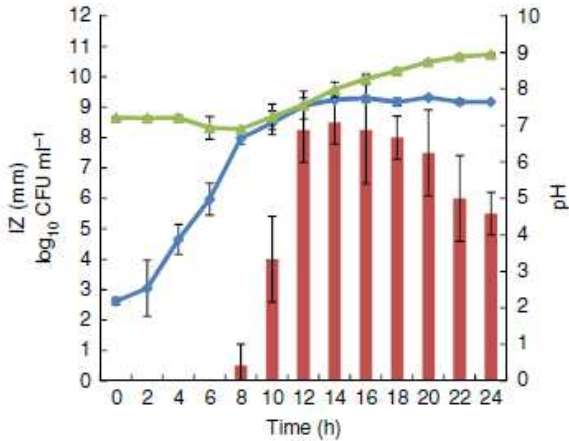


Figure 3 Production of antimicrobial activity during growth of *Bacillus amyloliquefaciens* I8 in BHI broth at 37°C for 24 h. Bacterial growth (\log_{10} CFU ml^{-1}), Inhibition zone (IZ) in mm against *B. cereus* NVH-391-98 and pH were recorded each 2 h. Each point represents the mean of two repeated measurements from two independently replicated experiments. (■) IZ; (●) \log_{10} CFU ml^{-1} and (◻) pH.

microbial substance production was observed for the isolates A4 and G3 (results not shown). It was observed that the pH initially decreased slightly to 7 and had increased to about 9 by the end of the incubation (Fig. 3, results not shown for A4 and G3).

Antimicrobial activity in *H. sabdariffa* seed-based broth

When using a *H. sabdariffa* seed-based broth as only substrate for their growth, the isolates A4, I8 and G3 were able to produce antimicrobial activity against *B. cereus* NVH391-98 (results not shown). The study of the kinetics of antimicrobial compounds production in *H. sabdariffa* seed-based broth by isolate A4 showed that antimicrobial activity could be detected in the late stationary phase (10 h of growth) with maximum antimicrobial activity in the stationary phase from 18 to 24 h of incubation (Fig. 4). The number of cells increased from 2 (\log_{10} CFU ml^{-1}) to more than 8 (\log_{10} CFU ml^{-1}) while the pH increased from 6-7 to more than 8 (Fig. 4).

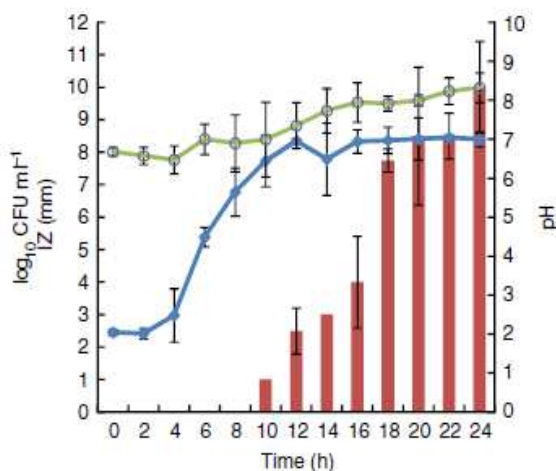


Figure 4 Production of antimicrobial activity during growth of *Bacillus amyloliquefaciens* A4 in *Hibiscus sabdariffa* seed-based broth at 37°C for 24 h. Bacterial growth ($\log_{10} \text{CFU ml}^{-1}$), Inhibition zone (IZ) in mm against *B. cereus* NVH-391-98 and pH were recorded each 2 h. Each point represents the mean of 2 repeated measurements from 2 independently replicated experiments. (■) IZ (mm); (—●—) $\log_{10} \text{CFU ml}^{-1}$ and (—○—) pH.

Discussion

Recently, it was shown that in order to discriminate between the newly described species *B. methylotrophicus* (Madhaiyan et al. 2010) and *B. amyloliquefaciens* ssp. *plantarum*, phenotypic tests are needed in addition to *gyrB* gene sequencing (Agbobatinkpo et al. 2013). Thus, based on the *gyrB* gene sequence analysis and due to the ability to grow at 50°C and in 10% (w/v) NaCl, the isolates A4, G3 and I8 were identified as *B. amyloliquefaciens* ssp. *plantarum*.

In the present study, the strains A4, I8 and G3 showed a broad-spectrum antimicrobial activity towards Gram-positive as well as Gram-negative food-borne pathogenic bacteria in addition to some *Penicillium* spp. However, the activity was in some instances dependent on the assay used. Thus, the studied *Bacillus* spp. isolates exhibited antimicrobial activity against most of the *Salmonella* spp. but not against most of the *B. cereus* strains in the agar spot assay, whereas the opposite was observed with the well diffusion assay. It is possible that the different target micro-organisms were inhibited by different antimicrobial compounds and that the regulation of their productions by the *B. amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* strains could be influenced by both the target organism and/or the growth conditions (solid vs liquid medium). The ability to inhibit the *Salmonella* spp. in the agar spot assay but not in the agar well assay could perhaps also be explained by instability of the particular antimicrobial compound targeting this

genus, or that the compound with the activity had not yet been produced at the time of harvesting the CFS used for the test. For example, the polyketide bacillaene produced by *B. subtilis* has previously been reported to be quickly decomposed upon exposure to light and room temperature (Butcher et al. 2007). The gene involved in bacillaene production was detected in the isolates A4, G3 and I8.

The broad-spectrum antimicrobial activity exhibited by the studied isolates is in agreement with results reported for another *B. amyloliquefaciens* strain, LBM 5006 which produced inhibitory activity against both Gram-positive and Gram-negative bacteria (Lisboa et al. 2006), phytopathogenic fungi (Benitez et al. 2010) and the amoebae *Acanthamoeba polyphaga* (Benitez et al. 2011). However, contrary to the present study, the antibacterial compound produced by strain LBM 5006 was attributed to a bacteriocin-like substance (BLS) of 5 kDa (Lisboa et al. 2006), and the activity against the amoebae *Acanthamoeba polyphaga* was due to the production of another BLIS (Benitez et al. 2011).

Bacillus cereus was used as indicator organism when examining the physical and chemical properties of the produced antimicrobial compounds. The production of antimicrobial activity by isolates A4, I8 and G3 started at the middle of the exponential growth phase and reached maximum values during stationary phase in BHI broth. The antimicrobial substance(s) produced by A4, I8 and G3 was resistant to all proteolytic enzymes tested at 1 and 2 mg ml⁻¹ suggesting that these compounds may be cyclic peptides (Bizani and Brandelli 2002). Furthermore, the inhibitory substance(s) was active in the pH range of 3 to 11 and showed thermal resistance because a total loss of activity was observed only after incubation at 121°C. It was also observed that the compound(s) under study retained full activity when stored at 4°C and -20°C for one month. These properties are similar to those reported for the antifungal lipopeptides produced by *B. amyloliquefaciens* LBM 5006 (Benitez et al. 2010). *Bacillus amyloliquefaciens* strains have been reported to produce BLIS (Lisboa et al. 2006) and bacteriocins including subtilisin A (Sutyak et al. 2008) and amylolysin (Halimi et al. 2010). However, regarding the results obtained by SDS-page overlaid with *B. cereus* NVH391-98, the non-detection of proteinaceous antimicrobial substances, as well as the non-detection of the bacteriocins subtilisin A or subtilin encoding genes by PCR, the strains A4, G3 and I8 did not seem to produce any of these compounds. The results are however in agreement with previous observations for *B. amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* strains by Rückert et al. (2011).

In the present study, UHPLC-TOFMS analysis of acetone and ethyl-acetate extracts showed that strain I8 could produce a mixture of lipopeptides including

iturins, surfactins and fengycins in BHI broth medium. These lipopeptides constitute a well-known class of amphiphilic membrane-active biosurfactant peptides with potent antimicrobial activities (Tapi *et al.* 2010). Indeed, surfactin and iturin compounds are cyclic lipopeptidic peptides, which contain a β -hydroxy fatty acid and a β -amino fatty acid, respectively, as their lipophilic component (Ongena and Jacques 2008) while fengycin is a lipodecapeptide with a β -hydroxy fatty acid in its side chain. The amphiphilic nature of these compounds may explain the resistance of the antimicrobial substance (s) produced to proteolytic enzymes treatment. The fact that lipase and α -amylase did not cause any loss of activity suggests that a lipid moiety as well as sugar residues are not involved in the inhibitory activity (Motta *et al.* 2007b). Similar to the isolate I8, surfactin-producing *B. subtilis* group strains have recently been identified in *Soumbala* (fermented seeds of African locust bean) and *Bikalga*, fermented condiments from Burkina Faso using PCR and MALDI-TOF-MS analysis (Savadogo *et al.* 2011).

Isolates A4, I8 and G3 were shown to harbour numerous genes involved in antimicrobial substance productions. Indeed, the genes involved in the biosynthesis of lipopeptides iturin, surfactin, fengycin, bacillomycin and mycosubtilin/iturin, as well as genes involved in the synthesis of the polyketides macrolactin, bacillaene and difficidin, and the dipeptide bacilysin were detected in the three isolates A4, I8 and G3. Isolate I8 possessed in addition genes involved in plipastatins biosynthesis. Interestingly, in this study the isolates I8, G3 and A4 were found to be more closely related to the plant-associated *B. amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* strains FZB42, CAU B946 and YAU B9601-Y2 than to the type strain *B. amyloliquefaciens* ssp. *amyloliquefaciens* DSM7 by *gyrB* gene sequence analysis. Contrary to DSM7 which shows a reduced ability to produce lipopeptide antibiotics other than surfactin, the genome of the plant-associated *B. amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* strains YAU B9601-Y2, CAU B946 and FZB42 harbour numerous gene clusters involved in the synthesis of lipopeptides and polyketides with antifungal, antibacterial and nematocidal activity (Borris *et al.* 2011).

In the present study, the acetone extract (but not the ethyl-acetate extract) from I8 CFS was also active against all the yeasts (results not shown), and iturins were detected in this extract by UHPLC-TOFMS (results not shown). Furthermore, additional assays carried out with Iturin A from *B. subtilis* (I1774; Sigma-Aldrich) showed that all studied yeasts were sensitive to iturin A (results not shown). It is possible that higher levels of surfactin and iturin were obtained by acetone extraction as compared to the ethyl-acetate extraction, hence the activity against the yeasts.

The antimicrobial activities of lipopeptides have been described (Ongena and Jacques 2008). Iturins display a strong antifungal action against a large variety of yeast and fungi, while fengycins show antimicrobial activity against particularly filamentous fungi. The lipopeptide surfactins display antiviral, antimycoplasma, antifungal and antibacterial activity. Recently, a lipopeptide surfactant produced by *B. subtilis* natto was shown to exert antimicrobial activity towards *Salmonella* Thyphimurium, *M. luteus* and *S. aureus* (Cao *et al.* 2009). Surfactin has also been reported to sterilize *E. coli* and to inactivate spores of *B. cereus* (Huang *et al.* 2007). In addition, inhibitory activity of surfactin and iturin against *Salmonella enteridis* has been described (Huang *et al.* 2009). These lipopeptides are known to act in a synergistic manner as suggested by several studies on surfactin with iturin (Maget-Dana *et al.* 1992), surfactin with fengycin (Ongena *et al.* 2007) and iturin with fengycin (Romero *et al.* 2007). Although it is possible that it is the synergistic effect of the iturins, surfactins and fengycins that caused the broad-spectrum antibacterial activities observed in the present study, the activity may also be due to the unknown compounds also observed in the ethyl-acetate and acetone extracts. Many compounds from these extracts seemed to be lipopeptides based on their retention time, TOFMS spectra and elemental composition of the ions (Nielsen *et al.* 2011), though more studies are needed to elucidate this. It is also possible that the broad-spectrum antibacterial activity observed was due to a production of the polyketides difficidin, bacillaene, macrolactin and/or the dipeptide bacilysin as the strains I8, A4 and G3 are potentially able to produce these compounds as detected by PCR. Indeed, the polyketide difficidin which is a macrocyclic polyene lactone phosphate ester was shown to have antibacterial effect against *S. aureus*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*, *S. Thyphimurium*, *E. coli* and others (Zimmerman *et al.* 1986), while bacillaene has been reported to be bacteriostatic against, for example *B. thuringiensis*, *E. coli* and *S. aureus* (Patel *et al.* 1995).

The large spectrum of inhibition demonstrated by the isolates A4, I8 and G3 in the present work is of major interest since these micro-organisms could serve in safeguarding bikalga and other African fermented condiments against pathogens and spoilage organisms. Indeed, human pathogens including *B. cereus*, *Salmonella* spp., *E. coli* and *S. aureus* have been often isolated from fermented food condiments including *Bikalga* in Africa and might constitute a safety problem for the consumers (Ouoba *et al.* 2008b; Thorsen *et al.* 2010). In addition to the biopreservation, the lipopeptides produced could also play an important role in the functional properties of the products. Indeed, they surfactant properties could modify the consistence of the product as well as its organoleptic

properties by the modification of the solubility of certain hydrophobic compounds (Savadogo *et al.* 2011).

The observed heat and pH stability of the antimicrobial compound(s) also indicates a great potential for food preservation. Furthermore, it was found in the present study that the investigated 3 *B. amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* isolates produced antimicrobial activity against *B. cereus* NVH391-98 when grown in a *H. sabdariffa* seed-based broth, indicating a potential for antimicrobial compound(s) productions in real-life *Bikalga* fermentations.

To conclude, this study identified *B. amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* strains isolated from traditional *Bikalga* showing significant activity against fungi, Gram-positive and Gram-negative food-borne pathogenic bacteria. The antimicrobial activity was also produced in *H. sabdariffa* seed-based broth. The strains produced the lipopeptides iturins, surfactins and fengycins in addition to nonidentified lipopeptidic compounds. The isolates further showed the potential for bacilycin, macrolactin, diffidin and bacillaene production as detected by PCR. These compounds could play an important role in the biopreservation and the functional properties of *Bikalga*, though more studies are needed to fully elucidate the potential.

Acknowledgement

This work was supported by DANIDA (Danish International Development Agency) through the project: 'Capability Building for Research and Quality Assurance in Traditional Food Processing in West Africa'.

References

- Abriouel, H., Franz, C.M.A.P., Omar, N.B. and Gálvez, A. (2010) Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. *FEMS Microbiol Rev* **35**, 201–232.
- Agata, N., Mori, M., Ohta, M., Suwan, S., Ohtani, I. and Isobe, M. (1994) A novel dodecadepsipeptide, cereulide, isolated from *Bacillus cereus* causes vacuole formation in HEP-2 cells. *FEMS Microbiol Lett* **121**, 31–34.
- Agbobatinkpo, P.B., Thorsen, L., Nielsen, D.S., Azokpota, P., Akisoe, N., Hounhouigan, J.D. and Jakobsen, M. (2013) Biodiversity of aerobic Endospore-Forming Bacterial species occurring in Yanyanku and Ikpiru, fermented seeds of *Hibiscus sabdariffa* used to produce food condiments in Benin. *Int J Food Microbiol* **163**, 231–238.
- Bengaly, M.D., Béré, A. and Traoré, A. (2006) The chemical composition of bikalga, a traditional fermented roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) seeds condiment. Part II: evaluation of mineral, total polyphenols and phytic acid content, predicting the iron bioavailability. *Elec J Food Plant Chem* **1**, 7–11.
- Benitez, L.B., Velho, V.R., Lisboa, P.M., da Costa Medina, F.L. and Brandelli, A. (2010) Isolation and characterization of antifungal peptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* LBM5006. *J Microbiol* **48**, 7791–7797.
- Benitez, L.B., Caumo, K., Brandelli, A. and Rott, B.M. (2011) Bacteriocin-like substance from *Bacillus amyloliquefaciens* shows remarkable inhibition of *Acanthamoeba polyphaga*. *Parasitol Res* **108**, 687–691.
- Bizani, D. and Brandelli, A. (2002) Characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus* sp. strain 8A. *J Appl Microbiol* **93**, 512–519.
- Borriss, R., Chen, X.-H., Rückert, C., Blom, J., Becker, A., Baumgarth, B., Fan, B., Pukall, R. *et al.* (2011) Relationship of *Bacillus amyloliquefaciens* clades associated with strains DSM 7T and FZB42T: a proposal for *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* subsp. nov. and *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* subsp. nov. based on complete genome sequence comparisons. *Int J Syst Evol Microbiol* **61**, 1786–1801.
- Butcher, R.A., Schroeder, F.C., Fischbach, M.A., Straight, P.D., Kolter, R., Walsh, C.T. and Clardy, J. (2007) The identification of bacillaene, the product of the PksX megacomplex in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**, 1506–1509.
- Cao, X.-H., Liao, Z.-Y., Wang, C.-L., Yang, W.-Y. and Lu, M.-F. (2009) Evaluation of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus natto* tk-1 as a potential source of anti-adhesive, antimicrobial and antitumor activities. *Braz J Microbiol* **40**, 373–379.
- Chen, X.H., Koumoutsis, A., Scholz, R., Schneider, K., Vater, J., Süßmuth, R., Piel, J. and Borriss, R. (2009) Genome analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 reveals its potential for biocontrol of plant pathogens. *J Biotechnol* **140**, 27–37.
- Chung, S., Kong, H., Buyer, J.S., Lakshman, D.K., Lydon, J., Kim, S.-D. and Roberts, D.P. (2008) Isolation and partial characterization of *Bacillus subtilis* ME488 for suppression of soilborne pathogens of cucumber and pepper. *Appl Microbiol Biotechnol* **80**, 115–123.
- Guo, Y., Huang, E., Yuan, C., Zhang, L. and Yousef, A.E. (2012) Isolation of a *Paenibacillus* sp. strain and structural elucidation of its broad-spectrum lipopeptide antibiotic. *Appl Environ Microbiol* **78**, 3156.
- Halimi, B., Dortu, C., Arguelles-Arias, A., Thonart, P., Joris, B. and Fickers, P. (2010) Antilisterial activity on poultry meat of amylolysin, a bacteriocin from *Bacillus amyloliquefaciens* GA1. *Probiotics Antimicro Prot* **2**, 120–125.
- Holzappel, W.H. (2002) Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries. *Int J Food Microbiol* **75**, 197–212.
- Huang, X., Lu, Z., Bie, X., Lu, F., Zhao, H. and Yang, S. (2007) Optimization of inactivation of endospores of *Bacillus cereus* by antimicrobial lipopeptides from *Bacillus subtilis* fmbj strains using a response surface method. *Appl Microbiol Biotechnol* **74**, 454–461.

- Huang, X., Gao, X., Zheng, L. and Hao, G. (2009) Optimization of sterilization of *Salmonella enteritidis* in meat by surfactin and iturin using a response surface method. *Int J Pept Res Ther* **15**, 61–67.
- Kaboré, D., Thorsen, L., Nielsen, S.D., Berner, S.T., Sawadogo-Lingani, H., Diawara, B., Dicko, H.M. and Jakobsen, M. (2012) Bacteriocin formation by dominant aerobic sporeformers isolated from traditional *maari*. *Int J Food Microbiol* **154**, 10–18.
- Koumoutsi, A., Chen, X.H., Henne, A., Liesegang, H., Hitzeroth, G., Franke, P., Vater, J. and Borriss, R. (2004) Structural and functional characterization of gene clusters directing non-ribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42. *J Bacteriol* **186**, 1084–1096.
- Lindgaard Pedersen, L., Owusu-Kwarteng, J., Thorsen, L. and Jespersen, L. (2012) Biodiversity and probiotic potential of yeasts isolated from Fura, a West African spontaneously fermented cereal. *Int J Food Microbiol* **159**, 144–151.
- Lisboa, M.P., Bonatto, D., Bizani, D., Henriques, J.A.P. and Brandelli, A. (2006) Characterization of a bacteriocin-like substance produced by *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from the Brazilian Atlantic forest. *Int Microbiol* **9**, 111–118.
- Lund, T., De Buyser, M.L. and Granum, P.E. (2000) A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. *Mol Microbiol* **38**, 254–261.
- Madhaiyan, M., Poonguzhali, S., Kwon, S.W. and Sa, T.M. (2010) *Bacillus methylophilus* sp. nov., a methanol-utilizing, plant-growth-promoting bacterium isolated from rice rhizosphere soil. *Int J Syst Evol Microbiol* **60**, 2490–2495.
- Maget-Dana, R., Thimon, L., Peypoux, F. and Ptak, M. (1992) Surfactin/iturin A interactions may explain the synergistic effect of surfactin on the biological properties of iturin A. *Biochimie* **74**, 1047–1051.
- Motta, A.S., Lorenzini, D.M. and Brandelli, A. (2007a) Purification and partial characterization of an antimicrobial peptide produced by a novel *Bacillus* sp. isolated from the Amazon Basin. *Curr Microbiol* **54**, 282–286.
- Motta, A.S., Cannavan, F.S., Tsai, S. and Brandelli, A. (2007b) Characterization of a broad range antibacterial substance from a new *Bacillus* species isolated from Amazon basin. *Arch Microbiol* **188**, 367–375.
- Nielsen, K.F., Månsson, M., Rank, C., Frisvad, J.C. and Larsen, T.O. (2011) Dereplication of microbial natural products by LC-DAD-TOFMS. *J Nat Prod* **74**, 2338–2348.
- Ongena, M. and Jacques, P. (2008) *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease control. *Trends Microbiol* **16**, 115–125.
- Ongena, M., Jourdan, E., Adam, A., Paquot, M., Brans, A., Joris, B., Arpigny, J.L. and Thonart, P. (2007) Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environ Microbiol* **9**, 1084–1090.
- Ouoba, L.L.I., Diawara, B., Jespersen, L. and Jakobsen, M. (2007) Antimicrobial activity of *Bacillus subtilis* and *Bacillus pumilus* during the fermentation of African locust bean (*Parkia biglobosa*) for Soumbala production. *J Appl Microbiol* **102**, 963–970.
- Ouoba, L.L.I., Parkouda, C., Diawara, B., Scotti, C. and Varnam, A.H. (2008a) Identification of *Bacillus* spp from bikalga, fermented seeds of *Hibiscus sabdariffa*: phenotypic and genotypic characterization. *J Appl Microbiol* **104**, 122–131.
- Ouoba, L.L.I., Thorsen, L. and Varnam, A.H. (2008b) Enterotoxins and emetic toxins production by *Bacillus cereus* and other species of *Bacillus* isolated from Soumbala and Bikalga, African alkaline fermented food condiments. *Int J Food Microbiol* **124**, 224–230.
- Paik, S.H., Chakicherla, A. and Hansen, J.N. (1998) Identification and characterization of structural and transporter genes for, and the chemical and biological properties of, Sublancin 168, a novel lantibiotic produced by *Bacillus subtilis* 168. *J Biol Chem* **273**, 134–142.
- Patel, P.S., Hang, S., Fisher, S., Pimik, D., Aklonis, C., Dean, L., Meyers, E., Fernandes, P. et al. (1995) Bacillaene, a novel inhibitor of prokaryotic protein synthesis produced by *Bacillus subtilis*: production, taxonomy, isolation, physico-chemical characterization and biological activity. *J Antibiot* **48**, 997–1003.
- Romero, D., De Vicente, A., Rakotoaly, R.H., Dufour, S.E., Veening, J.W., Arrebola, E., Cazorla, F.M., Kuipers, O.P. et al. (2007) The iturin and fungycin families of lipopeptides are keys factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podosphaera fusca*. *Mol Plant Pathogen Interact* **20**, 430–440.
- Rückert, C., Blom, J., Chen, X.-H., Reva, O. and Borriss, R. (2011) Genome sequence of *B. amyloliquefaciens* type strain DSM7T reveals differences to plant-associated *B. amyloliquefaciens* FZB42. *J Biotechnol* **155**, 78–85.
- Sarangi, N.P., Athukorala, W.G., Dilantha, F. and Khalid, Y.R. (2009) Identification of antifungal antibiotics of *Bacillus* species isolated from different microhabitats using polymerase chain reaction and MALDI-TOF mass spectrometry. *Can J Microbiol* **55**, 1021–1032.
- Savadogo, A., Tapi, A., Chollet, M., Wathelet, B., Traoré, A.S. and 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.
- Stein, T. (2005) *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Mol Microbiol* **56**, 845–857.
- Stein, T., Borchert, S., Conrad, B., Feesche, J., Hofemeister, B., Hofemeister, J. and Entian, K.D. (2002) Two different lantibiotic-like peptides originate from the ericin gene cluster of *Bacillus subtilis* A 1/3. *J Bacteriol* **184**, 1703–1711.

- Stenfors, L.P. and Granum, P.E. (2001) Psychrotolerant species from the *Bacillus cereus* group are not necessarily *Bacillus weihenstephanensis*. (*FEMS Microbiol Lett* **197**, 223–228.
- Sutyak, K.E., Wirawan, R.E., Aroutcheva, A.A. and Chikindas, M.L. (2008) Isolation of the *Bacillus subtilis* antimicrobial peptide subtilisin from the dairy product-derived *Bacillus amyloliquefaciens*. (*J Appl Microbiol* **104**, 1067–1074.
- Tabbene, O., Slimene, B.L., Djebali, K., Mangoni, A.-L., Urdaci, M.-C. and Limam, F. (2009) Optimization of medium composition for the production of antimicrobial activity by *Bacillus subtilis* B38. (*Biotechnol Prog* **25**, 1267–1274.
- Tapi, A., Chollet-Imbert, M., Scherens, B. and Jacques, P. (2010) New approach for the detection of non-ribosomal peptide synthetase genes in *Bacillus* strains by polymerase chain reaction. (*Appl Microbiol Biotechnol* **85**, 1521–1531.
- Thorsen, L., Azokpota, P., Hansen, B.M., Hounhouigan, D.J. and Jakobsen, M. (2010) Identification, genetic diversity and cereulide producing ability of *Bacillus cereus* group strains isolated from Beninese traditional fermented food condiments. (*Int J Food Microbiol* **142**, 247–250.
- Tosato, V., Albertini, A.M., Zotti, M., Sonda, S. and Bruschi, C.V. (1997) Sequence completion, identification and definition of the fengycin operon in *Bacillus subtilis* 168. (*Microbiology* **143**, 3443–3450.
- Tsuge, K., Akiyama, T. and Shoda, M. (2001) Cloning, sequencing, and characterization of the iturin A operon. (*J Bacteriol* **183**, 6265–6273.
- Wang, L.T., Lee, F.L., Tai, C.J. and Kasai, H. (2007) Comparison of *gyrB* gene sequences, 16S rRNA gene sequences and DNA-DNA hybridization in the *Bacillus subtilis* group. (*Inter J Syst Evol Microbiol* **57**, 1846–1850.
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, L., Rozen, S. and Madden, T. (2012) Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. (*BMC Bioinformatics* **13**, 134.
- Zimmerman, S.B., Schwartz, C.D., Monaghan, R.L., Pelak, B.A., Weissberger, B., Gilfillan, E.C., Mochales, S., Hernandez, S. *et al.* (1986) Difficidin and oxydifficidin: novel broad spectrum antibacterial antibiotics produced by *Bacillus Subtilis*. I. Production, Taxonomy and antibacterial activity. (*J Antibiot* **12**, 1677–1681.

3.1.5 Résumé de l'article 3

Dans nos travaux précédents, 13 souches de *Bacillus* spp. (six *B. subtilis* ssp. *subtilis*, quatre *B. licheniformis* et trois *B. amyloliquefaciens* ssp. *plantarum*) isolées du *Bikalga* ont été évaluées pour leurs propriétés antimicrobiennes. A l'issu de ces travaux, il est ressortit que *B. amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* A4, I8 et G3 et *B. subtilis* ssp. *subtilis* H4 pouvaient être présélectionnés comme de potentiels cultures starters pour une fermentation contrôlée du *Bikalga*. Cette présélection s'est basée sur la propriété de ces souches à inhiber la croissance de germes indésirables et leur capacité à produire des bactériocines et des lipopeptides.

Nous nous sommes attachés dans la présente partie à examiner la résistance des 13 souches de *Bacillus* aux antibiotiques, au pH acide, de même que leur tolérance à la bile comme critères complémentaires de sélection de nos cultures starters. Pour ce faire, la sensibilité de chaque souche a été testée contre 24 antibiotiques comprenant : avilamycine, bacitracine, chloramphénicole, ceftiofur, ciprofloxacine, daptomycine, érythromycine, flavomycine, florfenicol, gentamicine, kanamicine, linezolid, pénicilline, salinomycine, spectinomycine, streptomycine, sulphaméthoxazole, synergide, tetracycline, tiamuline, tigecycline, triméthoprim, triméthoprim/sulphaméthoxazole (TMP+SMX), vancomycine. La méthode de dilution en milieu liquide et en milieu gélosé a été utilisée. Ensuite des PCR ont été réalisées afin de vérifier si les souches étudiées possédaient les gènes de résistance à certains antibiotiques tels que le chloramphénicole, l'érythromycine, la kanamicine, la pénicilline, la streptomycine et la triméthoprim en utilisant des amorces oligonucléotidiques spécifiques.

Les résultats obtenus ont montré que 100% des souches étudiées étaient sensibles à l'avilamycine, la ceftiofur, la ciprofloxacine, la vancomycine, la florfenicol, la gentamicine, la linezolid, la salinomycine, la spectinomycine, la tetracycline et à la tigecycline. Par contre, toutes les souches de *B. licheniformis* étaient résistantes au chloramphénicole, à la daptomycine, à la pénicilline et à la streptomycine tandis que toutes les souches de *B. amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* étaient sensibles à ces antibiotiques. Concernant les souches présélectionnées comme potentielles cultures starters, *B. subtilis* ssp. *subtilis* H4 était résistante à seulement deux antibiotiques à savoir la flavomycine et la sulphaméthoxazole et les *B. amyloliquefaciens* ssp.

plantarum A4, I8 et G3 étaient résistantes à quatre (bacitracine, flavomycine, synergicide et tiamuline) des 24 antibiotiques testés.

Aucun amplicon de fragment des gènes codant pour la résistance au chloramphénicol (*catIP501*), à l'érythromycine (*erm(A)*, *erm(B)*, *erm(C)*), à la kanamycine (*aph(3'')*-I, *aph(3'')*-III, *ant(2'')*-I), à la pénicilline (*blaZ*), à la streptomycine (*aadA*, *aadE*, *StrA*, *StrB*), et à la triméthoprimine (*dfr(A)*) n'a été obtenu par les analyses PCR. Ce qui pourrait signifier que la résistance à ces antibiotiques n'est pas la conséquence de la présence de ces gènes. Il est donc possible que la résistance observée contre ces antibiotiques soit une résistance naturelle.

Dans la présente étude, les *Bacillus* spp. du *Bikalga* ont également montré une bonne résistance au pH acide avec 100% des souches survivant au pH 2,5 pendant 4 h. Elles ont également montré une bonne capacité à tolérer et même à croître en présence de 0,3% de bile avec ou sans exposition préalable au pH acide.

En conclusion, cette partie de notre étude met en exergue l'innocuité des souches de *Bacillus* spp. du *Bikalga*, en particulier les souches présélectionnées (H4, I8, G3, A4) par rapport au risque de transfert de résistance aux antibiotiques à d'autres bactéries incluant les pathogènes. Elle montre également que nos souches pourraient survivre le passage du tractus gastro-intestinal. Cela appuie le fait que ces souches pourraient constituer de potentiels candidats pouvant être utilisés comme cultures starters pour améliorer la qualité sanitaire et nutritionnelle du *Bikalga*.

3.1.6 Article 3 publié: Resistance to antimicrobials and acid and bile tolerance of *Bacillus* spp. isolated from *Bikalga*, fermented seeds of *Hibiscus sabdariffa*.

Compaoré, C.S., Jensen, L.B., Diawara, B., Ouédraogo, G.A., Jakobsen, M., Ouoba, L.I.I., 2013.

Publié dans African Journal of Food Science, DOI: 10.5897/AJFS 2013.1018.

Full Length Research Paper

Resistance to antimicrobials and acid and bile tolerance of *Bacillus* spp isolated from *Bikalga*, fermented seeds of *Hibiscus sabdariffa*

Clarisse S. Compaoré^{1,2*}, Lars B. Jensen³, Bréhima Diawara¹, Georges A. Ouédraogo², Mogens Jakobsen⁴ and Labia I. I. Ouoba^{5,6}

¹Département Technologie Alimentaire (DTA/IRSAT/CNRST), Ouagadougou 03 BP 7047, Burkina Faso.

²Institut du Développement Rural/Université Polytechnique de Bobo, BAMSB, 01 BP 10 91 Bobo-Dioulasso, Burkina Faso.

³Technical University of Denmark (DTU), National Food Institute, Division of Food Microbiology, Mørkhøj Bygade 19, 2860 Søborg, Denmark.

⁴Department of Food Science, Faculty of Science, University of Copenhagen, Rolighedsvej 30, 1958 Frederiksberg C, Denmark.

⁵London Metropolitan University, FLSC/SHS, Microbiology Research Unit, 166-220 Holloway Road, London N7 8DB, United Kingdom.

⁶Independent Senior Research Scientist-Consultant, London, UK.

Accepted 24 September, 2013

In the aim of selecting starter cultures, thirteen species of *Bacillus* spp. including six *Bacillus subtilis* ssp. *subtilis*, four *Bacillus licheniformis* and three *Bacillus amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* isolated from traditional *Bikalga* were investigated. The study included, for all isolates, genes, determination of minimal inhibitory concentration (MIC) for 24 antimicrobials and detection of resistance by PCR using specific primers. The isolates were also examined for their resistance to pH 2.5 and their tolerance to 0.3% bile over 4 h. Results showed that most studied isolates, in particular *B. subtilis* ssp. *subtilis* G2, H4, C6, I7 and *B. amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* A4, I8, G3 were susceptible to most antimicrobials tested while all *B. licheniformis* isolates showed high resistance level. The resistance observed towards the antimicrobials (chloramphenicol, erythromycin, kanamycin, penicillin, streptomycin and trimethoprim) in this study may be intrinsic as no positive amplicon was observed for the most prevalent resistance genes investigated (*cat*P501, *erm*(A), *erm*(B), *erm*(C), *aph*(3'')-I, *aph*(3'')-III, *ant*(2'')-I, *bla*Z, *aad*A, *aad*E, *Str*A, *Str*B, *dfr*(A)). Furthermore, based on their good survival in pH 2.5 and in 0.3% bile all the tested isolates may be able to resist passage through the gastro-intestinal tract conditions. Regarding these results, isolates G2, C6, I7, H4, A4, I8 and G3 may be useful as starter cultures to optimize *Hibiscus sabdariffa* seeds fermentation into *Bikalga*.

Key words: *Bikalga*, *Bacillus*, antimicrobial resistance, acid resistance, bile tolerance, starter cultures.

INTRODUCTION

Bikalga is a traditional food condiment obtained by an alkaline fermentation of *Hibiscus sabdariffa* seeds. It is generally used as a seasoning condiment in most staples in Burkina Faso and is also known in other African coun-

tries under different names such as *Dawadawa bosto* in Niger, *Datou* in Mali, *Furundu* in Sudan and *Mbuja* in Cameroun (Yagoub et al., 2004). The main steps of *Bikalga* production process include cleaning of the seeds,

*Corresponding author. E-mail: compaclara@yahoo.fr.

cooking and a two-stage spontaneous fermentation (Parkouda et al., 2008). The nutritional value of *Bikalga* has been studied showing that it is a rich source of proteins, lipids, carbohydrates, essential amino acids, fatty acids and vitamins (Bengaly et al., 2006; Parkouda et al., 2008; Yagoub et al., 2004). Members of the *B. subtilis* group were shown to be the main microorganisms involved in the fermentation of *H. sabdarifa* seeds into *Bikalga* (Ouoba et al., 2008). The nutritional value of *Bikalga* as well as other similar African traditional fermented foods is believed to be due to the fermentation process and metabolic activities of the associated microorganisms (Bengaly 2001; Mohamadou et al., 2010). However, the production of such products relies on spontaneous fermentation with uncontrolled processes and hazardous starters, leading to a product of varying hygienic, nutritional and organoleptic quality. Therefore, more emphasis has since been put on the mastering of starter cultures for use in a more standardized process to produce African fermented products. In this aim, in previous studies, we have pre-selected potential starter cultures from *Bikalga* predominant *Bacillus* spp. based on their capacity to inhibit pathogens and spoilage microorganisms via bacteriocin and lipopeptide antibiotics production (Compaoré et al., 2013 a, b).

However, in addition to antimicrobial properties, another required property of starter cultures is that they are safe for human consumption (Ammor et al., 2007). Such safety includes that they do not harbor acquired and transferable antimicrobial resistance elements. Indeed, antimicrobial resistance is a worldwide public health problem that continue to grow and bacteria used as starter cultures for the production of foods could be a source of spread of antimicrobial resistances, which might be transferred to commensal or pathogenic bacteria (Danielsen and Wind, 2003; Ammor et al., 2007). Furthermore, in order to survive and establish within the human Gastro Intestinal Tract (GIT), some of the desirable properties of starter cultures/probiotics include their ability to resist the acidity (pH 2.5-pH 3.5) of the stomach and the exposure to bile in the upper part of the intestine (Holzapfel et al., 1998; Huang and Adams, 2004).

The aim of the present study was to determine the antimicrobial resistance profile of the predominant *Bacillus* spp. isolated from *Bikalga* and to explore their capacity to survive in acidic pH and to tolerate bile salts, in order to select suitable starter cultures for a controlled fermentation of *H. sabdariffa* seeds.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains

Thirteen (13) strains of *Bacillus* including six strains of *B. subtilis* ssp. *subtilis* (F1, C3, C6, H4, G2, I7), four strains of *B. licheniformis* (E3, F9, J3, E5) and three strains of *B. amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* (A4, I8, G3) isolated from different productions of *Bikalga*

were investigated. The *Bacillus* isolates were maintained as stock cultures at -80°C in Brain Heart Infusion (BHI, broth, Oxoid CM1135 Basingstoke, Hampshire, England) supplemented with 20% (v/v) glycerol. The strains were sub-cultured in 10 ml BHI broth at 37°C for 24 h before the cells were used.

Resistance of bacteria to antimicrobials

Determination of the susceptibility of the studied bacteria to antimicrobials: determination of Minimal Inhibitory Concentrations (MIC)

For 24 antimicrobials (Table 1), MICs were determined by the microwell and agar dilution methods using BHI broth (Oxoid CM1135) and BHI agar (Oxoid CM1136). This was done according to standards set by Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI), Wayne, USA. Breakpoint values towards antimicrobials for *Bacillus* spp. were used as described by European Food Safety Agency (EFSA, 2008). For antimicrobials not included in the EFSA (2008) list, breakpoints for closely related Gram-positive species were used tentatively (Table 1).

Detection of resistance genes by PCR

For some antimicrobials to which the tested bacteria showed reduced susceptibility, PCR were conducted to screen the isolates for the presence of resistance genes. Amplification of genes associated with resistance to chloramphenicol (*catIP501*), erythromycin (*erm(A)*, *erm(B)*, *erm(C)*), kanamycin (*aph(3'')-I*, *aph(3'')-III*, *ant(2'')-I*), penicillin (*blaZ*), streptomycin (*aadA*, *aadE*, *StrA*, *StrB*), and trimethoprim (*dfr(A)*) was done accordingly to Jensen et al. (1999). All PCR were performed using the following temperature program: 94°C for 3 min, 25 or 35 cycles of 94°C for 1 min, 45–65°C, according to annealing temperature for the individual primers (Table 2) and extension at 72°C for 1 min. A final extension step at 72°C for 10 min ended the PCR protocol. The PCR products (10 µl) were subjected to electrophoresis on 1.5% agarose gels (120 V, 2 h) and the products were visualized by staining with ethidium bromide.

Screening of the *Bacillus* isolates for acid resistance and bile tolerance

Preparation of inocula

From BHI agar plates incubated for 24 h at 37°C, the *Bacillus* strains were sub-cultured under agitation for 18 h at 37°C in 10 ml BHI broth, pH 7. The cultures were centrifuged at 5000 g, 4°C for 10 min and the pellet re-suspended in 5 ml of sterile saline solution (Becton 211677; Sparks, MD, USA), pH 7.0. The number of cells was estimated by microscopy using a counting chamber (Neubauer, Wertheim, Germany) and dilutions were made in sterile saline to obtain an inoculum concentration of approximately 10⁸ CFU/ml.

Acid resistance

The method described by Klingberg et al. (2005) was used. The survival of the bacteria in acidic pH was examined in BHI broth adjusted with hydrochloric acid (HCl) 1 N to obtain a final pH of 2.5. For each *Bacillus* isolate, 100 µl of inoculum were added into 10 ml of BHI broth, pH 2.5 and incubated at 37°C in a rotary shaker at 120 cycles per min. Samples were taken at various times (0, 1, 2, 3

Table 1. Antimicrobial breakpoints and resistance genes investigated.

Antimicrobial	Proposed breakpoints ($\mu\text{g/ml}$)	Source	Resistance genes investigated
Avilamycin	≥ 16	CLSI (<i>Enterococcus</i>)	
Bacitracin	≥ 16	Jensen et al. (2001)	
Chloramphenicol	> 8	EFSA (2008)	<i>catpIP501</i>
Ceftiofur	≥ 8	CLSI (<i>Staphylococcus</i>)	
Ciprofloxacin	≥ 4	Jensen et al. (2001)	
Daptomycin	≥ 8	CLSI (<i>Enterococcus</i>)	
Erythromycin	> 4	EFSA (2008)	<i>erm(A), erm(B), erm(C)</i>
Flavomycin	≥ 16	CLSI (<i>Enterococcus</i>)	
Florfenicol	≥ 32	CLSI (<i>Staphylococcus</i>)	
Gentamicin	> 4	EFSA (2008)	
Kanamycin	> 8	EFSA (2008)	<i>aph(3'')-I, aph(3'')-III, ant(2'')-I</i>
linezolid	≥ 4	CLSI (<i>Staphylococcus</i>)	
Penicillin	≥ 0.25	Luna et al. (2007)	<i>blaZ</i>
Salinomycin	≥ 16	CLSI (<i>Enterococcus</i>)	
Spectinomycin	≥ 128	CLSI (<i>Staphylococcus</i>)	
Streptomycin	> 8	EFSA (2008)	<i>aadA, aadE, StrA, StrB,</i>
Sulphamethoxazol	≥ 256	CLSI (<i>Staphylococcus</i>)	
synercid	> 4	EFSA (2008)	
Tetracyclin	> 8	EFSA (2008)	
Tiamulin	≥ 32	CLSI (<i>Staphylococcus</i>)	
Tigecycline	> 0.5	Luna et al. (2007)	
Trimethoprim	≥ 16	CLSI (<i>Staphylococcus</i>)	<i>dfr(A)</i>
TMP+SMX	≥ 4	Luna et al. (2007)	
Vancomycin	> 4	EFSA (2008)	

and 4 h), serially 10-fold diluted and plated in duplicate onto BHI agar. The plates were incubated at 37°C for 24 h and bacterial colonies were counted. The number of bacteria was calculated according to the standard of ISO 7218 (2007).

Tolerance to bile salts

The bile tolerance was examined using the method described by Klingberg et al. (2005). For each *Bacillus* isolate, 100 μl of inoculum were added into 10 ml of BHI broth, pH 7 containing 0.3% (w/v) oxgall bile (Sigma-Aldrich 30209037, Steinheim, Germany) and incubated at 37°C in a rotary shaker at 120 cycles per min. Samples were taken at various times (0, 1, 2, 3 and 4 h), serially 10-fold diluted and plated in duplicate onto BHI agar. The plates were incubated at 37°C for 24 h and bacterial colonies were counted. The number of *Bacillus* was calculated according to the standard of ISO 7218 (2007).

To determine bile tolerance of the *Bacillus* isolates after pre-exposure to low pH, 100 μl of each *Bacillus* inoculum were first added into 10 ml of BHI broth at pH 2.5. After incubation for 3 h at 37°C, cells were harvested by centrifugation (5000 g, 10 min), re-suspended into 10 ml of BHI broth containing 0.3% (w/v) oxgall bile and incubated at 37°C in a rotary shaker. Bacterial growth was checked after 24 h of incubation at 37 °C (from the beginning of the first incubation) by plate counting on BHI agar.

For the experiments described above, cells growth for each isolate in 10 ml BHI broth, pH 7 was monitored simultaneously as a positive control. The experiments were conducted in duplicate on two separate occasions.

RESULTS AND DISCUSSION

Antimicrobial resistance

The antimicrobial susceptibility of the studied *Bacillus* isolates was variable according to the *Bacillus* isolate and the antimicrobial tested (Table 3). For all tested bacteria, no resistance to avilamycin, ceftiofur, fluoroquinolones (ciprofloxacin), glycopeptides, florfenicol, gentamicin, linezolid, salinomycin, spectinomycin, kanamycin (except *B. subtilis* ssp. *subtilis* F1), tetracyclin, trimethoprim (except *B. subtilis* ssp. *subtilis* C6), trimetoprim + sulfamethoxazole (except *B. subtilis* ssp. *subtilis* C3), and tigecycline was observed. However, reduced susceptibility towards flavomycin was found for all isolates with the exception of *B. subtilis* ssp. *subtilis* C3. All *B. licheniformis* showed reduced susceptibility towards chloramphenicol, daptomycin, β -lactams (penicillin) and streptomycin while all *B. amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* were susceptible to the same antimicrobials (Table 3). The reduced susceptibility of all *B. licheniformis* toward chloramphenicol correlate with the findings of Sorokulova et al. (2008) who reported that the East European probiotic strain *B. licheniformis* 31 (BL31) was resistant to chloramphenicol. Similar to *B. subtilis* PY79, a laboratory strain derived from the 168 type strain and *B.*

Table 2. Primers used.

Resistance gene	Primer	Annealing temperature (°C)
<i>catp</i> P501	5'-GGATATGAAATTTATCCCTC-3'	47
	5'-CAATCATCTACCCTATGAAT-3'	
<i>erm</i> (A)	5'-AAGCGGTAAAACCCCTCTGAG-3'	55
	5'-TCAAAGCCTGTCGGAATTGG-3'	
<i>erm</i> (B)	5'-CATTTAACGACGAAACTGGC-3'	52
	5'-GGAACATCTGTGGTATGGCG-3'	
<i>erm</i> (C)	5'-CAAACCCGTATTCCACGAGG-3'	48
	5'-ATCTTTGAAATCGGCTCAGG-3'	
<i>aph</i> (3 ^{''})-I	5'-AACGCTTGCTCGAGGCCGCG-3'	68
	5'-GGCAAGATCCTGGTATCGGTCTGCG-3'	
<i>aph</i> (3 ^{''})-III	5'-GCCGATGTGGATTGCGAAAA-3'	52
	5'-GCTTGATCCCCAGTAAGTCA-3'	
<i>ant</i> (2 ^{''})-I	5'-GGGCGCGTCATGGAGGAGTT-3'	67
	5'-TATCGCGACCTGAAAGCGGC-3'	
<i>bla</i> Z	5'-CAGTTCACATGCCAAAGAG-3'	54
	5'-TACTACTCTTGGCGGTTTC-3'	
<i>aad</i> A	5'-ATCCTTCGGCGCGATTTTG-3'	56
	5'-GCAGCGCAATGACATTCTTG-3'	
<i>aad</i> E	5'-ATGGAATTATTCCCACCTGA-3'	50
	5'-TCAAACCCCTATTAAAGCC-3'	
<i>Str</i> A	5'-CTTGGTGATAACGGCAATTC-3'	55
	5'-CCAATCGCAGATAGAAGGC-3'	
<i>Str</i> B	5'-ATCGTCAAGGGATTGAAACC-3'	56
	5'-GGATCGTAGAACATATTGGC-3'	
<i>dfr</i> (A)	5'-CCTTGGCACTTACCAAATG-3'	50
	5'-CTGAAGATTGCACTTCCC-3'	

subtilis Natto obtained from the Japanese soybean staple Natto (Hong et al., 2008) as well as the East European probiotic *B. subtilis* VKPM B2335 (Sorokulova et al., 2008), most *B. subtilis* ssp. *subtilis* (G2, H4, C6 and I7) investigated in the present study were susceptible to most antimicrobials tested including those highlighted by EFSA (2008). Knowledge on the antimicrobial resistance of *B. subtilis* group species is limited and therefore little is known on the population distributions of susceptibility for these compounds.

In the present study, no positive amplicons were obtained when the isolates were screened for the presence of the most prevalent genes associated with resistance to chloramphenicol (*catp*P501), erythromycin (*erm*(A), *erm*(B), *erm*(C)), kanamycin (*aph*(3^{''})-I, *aph*(3^{''})-III, *ant*(2^{''})-I), penicillin (*bla*Z), streptomycin (*aad*A, *aad*E, *Str*A, *Str*B), and trimethoprim (*dfr*(A)). This result suggests that the reduced susceptibility towards chloramphenicol, erythromycin, kanamycin, penicillin, streptomycin and trimethoprim may be intrinsic or natural. This finding is very important, since antimicrobial resistance plasmids are of special interest from the safety point of view, because they may be transferred to other strains

including pathogens. Indeed, intrinsic resistance is considered to present a minimal risk for spread whereas acquired resistance mediated by mobile genetic elements like plasmids and transposons is considered to have a high risk for spread (European Commission, 2001). Given that the studied *B. subtilis* ssp. *subtilis* and *B. amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* are for the most part susceptible to the antimicrobials tested and that they do not carry the most prevalent resistance genes for chloramphenicol, erythromycin, kanamycin, penicillin, streptomycin and trimethoprim, they can be considered as potentially safe for use as starter cultures. However, additional studies will be required to determine the exact nature of the antimicrobial resistance observed in this study.

Acid resistance and bile tolerance of the *Bacillus* isolates

As seen in Table 4, all 13 *Bacillus* isolates studied were able to survive in BHI broth (pH 2.5) following 4 h of incubation at 37°C. There was no sensitive variation in viable cell numbers (about 10⁴ CFU/ml) from 0 to 4 h.

Table 3. Minimal Inhibitory Concentrations (MIC) and antimicrobial susceptibility of *Bifalga Bacillus* spp.

Antimicrobial	MIC ($\mu\text{g/ml}$) [*]												
	<i>B. amyloliquefaciens</i> ssp. <i>plantarum</i>				<i>B. subtilis</i> ssp. <i>subtilis</i>					<i>B. licheniformis</i>			
	A4	I8	G3	G2	H4	F1	C3	C6	I7	J3	E5	E3	F9
Avilamycin	<2 s	<2 s	<2 s	<2 s	4 s	<2 s	<2 s	<2 s	<2 s	<2 s	<2 s	<2 s	<2 s
Bacitracin	>64 r	>64 r	>64 r	>64 r	8 s	>64 r	4 s	4 s	>64 r	>64 r	>64 r	>64 r	>64 r
Chloramphenicol	4 s	4 s	<2 s	8 s	4 s	8 s	16 r	8 s	4 s	>64 r	32 r	32 r	16 r
Ceftiofur	0.25 s	0.25 s	0.25 s	1 s	0.5 s	2 s	<0.12 s	0.5 s	0.5 s	0.5 s	1 s	1 s	1 s
Ciprofloxacin	<0.12 s	<0.12 s	<0.12 s	<0.12 s	0.5 s	1 s	<0.12 s	<0.12 s	<0.12 s	<0.12 s	<0.12 s	<0.12 s	<0.12 s
Daptomycin	4 s	4 s	2 s	2 s	2 s	4 s	2 s	4 s	4 s	16 r	>16 r	16 r	>16 r
Erythromycin	<0.12 s	<0.12 s	<0.12 s	<0.12 s	0.25 s	<0.12 s	<0.12 s	<0.12 s	<0.12 s	0.25 s	>32 r	>32 r	0.5 s
Flavomycin	>32 r	>32 r	>32 r	>32 r	>32 r	>32 r	8 s	>32 r	>32 r	>32 r	>32 r	>32 r	>32 r
Florfenicol	<1 s	<1 s	<1 s	<1 s	<1 s	<1 s	<1 s	2 s	<1 s	2 s	2 s	2 s	1 s
Gentamycin	\leq 2 s	\leq 2 s	\leq 2 s	\leq 2 s	\leq 2 s	4 s	\leq 2 s	\leq 2 s	\leq 2 s	\leq 2 s	\leq 2 s	\leq 2 s	\leq 2 s
Kanamycin	\leq 2 s	\leq 2 s	\leq 2 s	\leq 2 s	\leq 2 s	>64 r	\leq 2 s	\leq 2 s	\leq 2 s	4 s	4 s	4 s	4 s
Linezolid	<1 s	<1 s	<1 s	<1 s	<1 s	<1 s	<1 s	<1 s	<1 s	<1 s	<1 s	<1 s	<1 s
Penicillin	<0.06 s	<0.06 s	<0.06 s	<0.06 s	<0.06 s	<0.06 s	<0.06 s	<0.06 s	<0.06 s	0.5 r	0.25 r	0.25 r	0.25 r
Salinomycin	<2 s	<2 s	<2 s	<2 s	<2 s	<2 s	<2 s	<2 s	<2 s	<2 s	<2 s	<2 s	<2 s
spectinomycin	64 s	64 s	64 s	64 s	64 s	32 s	32 s	32 s	32 s	32 s	64 s	32 s	64 s
Streptomycin	8 s	8 s	4 s	4 s	4 s	8 s	4 s	4 s	4 s	64 r	16 r	16 r	32 r
Sulphamethoxazol	64 s	128 s	64 s	512 r	512 r	256 r	16 s	>512 r	256 r	16 s	256 r	32 s	64 s
Synercid	8 r	8 r	8 r	2 s	<0.5 s	>16 r	2 s	<0.5 s	<0.5 s	4 s	4 s	4 s	2 s
Tetracyclin	8 s	8 s	8 s	<0.5 s	<0.5 s	4 s	<0.5 s	1 s	2 s	<0.5 s	8 s	<0.5 s	2 s
Tiamulin	>32 r	>32 r	>32 r	32 r	<0.25 s	>32 r	>32 r	<0.25 s	0.5 s	32 r	>32 r	32 r	0.5 s
Tigecycline	0.06 s	0.06 s	0.06 s	0.03 s	0.03 s	0.06 s	0.03 s	0.03 s	0.03 s	<0.015 s	0.03 s	<0.015 s	<0.015 s
Trimethoprim	<1 s	<1 s	<1 s	<1 s	<1 s	<1 s	<1 s	32 r	<1 s	<1 s	<1 s	<1 s	<1 s
TMP+SMX	<0.25 s	<0.25 s	<0.25 s	0.5 s	<0.25 s	<0.25 s	8 r	2 s	<0.25 s	<0.25 s	<0.25 s	<0.25 s	<0.25 s
Vancomycin	<2 s	<2 s	<2 s	<2 s	<2 s	<2 s	<2 s	<2 s	<2 s	<2 s	<2 s	<2 s	<2 s

* s, sensitive; i, intermediary; r, resistant; according to the proposed breakpoints mentioned in Table 1.

Viable counts from 1, 2 and 3 h were identical to viable counts at 4 h (data not shown). This indicates that these strains may be able to survive the acidic conditions of the stomach. The pH value (2.5) used in the present study for the selection of

potential starter cultures has been shown to be very selective and even though it is not the most common pH value of the human stomach it assures the isolation of very acid-tolerant strains (Pennachia et al., 2004). Interestingly, the vegetative cells of

all *Bacillus* spp. showed excellent resistance to 0.3% bile. A growth was even observed from 10^4 CFU/ml at 0 h up to 10^6 CFU/ml after 4 h of incubation at 37°C (Table 4). After pre-exposure to BHI broth pH 2.5 for 3 h, all *Bacillus* isolates were

Table 4. Survival of *Bacillus* spp. in low pH and tolerance to bile.

Strain		Viable count (CFU/ml)								
		pH 7		pH 2.5		Bile		Bile/ pre-exposure to low pH		
		0 h	4 h	0 h	4 h	0 h	4 h	0 h	3 h/pH2.5	24 h/Bile
<i>B. amyloliquefaciens</i> <i>ssp. plantarum</i>	A4	1.3×10 ⁵	1.2×10 ⁷	2.3×10 ⁴	1.8×10 ⁴	2.2×10 ⁴	3.0×10 ⁸	5.0×10 ⁴	4.2×10 ⁴	7.8×10 ⁷
	I8	8.3×10 ⁴	1.7×10 ⁷	8.6×10 ⁴	7.4×10 ⁴	1.9×10 ⁴	4.2×10 ⁸	6.2×10 ⁴	2.5×10 ⁴	1.5×10 ⁸
	G3	9.4×10 ⁴	2.1×10 ⁷	1.2×10 ⁴	1.0×10 ⁴	6.5×10 ⁴	6.2×10 ⁸	5.4×10 ⁴	1.6×10 ⁴	6.5×10 ⁷
<i>B. subtilis</i> ssp. <i>subtilis</i>	H4	2.0 ×10 ⁴	8.9×10 ⁶	2.6×10 ⁴	2.3×10 ⁴	3.6×10 ⁴	2.3×10 ⁸	1.1×10 ⁴	6.5×10 ³	1.4×10 ⁷
	F1	5.5×10 ⁴	9.6×10 ⁶	6.0×10 ⁴	4.4×10 ⁴	5.4×10 ⁴	5.6×10 ⁸	5.3×10 ⁴	3.4×10 ⁴	1.3×10 ⁸
	C3	4.2×10 ⁴	7.7×10 ⁶	2.4×10 ⁴	1.8×10 ⁴	1.2×10 ⁴	8.0×10 ⁵	1.5×10 ⁴	4.0×10 ³	5.4×10 ⁶
	C6	4.5×10 ⁴	1.1×10 ⁶	1.4×10 ⁴	1.3×10 ⁴	2.1×10 ⁴	4.5×10 ⁵	5.5×10 ⁴	3.4×10 ⁴	1.0×10 ⁶
	G2	5.1×10 ⁴	4.9×10 ⁶	8.6×10 ⁴	7.7×10 ⁴	5.7×10 ⁴	5.0×10 ⁵	3.7×10 ⁴	2.0×10 ⁴	7.5×10 ⁷
	I7	4.3×10 ⁴	4.7×10 ⁶	1.4×10 ⁴	1.2×10 ⁴	3.0×10 ⁴	3.1×10 ⁶	2.0×10 ⁴	1.9×10 ⁴	8.2×10 ⁷
<i>B. licheniformis</i>	E3	2.7×10 ⁵	1.8×10 ⁷	4.0×10 ⁴	1.5×10 ⁴	3.5×10 ⁴	7.5×10 ⁵	4.5×10 ⁴	1.2×10 ⁴	9.2×10 ⁷
	F9	8.0×10 ⁴	5.9×10 ⁶	1.9×10 ⁴	7.7×10 ³	5.1×10 ⁴	4.2×10 ⁵	1.6×10 ⁴	1.1×10 ⁴	5.1×10 ⁷
	J3	9.0×10 ⁴	3.2×10 ⁶	4.0×10 ⁴	2.8×10 ⁴	4.9×10 ⁴	1.7×10 ⁵	3.8×10 ⁴	1.0×10 ⁴	2.1×10 ⁸
	E5	6.8×10 ⁴	3.7×10 ⁶	5.1×10 ⁴	3.4×10 ⁴	5.4×10 ⁴	1.6×10 ⁶	3.2×10 ⁴	2.5×10 ⁴	1.1×10 ⁸

able to grow in BHI broth containing 0.3% oxgall bile with viable cell counts reaching up to 10⁸ CFU/ml after 24 h incubation at 37°C (Table 4). The concentration of bile (0.3%) used has been recommended to be suitable for the selection of probiotics (Goldin and Gorbach, 1992) while other authors reported that this concentration is discriminatory (Chateau et al., 1994; Papamanoli et al., 2003). The fact that our isolates showed full resistance to acidic pH and bile is not in agreement with the findings of Barbosa et al. (2005). Indeed, these authors reported that vegetative cells of different *Bacillus* species (including *B. subtilis* and *B. licheniformis*) isolated from chicken fecal materials were unable to

survive the simulated gastro-intestinal tract conditions. However, they observed that spores of the same *Bacillus* species showed excellent tolerance to bile salts and simulated gastric conditions. In contrast, some *Bacillus* spp. spores were reported to be susceptible to these conditions (Duc et al., 2004; Guo et al., 2006). *B. amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* A4, I8 and G3 and *B. subtilis* ssp. *subtilis* H4, G2, C6 and I7 showed susceptibility to most antimicrobials tested and full resistance to simulated gastro-intestinal tract conditions making them promising starter cultures candidates for *H. sabdariffa* fermentation into *Bika*ga. However, to complete the selection of the starter cultures, further studies

including for example proteolytic, lipolytic and organoleptic properties need to be addressed. It will also be interesting to investigate the probiotic potential of these isolates.

ACKNOWLEDGMENT

This work was supported by a Danish International Development Agency (DANIDA) funded project, London Metropolitan University/FLSC/SHS/MRU, UK and the Technical University of Denmark/National Food Institute. They are gratefully acknowledged.

REFERENCES

- Ammor MS, Belen Florez, Mayo B (2007). Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiol.* 24:559-570.
- Barbosa MT, Serra RC, La Ragione MR, Woodward JM, Henriques AO (2005). Screening for *Bacillus* isolates in the Broiler Gastrointestinal Tract. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:968-978.
- Bengaly MD (2001). Microbiological Study and nutritional value of traditional protein-rich condiment, obtained by natural fermentation of *Hibiscus sabdariffa* seeds. PhD Thesis, University of Ouagadougou, p. 116.
- Bengaly MD, Béré A, Traoré A (2006). The chemical composition of bikalga, a traditional fermented roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) seeds condiment. Part II: evaluation of mineral, total polyphenols and phytic acid content, predicting the iron bioavailability. *Elec. J. Food Plant Chem.* 1:7-11.
- Chateau N, Deschamps AM, Sassi AH (1994). Heterogeneity of bile salts resistance in the *Lactobacillus* isolates of a probiotic consortium. *Lett. Appl. Microbiol.* 18:42-44.
- Compaoré CS, Nielsen DS, Ouoba LII, Berner TS, Nielsen KF, Sawadogo-Lingani H, Diawara B, Ouédraogo GA, Jakobsen M, Thorsen L (2013a). Co-production of surfactin and a novel bacteriocin by *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* H4 isolated from *Bikalga*, an African alkaline *Hibiscus sabdariffa* seeds fermented condiment. *Int. J. Food Microbiol.* 162:297-307.
- Compaoré CS, Nielsen DS, Sawadogo-Lingani H, Berner TS, Nielsen KF, Adimpong DB, Diawara B, Ouédraogo GA, Jakobsen M, Thorsen L (2013b). *Bacillus amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* strains as potential protective starter cultures for the production of *Bikalga*, an alkaline fermented food. *J. Appl. Microbiol.* 115:133-146.
- Danielsen M, Wind A (2003). Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. *Int. J. Food Microbiol.* 82:1-11.
- Duc LH, Hong HA, Barbosa TM, Henriques AO, Cutting SM (2004). Characterization of *Bacillus* probiotics available for human use. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:2161-2171.
- EFSA (2008). Technical guidance prepared by the Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP) on the update of criteria used in the assessment of bacterial resistance to antibiotics of human or veterinary importance. *J. EFSA.* 732:1-15.
- European Commission (2001). Opinion of the Scientific Committee on Animal Nutrition on the Criteria for Assessing the Safety of Microorganisms Resistant to Antibiotics of Human Clinical and Veterinary Importance. [http://www.europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scan/out64_en.pdf].
- Goldin B, Gorbach S (1992). Probiotics for humans. In R. Fuller (Ed.), *Probiotics: the scientific basis* (pp. 355-376). London: Chapman and Hall.
- Guo X, Li D, Lu W, Piao X, Chen X (2006). Screening of *Bacillus* strains as potential probiotics and subsequent confirmation of the in vivo effectiveness of *Bacillus subtilis* MA139 in pigs. *Antonie van Leeuwenhoek.* 90:139-146.
- Holzappel WH, Haberer P, Snel J, Schillinger U, Huis in't Veld JHJ (1998). Overview of gut flora and probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* 41:85-101.
- Hong HA, Huang JM, Khaneja R, Hiep LV, Urdaci MC, Cutting SM (2008). The safety of *Bacillus subtilis* and *Bacillus indicus* as food probiotics. *J. Appl. Microbiol.* 105:510-520.
- Huang Y, Adams MC (2004). In vitro assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 91:253-260.
- International Organization for Standardization: ISO 7218 (2007). *Food Microbiology-General Requirements and Recommendations.* pp. 66.
- Jensen BL, Baloda S, Boye M, Aarestrup MF (2001). Antimicrobial resistance among *Pseudomonas* spp. and the *Bacillus cereus* group isolated from Danish agricultural soil. *Environ. Int.* 26:581-587.
- Jensen BL, Frimodt-Møller N, Aarestrup FM (1999). Presence of erm gene classes in Gram-positive bacteria of animal and human origin in Denmark. *FEMS Microbiol. Lett.* 170:151-158.
- Klingberg TD, Axelsson L, Naterstad K, Elsser D, Budde BB (2005). Identification of potential probiotic starter cultures for Scandinavian-type fermented sausages. *Int. J. Food Microbiol.* 105:419-431.
- Luna VA, King DS, Gullede J, Cannons AC, Amuso PT, Cattani J (2007). Susceptibility of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus mycooides*, *Bacillus pseudomycooides* and *Bacillus thuringiensis* to 24 antimicrobials using Sensititre® automated microbroth dilution and Etest® agar gradient diffusion methods. *J. Ant. Chem.* 60:555-567.
- Mohamadou BA, Mbofung CM, Thouvenot D (2010). Characterization of some atypical lactic acid bacteria associated with the fermentation of *Hibiscus sabdariffa* seeds. *Afr. J. Microbiol. Res.* 4(24):2655-2660.
- Ouoba LII, Parkouda C, Diawara B, Scotti C, Varnam AH (2008). Identification of *Bacillus* spp from bikalga, fermented seeds of *Hibiscus sabdariffa*: phenotypic and genotypic characterization. *J. Appl. Microbiol.* 104:122-131.
- Papamanoli E, Tzanetakis N, Litopoulou-Tzanetaki E, Kotzekidou P (2003). Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. *Meat Sci.* 65:859-867.
- Parkouda C, Diawara B, Ouoba LII (2008). Technology and physico-chemical characteristics of bikalga, alkaline fermented seeds of *Hibiscus sabdariffa*. *Afr. J. Biotechnol.* 7:916-922.
- Pennachia C, Ercolini D, Blaiotta G, Pepe O, Mauriello G, Villani F (2004). Selection of *Lactobacillus* strains from fermented sausages for their potential used as probiotics. *Meat Sci.* 67:309-317.
- Sorokulova IB, Pinchuk IV, Denayrolles M, Osipova IG, Huang JM, Cutting SM, Urdaci MC (2008). The safety of two *Bacillus* probiotic strains for human use. *Digestive Diseases Sci.* 53:954-963.
- Yagoub AEGA, Mohamed BE, Ahmed AHR, El Tinay AH (2004). Study on *furundu*, a traditional Sudanese fermented Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) seed: Effect on in vitro protein digestibility, chemical composition, and functional properties of the total proteins. *J. Agric. Food Chem.* 52:6143-6150.

3.2 Discussion générale

Au Burkina Faso, les condiments issus de la fermentation des graines légumineuses comme le *Bikalga* (graines d'oseille fermentées), le *Soumbala* (graines de *nére* fermentées) et le *Maari* (graines de baobab fermentées) sont très utilisés pour rehausser le goût des sauces et pour améliorer la qualité nutritionnelle des repas pauvres en protéines (Ouoba, 2003 ; Bengaly, 2001 ; Parkouda *et al.*, 2010). Ces condiments occupent une place importante tant sur le plan socioculturel qu'économique. Pourtant, leur production est toujours artisanale avec une fermentation non contrôlée, entraînant une instabilité des produits finis et rendant ces condiments peu compétitifs vis-à-vis des condiments importés. Dans le but d'améliorer la qualité de ces condiments, des travaux antérieurs ont proposé des cultures starters de *Bacillus* spp. pour une fermentation contrôlée du *Soumbala* (Ouoba, 2003) et du *Maari* (Kaboré, 2012). Cependant, aucun travail de recherche ne s'est jusqu'à présent intéressé à l'amélioration de la qualité du *Bikalga* malgré ses potentialités nutritionnelles et sa grande consommation. Dans ce contexte, la présente étude a entrepris de caractériser des souches de *Bacillus* spp. afin de sélectionner les meilleures souches pouvant être utilisées comme cultures starters dans une fermentation contrôlée du *Bikalga*. Cette caractérisation a porté sur les propriétés antimicrobiennes des souches, leur capacité à produire des bactériocines et des lipopeptides, leur résistance aux antibiotiques, leur résistance au pH acide et leur tolérance à la bile.

Cependant, la définition de cultures starters passe en premier lieu par une bonne identification des microorganismes (Ouoba, 2003). C'est pour cette raison que nos travaux préliminaires ont été de confirmer l'identité de nos souches en utilisant des méthodes très discriminatoires comme le séquençage du gène *gyrB*. En effet, il a été prouvé que le gène *gyrB* est un meilleur marqueur génétique que le gène 16S rRNA pour différencier les espèces et sous-espèces du groupe des *B. subtilis* comprenant *B. subtilis* (*B. subtilis* ssp. *subtilis* et *B. subtilis* ssp. *spizizenii*), *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. methylotrophicus*, *B. atrophaeus* et *B. siamensis* (Wang *et al.*, 2007). Satomi *et al.* (2006) ont également rapporté que le gène *gyrB* est plus utile que le gène 16S rRNA pour différencier les espèces *B. safensis* et *B. pumilus* qui partagent seulement 91,2% de similarité de la séquence

gyrB. Cependant, en plus du séquençage du gène *gyrB*, des tests phénotypiques ont été nécessaires pour différencier les souches de *B. amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* de *B. methylotrophicus* qui est une espèce nouvellement décrite (Madhaiyan *et al.*, 2010).

L'analyse de l'activité antimicrobienne des souches de *Bacillus* spp. du *Bikalga* a montré qu'elles étaient dotées d'activité antibactérienne et antifongique contre plusieurs microorganismes pathogènes et d'altération des aliments. Des observations similaires ont été rapportées pour des *Bacillus* spp. isolés d'autres condiments fermentés africains tels que le *Soumbala*, le *Nététu*, le *Kinéma* et le *Maari* (N'Dir *et al.*, 1994 ; Nout *et al.*, 1998 ; Ouoba *et al.*, 2007 ; Savadogo *et al.*, 2011 ; Kaboré *et al.*, 2012). Des 13 souches étudiées, trois *B. subtilis* ssp. *subtilis* (H4, G2 et F1) et trois *B. amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* (I8, A4 et G3) ont montré les meilleures capacités inhibitrices avec une activité dirigée sur des microorganismes tels que *B. cereus*, *Penicillium* spp., *E. coli*, *M. luteus*, *S. aureus*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Y. enterocolitica* et *L. monocytogenes*. Les souches de *B. cereus* par exemple, peuvent provoquer des diarrhées par la production d'entérotoxines variées et des vomissements par la production de toxines émétiques (Stenfors *et al.*, 2008). En outre, elles sont souvent isolées dans des produits fermentés africains incluant le *Bikalga* (Ouoba *et al.*, 2008), l'*Afitin* (Azokpota *et al.*, 2006), le *Maari* (Parkouda *et al.*, 2010), le *Yanyanku* et l'*Ikpiru* (Agbobatinkpo *et al.*, 2013) posant ainsi un problème de sécurité sanitaire pour ces aliments. De ce fait l'inhibition de ces germes par nos souches revêt un intérêt majeur pour la bioconservation du *Bikalga*.

Il a été constaté que le surnageant de cultures des *B. subtilis* ssp. *subtilis* inhibait uniquement la croissance des indicateurs de bactéries pathogènes Gram-positifs, ce qui est en accord avec les résultats rapportés par Kaboré *et al.* (2012). Cela peut s'expliquer selon Riley et Wertz (2002) par le fait que l'activité des bactériocines produites par les bactéries Gram-positives est souvent restreinte à d'autres bactéries gram-positives. Par contre, le surnageant de cultures des *B. amyloliquefaciens* a inhibé aussi bien la croissance des indicateurs de bactéries Gram-positifs que des indicateurs de bactéries Gram-négatifs. Ces souches ont également montré une forte activité inhibitrice contre plusieurs souches de *Penicillium* spp. Des études réalisées sur l'activité antimicrobienne d'une souche de *B. amyloliquefaciens* (LBM

5006) isolée au Brésil ont aussi montré que sa substance antimicrobienne était active contre des bactéries pathogènes Gram-positives et Gram-négatives (Lisboa *et al.*, 2006), contre des algues phytopathogènes (Benitez *et al.*, 2010) et contre l'amibe *Acanthamoeba polyphaga* (Benitez *et al.* 2011). Cependant, contrairement à la présente étude, la substance active responsable de l'inhibition a été attribuée à une protéine de masse molaire de 5 kDa (Lisboa *et al.*, 2006). Plusieurs études ont également examiné le spectre d'activité inhibitrice des souches de *B. amyloliquefaciens* indiquant qu'elles étaient capables d'activité antibactérienne et antifongique (Sun *et al.*, 2006 ; Sutyak *et al.*, 2008 ; Yoshida *et al.*, 2001 ; Yu *et al.*, 2002).

Toutes les souches de *B. amyloliquefaciens* dans cette étude étaient capables de croître et de produire une activité antimicrobienne contre *B. cereus* dans un bouillon de culture préparé uniquement à base des graines broyées d'*H. sabdariffa*. Ces résultats montrent que ces souches sont capables d'exprimer leur activité antimicrobienne en utilisant comme seul substrat pour leur croissance les graines cuites d'*H. sabdariffa*. Ce qui signifie que nos souches de *B. amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* pourraient être utilisées pour inhiber la croissance des microorganismes pathogènes et d'altération durant la fermentation du *Bikalga*. Quant à *B. subtilis* ssp. *subtilis* H4, (sélectionnée pour étudier les caractéristiques de sa substance inhibitrice) elle n'était pas capable de produire d'inhibition à la suite de sa croissance dans le bouillon des graines broyées d'*H. sabdariffa*. Ce résultat est similaire à celui de Kaboré *et al.* (2013) qui ont rapporté que les souches de *B. subtilis* (B3, B122, et B222) isolées du *Maari* se développaient bien dans les graines cuites de baobab et dans le bouillon *Maari*, mais ne produisaient pas d'activité antimicrobienne dans ces substrats. Cela pourrait s'expliquer par une faible activité protéolytique entraînant un faible métabolisme dans les substrats naturels (Moreno *et al.*, 2002). Selon Nascimento *et al.* (2010), l'absence d'activité antimicrobienne dans les substrats naturels pourrait être liée aux interactions entre les substances antimicrobiennes et certains composés du substrat tels que les lipides.

Selon Holzapfel *et al.* (1995), la capacité des souches de *Bacillus* à inhiber la croissance des indicateurs de bactéries pathogènes pourrait être due à la production de métabolites antimicrobiens (acides organiques, alcools, H₂O₂...), à une compétition pour nutriments, à une production de bactériocines ou d'enzymes.

La caractérisation de la substance inhibitrice produite par *B. subtilis* ssp. *subtilis* H4 a révélé qu'elle est sensible à la protéase et à la trypsine. Ce résultat, en plus du fait que l'activité de H4 ait été détectée par SDS-PAGE indique la nature protéique de la substance produite (Bizani et Brandelli, 2002). Il a aussi été trouvé qu'un fragment de sucre et un fragment de lipide sont nécessaires à l'activité antimicrobienne et que des ponts disulfures sont présents dans la structure de la bactériocine produite. Aucune bactériocine produite par les souches de *Bacillus* spp. n'a encore été décrite présentant des caractéristiques similaires. Malgré que les gènes codant pour la subtiline et la subtilosine soient présents dans le génome de H4, la masse molaire de la protéine active détectée était de 3346,59 Da, différente de celle de la subtiline (3319.56 Da; Stein, 2008) et de la subtilosine (3400.57 Da; Marx *et al.*, 2001), ce qui appuie l'hypothèse de la production d'une nouvelle bactériocine par H4. En plus de cette nouvelle bactériocine, H4 produit des surfactines qui pourraient contribuer à améliorer l'activité de la bactériocine produite comme mentionnée par Stein (2005). Des études très récentes menées par Kaboré *et al.* (2012) ont également mentionné la production de bactériocines par des souches de *B. subtilis* isolées du *Maari*. La production de surfactines par des souches de *B. subtilis* isolées du *Natto* en Asie et du *Soumbala* au Burkina Faso, a quant à elle été rapportée dans les travaux de Sumi *et al.* (2000) et de Savadogo *et al.* (2011), respectivement.

Contrairement au *B. subtilis* ssp. *subtilis* H4, les substances antimicrobiennes des trois souches de *B. amyloliquefaciens* (A4, I8 et G3) n'étaient pas de nature protéique. En plus, aucun gène codant pour la synthèse des bactériocines habituellement produites par les souches du groupe des *B. subtilis* comme la subtiline, la subtilosine, l'éricine, la sublancine n'a été détecté dans l'ADN des souches A4, I8 et G3, attestant le fait que nos *B. amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* ne produisent pas de bactériocines. Nos résultats sont en accord avec les observations de Rückert *et al.* (2011) selon lesquelles la synthèse par voie ribosomale de petits peptides antimicrobiens à savoir les bactériocines était très rare chez les souches de *B. amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* due à l'absence d'insertions de prophages génomiques. Les analyses PCR ont d'autre part révélé dans la présente étude que toutes les souches de *B. amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* possèdent les gènes codant pour la synthèse des lipopeptides iturine, surfactine, fengycine, bacillomycine et mycosubtiline, ainsi que les gènes impliqués dans la synthèse des polykétides macrolactine, bacillaene et difficidine, et de la

dipeptide bacilysine. La production des lipopeptides iturine, surfactine et fengycine a été confirmée dans le surnageant de culture par HPLC-MS. Les trois souches de *B. amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* (A4, I8 et G3) sont phylogénétiquement plus proches des souches de référence *B. amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* FZB42, CAU B946 et YAU qui possèdent plusieurs gènes codant pour la synthèse de lipopeptides et de polykétides ayant des activités antibactériennes, antifongiques et nématocidales (Borriss *et al.*, 2011). De ce fait, le large spectre d'activité antimicrobienne de ces souches observé dans cette étude est certainement dû soit aux lipopeptides, soit aux polykétides, soit encore à une action synergique de ces différents composés. D'autres études antérieures avaient mis en évidence la production de lipopeptides tels que la surfactine par des souches de *B. subtilis* isolées de condiments fermentés africains tels que le *Nététu* (N'Dir *et al.*, 1994) et le *Soumbala* (Sawadogo, 1998 ; Savadogo *et al.*, 2011). Cependant, aucune étude n'avait mentionné la production simultanée de surfactine, d'iturine et de fengycine par des *Bacillus* isolés de condiments africains fermentés. Selon Savadogo *et al.* (2011), les lipopeptides produits par les souches de *B. subtilis* pourraient jouer un rôle important dans les propriétés fonctionnelles des produits fermentés grâce à leurs propriétés surfactantes. La présence d'un surfactant biologique naturel tel que la surfactine dans les condiments fermentés comme le *Soumbala* et le *Bikalga* pourrait contribuer à la propriété d'abaissement de l'hypertension artérielle attribuée à ces produits (Sawadogo, 1998).

Nous avons constaté à travers notre étude que les souches de *B. subtilis* ssp. *subtilis* (y compris H4) et les souches de *B. amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* (A4, I8, G3) étaient sensibles à la plupart des antibiotiques testés incluant ceux cités par l'autorité européenne de sécurité alimentaire (European Food Safety Authority, EFSA, 2008). Des données publiées sur la résistance aux antibiotiques des souches de *Bacillus* spp. en général et de *Bacillus* spp. isolés de condiments fermentés en particulier sont rares. Cependant nos résultats sont comparables à ceux trouvés pour d'autres souches de *B. subtilis* utilisées comme probiotiques en Europe de l'Est (Hong *et al.*, 2008 ; Sorokulova *et al.*, 2008). Le fait que nos souches de *B. subtilis* ssp. *subtilis* et de *B. amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* soient sensibles à la plupart des antibiotiques testés peut être conçu comme un avantage si l'on considère que les gènes de résistance aux antibiotiques peuvent être transférés à d'autres

bactéries incluant les pathogènes. Comme précédemment reporté par Sorokulova *et al.* (2008) pour *B. licheniformis* 31 (BL31), toutes les souches de *B. licheniformis* dans notre étude étaient résistantes au chloramphénicol. Cependant, les analyses PCR ont montré que ces souches ne possèdent pas les gènes de résistance au chloramphénicol. De la même manière aucun gène de résistance à l'érythromycine, à la kanamycine, à la pénicilline, à la streptomycine et à la triméthoprine n'a été détecté dans notre étude. Cela pourrait s'expliquer par le fait que la résistance à ces antibiotiques n'est pas la conséquence de la présence des gènes recherchés et que la résistance observée vis-à-vis de ces antibiotiques est probablement de nature intrinsèque.

Toutes les souches de *Bacillus* spp. dominantes du *Bikalga* ont présenté une excellente capacité à survivre en condition acide, de même qu'en présence de bile avec ou sans exposition préalable à l'acide. Barbosa *et al.* (2005) ont rapporté que les spores de *Bacillus* spp. (incluant *B. subtilis* et *B. licheniformis*) isolés de fèces de poulets pouvaient résister à des conditions similaires à celles du tractus gastro-intestinal (pH acide et bile). Nos résultats suggèrent donc que les *Bacillus* spp. du *Bikalga* y compris ceux présélectionnés comme starters pourraient survivre le passage du tractus gastro-intestinal. Il serait donc intéressant d'explorer dans des futures études les propriétés probiotiques de ces souches.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La présente étude a permis une différenciation des espèces et des sous espèces des principaux *Bacillus* spp. isolés du *Bikalga* et a montré qu'ils sont constitués de *B. subtilis* ssp. *subtilis*, de *B. licheniformis* et de *B. amyloliquefaciens* ssp. *plantarum*. Ces souches ont été examinées pour leurs propriétés antimicrobiennes et les résultats ont montré que trois souches de *B. subtilis* ssp. *subtilis* (H4, G2, F1) et trois souches de *B. amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* (I8, G3, A4) présentent les meilleures capacités inhibitrices. Elles ont fortement inhibé la croissance des bactéries pathogènes Gram-positives et Gram-négatives tels que *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp., *S. aureus*, *Y. enterocolitica*, *M. luteus*, *Shigella* spp., *E. coli*, et des champignons pathogènes comme *P. nordicum* et *P. commune*. En outre, les trois *B. amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* ont été capables de produire une activité antimicrobienne contre *B. cereus* en utilisant comme seul substrat pour leur croissance un bouillon préparé à base de graines broyées d'*H. sabdariffa*.

La caractérisation physico-chimique a montré que *B. subtilis* ssp. *subtilis* H4 secrète une mixture de composés antimicrobiens comprenant une nouvelle bactériocine de masse molaire 3346,59 Da et des surfactines. Par contre les trois *B. amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* ne produisent pas de bactériocines mais des lipopeptides dont l'iturine, la surfactine et la fengycine ont été identifiés. Les gènes de synthèse de la bacillomycine, de la mycosubtiline, des polykétides macrolactine, bacillaene et difficidine ainsi que de la dipeptide bacilysine ont également été détectés dans le génome de G3, I8 et A4 par amplification à l'aide d'amorces spécifiques d'ADN. La diversité des souches de *Bacillus* dans leurs propriétés antimicrobiennes indique qu'un starter formé d'une culture mixte de *B. amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* et de *B. subtilis* ssp. *subtilis* pourrait assurer une fermentation des graines d'oseille donnant du *Bikalga* de haute qualité sanitaire.

Les souches A4, I8, G3 et H4 peuvent également être considérées saines par rapport au risque de transfert de résistance aux antibiotiques à d'autres bactéries incluant les pathogènes. En effet, *B. amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* A4, I8 et G3 ont été résistantes à seulement quatre (bacitracine, flavomycine, synergide et tiamuline) des 24 antibiotiques testés et *B. subtilis* ssp. *subtilis* H4 était résistante à seulement deux antibiotiques à savoir la flavomycine et la sulphaméthoxazole.

Elles ont également présenté une excellente capacité à survivre dans les conditions acides, de même qu'à tolérer et à croître en présence de bile indiquant qu'elles pourraient survivre aux conditions du tractus gastro-intestinal.

Au regard de tous ces résultats, il apparaît que *B. subtilis* ssp. *subtilis* H4 et *B. amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* I8, G3 et A4 sont de potentiels candidats pour former un consortium de cultures starters pour contrôler la fermentation du *Bikalga*. La capacité de production de bactériocines et de lipopeptides permettra à ces souches d'inhiber la croissance des germes pathogènes durant la production du *Bikalga*, d'assurer la sécurité sanitaire du produit et par conséquent préserver la santé du consommateur. L'utilisation de souches productrices de lipopeptide comme la surfactine qui est un émulsifiant et un surfactant biologique naturel en fermentation contrôlée pourrait avoir un impact positif sur les propriétés fonctionnelles du produit fini. L'innocuité des souches H4, I8, G3 et A4 par rapport au risque de transfert de résistance aux antibiotiques à d'autres bactéries, leur bonne capacité à survivre dans les conditions du tractus gastro-intestinal en font également de bons candidats de cultures starters pour contrôler la fermentation des graines d'*H. sabdariffa* et aboutir à du *Bikalga* de qualité nutritionnelle, sanitaire et organoleptique améliorée.

Cependant, afin de confirmer et de finaliser la sélection des starters, ce travail devra être poursuivi par :

- La réalisation de fermentations contrôlées (en unité pilote) par inoculation de cultures starters de *B. amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* A4, I8 et G3 et de *B. subtilis* ssp. *subtilis* H4 avec application des Bonnes Pratiques d'Hygiène (BPH) et des Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF), suivie de la caractérisation biochimique, microbiologique et organoleptique des produits finis ;
- La détermination de la forme (monoculture ou culture mixte) de cultures starters la plus appropriée pour une fermentation optimale du *Bikalga* ;
- L'étude des propriétés technologiques de chaque souche, à savoir sa capacité de dégradation des protéines, des lipides et des glucides.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abu-Tarboush, H.M., Ahmed, S.B., Al Khatani, H.A., 1997. Some nutritional and functional properties of karkade (*Hibiscus sabdariffa*) seed products. *Cereal Chem.* 74, 352-355.
- Abu-Tarboush, H.M., Ahmed, S.A.B., 1996. Studies on Karkade (*Hibiscus sabdariffa*)-Protease inhibitors, phytate, in vitro protein digestibility and gossipol content. *Food Chem.*, 56: 15-19.
- Agbobatinkpo, P.B., Thorsen, L., Nielsen, D.S., Azokpota, P., Akissoe, N., Hounhouigan, J.D. and Jakobsen, M., 2013. Biodiversity of aerobic Endospore-Forming Bacterial species occurring in *Yanyanku* and *Ikpiru*, fermented seeds of *Hibiscus sabdariffa* used to produce food condiments in Benin. *Int J Food Microbiol* 163, 231–238.
- Agbobatinkpo, B.P., Azokpota P., Akissoe, N., Kayodé, P., Da Gbadji, R., Hounhouigan, J.D., 2011. Indigenous perception and characterization of *yanyanku* and *ikpiru* two functional additives for the fermentation of African locust bean *Ecol. Food. Nutr.* 50, 101-114
- Achi, O.K., 2005. Traditional fermented protein condiments in Nigeria. *African Journal of Biotechnology* 4 (13), 1612-1621.
- Agata, N., Mori, M., Ohta, M., Suwan, S., Ohtani I., Isobe, M., 1994. A novel dodecadepsipeptide, cereulide, isolated from *Bacillus cereus* causes vacuole formation in HEp-2 cells. *FEMS Microbiology Letters*,121: 31-34.
- Ali, B.H., Moussa, H.M., El-Mougy, S., 2003. The effect of a water extract and anthocyanins of *Hibiscus sabdariffa* L. on paracetamol induced hepatotoxicity in rats, *Phytother. Res.* 17 (1) 56–59.
- Al-Wandawi, H., Al-Shaikly, K., Abdulrahman, M., 1984. Roselle seeds: a new protein source. *J. Agric. Food Chem.* 32, 510–512.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J.H., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25: 3389-3402.
- Ananou, S., Munoz, A., Martinez-Bueno, M., Gonzalez-Tello, P., Galvez, A., Maqueda, M., Valdivia, E., 2010. Evaluation of an enterocin AS-48 enriched bioactive powder obtained by spray drying. *Food Microbiol.* 27: 58-63.

- Arguelles-Arias, A., Ongena, M., Halimi, B., Lara, Y., Brans, A., Joris, B., Fickers, P., 2009. *Bacillus amyloliquefaciens* GAI as a source of potent antibiotics and others secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens. Microbial Cell factories. doi: 10.1186/1475-2859-8-63.
- Avonts L., De Vuyst, L., 2001. Antimicrobial potential of probiotic lactic acid bacteria. *Meded Rijksuniv Gent Fak Landbouwkde Toegep Biol Wet*, 66: 543-50.
- Awad, G., 2005. Caractérisation et étude de l'effet des sources de carbone et d'azote sur la production de nombreux métabolites secondaires chez *Aspergillus ochraceus* non producteur de l'ochratoxine A. Thèse de doctorat de l'Institut National Polytechnique de Toulouse. 175p.
- Azokpota, P., Hounhouigan, D.J., Nago, M.C., 2006. Microbiological and chemical changes during the fermentation of African locust bean *Parkia biglobosa*, to produce *afitin*, *iru* and *sonru*, three traditional condiments produced in Benin, *International Journal of Food Microbiology*, 107: 304–309.
- Babasaki, K., Takao, T., Shimonishi, Y., Kurahashi, K., 1985. Subtilosin A, a new antibiotic peptide produced by *Bacillus subtilis* 168: isolation, structural analysis, and biogenesis. *Journal of Biochemistry* 98, 585–603.
- Banerjee, S., Hansen, J.N., 1988. Structure and expression of a gene encoding the precursor of subtilin, a small protein antibiotic. *Journal of Biological Chemistry*, 263: 9508–9514.
- Barbosa, M.T., Serra, R.C., La Ragione, M.R., Woodward, J.M., Henriques, A.O., 2005. Screening for *Bacillus* isolates in the Broiler Gastrointestinal Tract. *Appl Environ Microbiol*. 71: 968-978.
- Bengaly, M.D., Béré, A., Traoré, A., 2006. The chemical composition of bikalga, a traditional fermented roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) seeds condiment. Part II: evaluation of mineral, total polyphenols and phytic acid content, predicting the iron bioavailability. *Elec J Food Plant chem* 1, 7-11.
- Bengaly, M.D., 2001. Etude microbiologique et valeur nutritionnelle d'un condiment traditionnel riche en protéines, obtenu par fermentation naturelle des graines d'*Hibiscus sabdariffa*. Mémoire de Doctorat, UFR-SVT, Université de Ouagadougou, Burkina Faso, 116p.
- Benitez, L.B., Caumo, K., Brandelli, A. Rott, B.M., 2011. Bacteriocin-like substance from *Bacillus amyloliquefaciens* shows remarkable inhibition of *Acanthamoeba polyphaga*. *Parasitol Res* 108:687–691.

- Benitez, L.B., Velho, V.R., Lisboa, P.M., da Costa Medina, F.L., Brandelli, A., 2010. Isolation and Characterization of Antifungal Peptides Produced by *Bacillus amyloliquefaciens* LBM5006. *J Microbiol* 48, 7791-797.
- Besson, F., Quentin M.J., G. Michel., 1989. Action of mycosubtilin on erythrocytes and artificial membranes, *Microbios*, 59,137-143.
- Besson, F., Michel, G., 1987. Isolation and characterization of new iturins: iturin D and iturin E. *Journal of Antibiotics* 40, 437±442.
- Besson, F., F. Peypoux., G. Michel., 1979. Interaction between bacterial membranes and peptidolipids : lysis of *Micrococcus Luteus* protoplasts by derivatives of derivatives of peptidolipidic antibiotics from *Bacillus subtilis*. *Biochem. Biophys. Acta.*, 552-562.
- Besson, F., Peypoux, F., Michel, G., Delcambe, L., 1977. The structure of bacillomycin L, an antibiotic from *Bacillus subtilis*. *Eur J Biochem* 77:61–67.
- Bierbaum, G., Brötz, H., Koller, K-P., Sahl, H-G., 1995. Cloning, sequencing and production of the lantibiotic mersacidin. *FEMS Microbiol Lett* 127: 121–126.
- Bizani, D., Brandelli, A., 2002. Characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus sp.* strain 8A. *Journal of Applied Microbiology*, 93: 512–519.
- Blandino, A., Al-Aseeri, M.E., Pandiella, S.S., Cantero, D., Webb, C., 2003. Cereal-based fermented foods and beverages. *Food Research International* 36, 527-543.
- Borriss, R., Chen, X-H., Rückert, C., Blom, J., Becker, A., Baumgarth, B., Fan, B., Pukall, R., Schumann, P., Spröer, C., Junge, H., Vater, J., Pühler, A., Klenk, H-P., 2011. Relationship of *Bacillus amyloliquefaciens* clades associated with strains DSM 7T and FZB42T: a proposal for *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* subsp. nov. and *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* subsp. nov. based on complete genome sequence comparisons. *Int J. Syst Evolut Microbiol* 61, 1786–1801.
- Bourgeois, C.M., Larpent, J.P., 1996. *Microbiologie Alimentaire, Tome 2 : Les aliments fermentés et fermentations alimentaires*, 2^{ème} éd., Lavoisier Tec & Doc., Paris, 523 p.
- Buchanan R.E. et Gibsons R.E., 1974. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Éd. Williams & Wilkins. Eighth edition.

- Çaliçir, S., Ozcan, M., Haciseferogullari, H., Ugur Yildiz, M., 2005. Study on some physico-chemical properties of Turkey okra (*Hibiscus esculenta* L.) seeds. *J.Food Eng.* 68, 73-78.
- Cao, X-H., Liao, Z-Y., Wang, C-L., Yang, W-Y., Lu, M-F., 2009. Evaluation of a Lipopeptide Biosurfactant from *Bacillus natto* tk-1 as a Potential Source of Anti-adhesive, Antimicrobial and Antitumor Activities. *Brazilian JMicrobiol* 40, 473-379.
- Cattoir, V., 2006. Chloramphénicol, fosfomycine, acide fusidique et polymixines. In : ANTIBIOGRAMME Courvalain. P, Leclercq. R, Bingen. E. 2ème édition, P349-364.
- Chen, H.H., Tsai, P.J., Chen, S.H., Su, Y.M., Chung, C.C., Huang, T.C., 2005. Grey relational analysis of dried roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.), *J. Food Process. Preserv.* 29 228–245
- Christiana, K. R., Nairb, M. G., Jackson, J.C., 2006. Antioxidant and cyclooxygenase inhibitory activity of sorrel (*Hibiscus sabdariffa*), *J. Food Compos. Anal.* 19, 778–783.
- Chung, S., Kong, H., Buyer, J.S., Lakshman, D.K., Lydon, J., Kim, S.D., Roberts, D.P., 2008. Isolation and partial characterization of *Bacillus subtilis* ME488 for suppression of soilborne pathogens of cucumber and pepper. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80:115-123.
- Cissé, M., Dornier, M. Sakho., M. Ndiaye, A., Reynes, M., Sock, O., 2009. Le Bissap (*Hibiscus sabdariffa* L.) Compositions et principales utilisations. *Fruits*, vol, 64, 179-193 Cirad/EDP Sciences. Montpellier.
- Cladera-Olivera, F., Caron, G.R., Brandelli, A., 2004. Bacteriocin-like substance production by *Bacillus licheniformis* strain P40. *Letters in Applied Microbiology*, 38: 251-256.
- Claus, D., Berkeley, R.C.W., 1986. Genus *Bacillus*. In: *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Current Drug Targets, 3: 107-122.
- Compaoré, C.S., Nielsen, D.S., Ouoba, L.I.I., Torben, S.B., Nielsen. K.F., Sawadogo-Lingani, H., Diawara, B., Ouédraogo, G.A., Jakobsen, M., Thorsen, L., 2013a. Co-production of surfactin and a novel bacteriocin by *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* H4 isolated from Bikalga, an African alkaline *Hibiscus sabdariffa* seeds fermented condiment. *Int J Food Microbiol.* 162: 297-307.

- Compaoré, C.S., Nielsen, D.S, Sawadogo-Lingani, H., Torben, S.B., Nielsen, K.F., Adimpong, D.B., Diawara, B., Ouédraogo, G.A., Jakobsen, M., Thorsen, L., 2013b. *Bacillus amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* strains as potential protective starter cultures for the production of *Bikalga*, an alkaline fermented food. *Journal of Applied Microbiology*. 115, 133-146.
- Compaoré, C.S., Jensen, L.B., Diawara, B., Ouédraogo, G.A., Jakobsen, M., Ouoba, L.I.I., 2013c. Resistance to antimicrobials and acid and bile tolerance of *Bacillus* spp isolated from *Bikalga*, fermented seeds of *Hibiscus sabdariffa*. *African journal of Food Science*. DOI: 10.5897/AJFS 2013.1018.
- Couldiati, L.D., 2011. Sécurité alimentaire au Burkina Faso. Rome, 32 p.
- Dafallah, A.A., al-Mustafa, Z., 1996. Investigation of the anti-inflammatory activity of *Acacia nilotica* and *Hibiscus sabdariffa*, *Am. J. Chin. Med.* 24 (1) 263–269.
- Dakwa, S., Sakyi-Dawson, E., Diako, C., Annan, N.T., Amoa-Awua, W.K., 2005. Effect of boiling and roasting on the fermentation of soybeans into *dawadawa soy-dawadawa*, *International Journal of Food Microbiology*, 104: 69–82.
- Davies, E.A., Delves-Broughton, J., 1999. Nisin. In: Robinson, R., Batt, C., and Patel, P. (Eds). *Encyclopedia of Food Microbiology*. Acad, Press. London, UK. pp 191-198.
- Deegan, L.H., Cotter, P.D., Hill, C., 2006. Bacteriocins: biological tolls for biopreservation and shelf-life extension. *Int Dairy J.* 16: 1058-1071.
- Deleu, M., Razafindralambo, H., Popineau, Y., Jacques, P., Thonart, P., Paquot, M., 1999b. Interfacial and emulsifying properties of lipopeptides from *Bacillus subtilis*. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* 152:3–10.
- De Vuyst, L., Vandamme, E.J., 1993. Nisin, a lantibiotic produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*: properties, biosynthesis, fermentation and applications. In *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: Microbiology, Genetics and applications* (De Vuyst, L and Vandamme, E. J., Eds), London: Chapman et Hall, 151-221.
- D’Heureux–Calix, F., Badrie, N., 2004. Consumer acceptance and physicochemical quality of processed red sorrel/roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) sauces from enzymatic extracted calyces, *Food Serv. Technol.* 4 141– 148.
- Diawara, B., Sawadogo, L., Amoa-Amwa, W.K.A., Jakobsen, M., 1998. HACCP system for traditional African fermented foods: Soubala. Taastrup: ISBN 87-90737-00-8 WAITRO, Danish Technological Institute, 77p.

- Diawara, B., Sawadogo, L., Kabore, I.Z., 1992. Contribution a l'étude des procédés traditionnels de fabrications de *Soumbala* au Burkina Faso. Aspects biochimiques, microbiologiques et technologiques, *Science and Technology*, 20: 5–14.
- Dicks, L.M.T., Heunis, D.A., van Staden, D.A., Brand, A., Sutyak Noll, K., Chinkindas, M.L., 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 Verlag. Stellenbosch, South Africa. pp 391-421.
- Diep, D.B., Nes, I.F., 2002. Ribosomally synthesized antibacterial peptides in Gram positive bacteria. *Curr Drug Targets*.3: 107-122.
- Dike, E.N., Odunfa, S.A., 2003. Microbiological and biochemical evaluation of a fermented soyabean product – *Soyadawadawa*. *Journal of Food Science and Technology-Mysore* 40, 606–610.
- Diop, A.G., Sakho, M., Dornier, M., Cisse, M., Reynes, M., 2005. Le baobab africain (*Adansonia digitata* L.): principales caractéristiques et utilisations. *Fruits*, vol. 61, P.55-69.
- Diouf, M., Lô, C., Gueye, M., Mbengue, N.B., 2007. Sélection participative de nouveaux cultivar de quatre (4) espèces de légumes feuilles (*Hibiscus sabdariffa* L., *Amaranthus* L. spp., *Vigna unguiculata* (L.) Walp et *Moringa oleifera* Lam) au Sénégal. *Afr. J. Food Agric. Nutr. Dev.* 7 (3).
- Doi R.H. (1989). Sporulation and ermination. In *Bacillus* ed. Harwood, C.R. pp. 255-291. London: Plenum Press.
- Dortu, C., Thonart, P., 2009. Les bacteriocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêt pour la bioconversion des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 13(1), 143-154.
- Drider, D., al., 2006. The continuing story of class IIa bacteriocin. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 70(2), 564-582.
- Duhan, A., Khetarpaul, N., Bishnoi, S., 2002. Changes in phytate and HCl extractability of calcium, phosphorus and iron of soaked, dehulled, cooked and sprouted pigeon pea cultivar (UPAS-12). *Plant Food Hum. Nutr.*, 57: 275-284.
- Duitman, E.H., Hamoen, L.W., Rembold, M., Venema, G., Seitz, H., Saenger, W., Bernhard, F., Reinhardt, R., Schmidt, M., Ullrich, C., Stein, T., Leenders, F., Vater, J., 1999. The mycosubtilin synthetase of *Bacillus subtilis* ATCC6633:

a multifunctional hybrid between a peptide synthetase, an amino transferase, and a fatty acid synthase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 96, 13294–13299.

- Ehling-Schulz, M., Svensson, B., Guinebretiere, M.H., Lindback, T., Andersson, M., Schulz, A., Fricker, M., Christiansson, A., Granum, P.E., Martlbauer, E., Nguyen-the, C., Salkinoja-Salonen, M., Scherer, S., 2005. Emetic toxin formation of *Bacillus cereus* is restricted to a single evolutionary lineage of closely related strains. Microbiology 151, 183-197.
- Eijsink, V.G., et al., 1998. Comparative studies of class IIa bacteriocins of lactic acid bacteria. Appl. Environ. Microbiol., 64(9), 3275-3281.
- Ekpenyong, T.E., borchers, R.L., 1980. Effect of cooking on the chemical composition of winged beans (*Psophocarpus tetragonolobus*). J. Food Sci. 45: 1559.
- El-Adawy, T.A., 2002. Nutritional composition and antinutritional factors chickpeas (*Cicer arietinum* L.) undergoing different cooking methods and germination. Plant Foods for Human Nutrition 57, 83-97.
- El-Adawy, T.A., Khalil, A.H., 1994. Characteristics of roselle seeds as a new source of protein and lipid, J. Agric. Food Chem 42, 1896 – 1900.
- Endrias, A., 2006. Bio-raffinage de plantes aromatiques et médicinales appliqué à l'*Hibiscus sabdariffa* L. et à l'*Artemisia annua*. Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique de Toulouse.
- European Food Safety Authority-EFSA., 2008. Technical guidance prepared by the Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP) on the update of criteria used in the assessment of bacterial resistance to antibiotics of human or veterinary importance. The EFSA Journal. 732: 1-15.
- Fagbemi T.N., Oshodi A.A., Ipinmoroti K.O., 2005. Processing effects on some antinutritional factors and in vitro multienzyme protein digestibility (IVDP) of three tropical seeds: breadnut (*Artocarpus altilis*), cashwnut (*Anacardium occidentale*) and fluted pumpkin (*Telfairia occidentalis*). Pakistan Journal of Nutrition 4, 250-256.
- Falade, O.S., Otemuyiwa, I.O., Oladipo, A., Oyedapoc, O.O., Akinpelu, B.A., Adewusi, S.R.A., 2005. The chemical composition and membrane stability activity of some herbs used in local therapy for anaemia, J. Ethnopharmacol. 102 15–22.

- FAO/WHO., 1991. Protein quality evaluation. In : Report of joint FAO/WHO Expert consultation, FAO food and nutrition Paper 51, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
- Farji, H.M., Tarkhani, H.A., 1999. The effect of sour tea (*Hibiscus sabdariffa*) on essential hypertension : J. Ethnopharm, 65, 231-236.
- Feere, T.A., Muchnik, J., 1992. Le nététo au Sénégal. Systèmes techniques et innovation. Document de travail INERA/CIRAD-SAR, Montpellier, pp 263-293.
- Fickers, P., Guez, J.S., Damblon, C., Leclère, V., Béchet, M., Jacques, P., Joris, B., 2009. High-level biosynthesis of the anteiso-C (17) isoform of the antibiotic mycosubtilin in *Bacillus subtilis* and characterization of its candidacidal activity. Appl Environ Microbiol 75:4636–4640.
- Fimland, G., et al., 2000. A C-terminal disulfide bridge in pediocin-like bacteriocins renders bacteriocin activity less temperature dependent and is a major determinant of the antimicrobial spectrum. J.Bacteriol., 182, 2643-2648.
- Fortin, D., LO, M., MAYNART, G., 1997. Plantes médicinales du Sahel. Enda-Editions, Dakar, pp : 164-166
- François, J., Chomar, M., Weber, M., Gerard, A., 2003. De l'antibiogramme à la prescription. Biomerieux, 2^{ème} édition, p8-p22.
- Gaitatzis, N., Silakowski, B., Kunze, B., Nordsiek, G., Blocker, H., Hofle, G., Muller, R., 2002. The biosynthesis of the aromatic myxobacterial electron transport inhibitor stigmatellin is directed by a novel Type of Modular polyketide synthase. *J Biol Chem* 277, 13082-13090.
- Gaitatzis, N., Hans, A., Muller, R., Beyer, S., 2001. The *mtaA* gene of the myxothiazol biosynthetic gene cluster from *Stigmatella aurantiaca* DW4/3-1 Encodes a phosphopantetheinyl Transferase that activates polyketide synthases and polypeptide synthetases. *J Biochem* 129, 119-124.
- Galli, G., Rodriguez, F., Cosmina, P., Pratesi, C., Nogarotto, R., de Ferra, F., Grandi, G., 1994. Characterization of the surfactin synthetase multi-enzyme complex. *Biochimica et Biophysica Acta* 1205, 19–28.
- Gálvez, A., Abriouel, H., Ben Omar, N., Lucas, R., 2011. Food Applications and Regulation In: Drider, D., and Rebuffat, S. (Eds). Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications. Springer Verlag. Jaen, Spain. pp 253-390.

- Gálvez, A., Abriouel, H., Lopez, R.L., Ben Omar, N., 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int J Food Microbiol.*120: 51-70.
- Gauthier, S., De Preneuf, J., Rocheman, M., 1996. Aliments fermentes à base de soja. In : Larpent., *Microbiologie alimentaire*, Tome 2, Lavoisier Tec &Doc., Paris, pp232-248.
- Giami S.Y., 2005. Compositional and nutritional properties of selected newly developed lines of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). *Journal of Food composition and Analysis* 18,665-673.
- Green, D.H., Wakeley, P.R., Page, A., Barnes, A., Baccigalupi, L., Ricca, E., Cutting, S.M., 1999. Characterization of two *Bacillus* probiotics. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 4288-4291.
- Guiraud, J.P., 1998. *Microbiologie Alimentaire*. Dunod, Paris, pp 79-168.
- Haji, F.M., Haji, T.A., 1999. The effect of sour tea (*Hibiscus sabdariffa*) on essential hypertension, *J. Ethnopharmacol.* 65 231–236.
- Hainida E., Amin I., Normah H., Mohd-Esa N., Ainul ZAB., 2008. Effects of defatted dried roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) seeds powder on lipid profiles of hypercholesterolemia rats. *Journal of the sciences of Food and Agriculture*, 88: 1043-1050.
- Hansen, B.M., Hendriksen, N.B., 2001. Detection of enterotoxic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains by PCR analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 67:185-189.
- Hancock, R.E., 2000. Cationic antimicrobial peptides: towards clinical applications. *Expert Opin Investig Drugs*.9: 1723-1729.
- Harwood, C.R., 1989. *Bacillus*. London: Plenum Press, 406 p.
- Harper, D.B., Collin, M.A., 1992. Leaf and seed fermentations of Western Sudan. In.: Garden EL, Bokanga M, Harlander S, Hesseltine CW, Steinkraus KH (eds). *Applications of Biotechnology in traditional Fermented Foods*. National Academic Press Washington DC, pp. 105-113
- Hirunpanich, V., Utaipat, A., Morales, N.P., Bunyapraphatsara, N., Sato, H., Herunsale, A., Suthisisang, C., 2006. Hypocholesterolemic and antioxidant effects of aqueous extracts from the dried calyx of *Hibiscus sabdariffa* L. in hypercholesterolemic rats, *J. Ethnopharmacol.* 103 252–260.

- Holzappel, H.W., 2002. Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries. *International Journal of Food Microbiology* 75, 197-212.
- Holzappel, W., 1997. Use of starter cultures in fermentation on a household scale. *Food Control*, 8:241-258.
- Holzappel, W.H., Geisen, R., Schillinger, U., 1995. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *International Journal of Food Microbiology* 24, 343-362.
- Hong, H.A., Huang J.M., Khaneja, R., Hiep, L.V., Urdaci, M.C., Cutting, S.M., 2008. The safety of *Bacillus subtilis* and *Bacillus indicus* as food probiotics. *J Appl Microbiol.* 105: 510-520.
- Huang, X., Gao, X., Zheng, L., Hao, G., 2009. Optimization of Sterilization of *Salmonella enteritidis* in Meat by Surfactin and Iturin Using a Response Surface Method. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 15, 61-67.
- Huang, X., Lu, Z., Bie, X., Lu, F., Zhao, H., Yang, S., 2007. Optimization of inactivation of endospores of *Bacillus cereus* by antimicrobial lipopeptides from *Bacillus subtilis* fmbj strains using a response surface method. *Appl Microbiol Biotechnol* 74(2), 454–461.
- Hutchinson, C.R., Kennedy, J., Park, C., Kendrew, S., Auclair, K., Vederas, J., 2000. Aspects of the biosynthesis of non-aromatic fungal polyketides by iterative polyketide synthases. *Antonie van Leeuwenhoek* 78, 287-295.
- Ibrahim, M.H., Antai, S.P., 1986. Chemical changes during the fermentation of African locust bean (*Parkia filicoidea* Welw) seeds for production of *Dawadawa*. *Qualitas plantarum*, Plant Foods for Human Nutrition, 36:179-184.
- Itokawa, H., Miyashita, T., Morita, H., Takeya, K., Hirano, T., Homma, M., Oka, K., 1994. Structure and conformational studies of Leu7 and Ile7 surfactins from *B. subtilis natto*. *Chem. Pharm. Bull.*, 42(3): 604-607.
- Jacques, P., 2011. Surfactins and Other Lipopeptides from *Bacillus* spp. G. Sobero'n-Chavez (ed.), *Biosurfactants*, Microbiology Monographs 20, DOI 10.1007/978-3-642-14490-5_3.
- Jensen, B.L., Baloda, S., Boye, M., Aarestrup, M.F., 2001. Antimicrobial resistance among *Pseudomonas* spp. and the *Bacillus cereus* group isolated from Danish agricultural soil. *Environ Int.* 26: 581-587.

- Jensen, L.B., Frimodt-Møller, N., Aarestrup, F.M. 1999. Presence of *erm* gene classes in Gram-positive bacteria of animal and human origin in Denmark. FEMS Microbiol Letters. 170: 151-158.
- Jideani, I.A.O., Okeke, C.R., 1991. Comparative-study of microorganisms and sensory attributes of condiments from the fermentation of different seeds, Plant Foods for Human Nutrition. 41: 27–34.
- Jirovetz, L., Jaeger, W., Remberg, G., Espinosa-Gonzalez, J., Morales, R., Woidich, A., Nikiforov, A., 1992. Analysis of the volatiles in the seed oil of *Hibiscus sabdariffa* (Malvaceae) by means of GC-MS and GC-FTIR, J. Agric. Food Chem. 40 1186–1187.
- Jyothi, V., Sumathi, S., 1995 Effect of alkali treatments on the nutritive value of common bean (*Phaseolus vulgaris*). Plant Foods Hum. Nutr. 48:193-200.
- Kaboré, D., Nielsen, S.D., Sawadogo-Lingani, H., Diawara, B., Dicko, H.M., Jakobsen, M., Thorsen, L., 2013. Inhibition of *Bacillus cereus* growth by bacteriocin producing *Bacillus subtilis* isolated from fermented baobab seeds (*Maari*) is substrate dependent. International Journal of Food Microbiology 162:114-119.
- Kaboré, D., Thorsen, L., Nielsen, D.S., Berner, T.S., Sawadogo-Lingani, H., Diawara, B., Dicko, M., Jakobsen, M., 2012. Bacteriocins formation by dominant aerobic sporeformers isolated from traditional *maari*. International Journal of Food Microbiology, 154:10-18.
- Kaboré, D. 2012. Etude des potentialités métaboliques des bactéries dominantes isolées du *Maari* (graines fermentées de baobab) en vue d'une production contrôlée. Thèse de Doctorat Unique. Université de Ouagadougou. 107p.
- Kahane, R., Temple, L., Brat, P., De Bon H., 2005. Les légumes feuilles dans les pays tropicaux : diversité, richesse économique et valeur santé dans un contexte très fragile, in : Les légumes : un patrimoine à transmettre et à valoriser, colloq. AFCEV-BRG-INH, 7–9 Sept. 2005, Angers, France.
- Kameda, Y., Ouhira, S., Matsui, K., 1974. Antitumor activity of *Bacillus natto*. V. Isolation and characterization of surfactin in the culture medium of *Bacillus natto* KMD 2311. Chem Pharm Bull 22:938–944.
- Kerharo, J., Adams, J.G., 1974. La pharmacopée sénégalaise traditionnelle, plantes médicinales et toxiques. Ed Vigot, Paris, pp 205-207.

- Kiers, J.L., Van Laeken, A.E.A. Rombouts, F.M., Nout, M.J.R., 2000. In vitro digestibility of *Bacillus* fermented soya bean. *International Journal of Food Microbiology* 60, 163–169.
- Kim, K., Jung, S.Y., Lee, DK., Jung, J.K., Park, JK., Kim, DK., Lee, CH., 1998. Suppression of inflammatory responses by surfactin, a selective inhibitor of platelet cytosolic phospholipase A2. *Biochem Pharmacol* 55:975–985.
- Kiss, A., Balik, O'.G., Csorba, A., Chuluunbaatar, T., Medzihradzsky, K.F., Alföldi, L., 2008. Cloning and characterization of the DNA region responsible for megacin A-216 production in *Bacillus megaterium* 216. *J Bacteriol* 190: 6448–6457.
- Klaenhammer, T.R., 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*, 70, 337-349.
- Klich, M.A., K.S. Arthur., A.R. Lax., J.M. Bland., 1994. Iturine A: a potentiel new fungicide for stores grains. *Mycophatologia*, 127,123-127.
- Klingberg, T.D., Axelsson, L., Naterstad, K., Elsser, D., Budde, B.B., 2005. Identification of potential probiotic starter cultures for Scandinavian-type fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 105:419-431.
- Konz, D., Doekel, S., Marahiel, M.A., 1999. Molecular and biochemical characterization of the protein template controlling biosynthesis of the lipopeptide lichenysin. *Journal of Bacteriology* 181, 133–140.
- Koumoutsi, A., Chen, X.H., Henne, A., Liesegang, H., Hitzeroth, G., Franke, P., Vater, J., Borriss, R., 2004. Structural and functional characterization of gene clusters directing non-ribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42. *J Bacteriol* 186, 1084–1096.
- Kracht, M., Rokos, H., Ozel, M., Kowall, M., Pauli, G., Vater, J., 1999. Antiviral and hemolytic activities of surfactin isoforms and their methyl ester derivatives. *J Antibiot (Tokyo)* 52:613–619.
- Lagrange, P., Reinert, P., 1987. L'antibiothérapie en pratique quotidienne. Centre de documentation des laboratoires Bristol, 64.
- Laokole, J., 1994. Contribution à l'étude biochimique et microbiologique du soubala. Mémoire de D.E.A en microbiologie appliquée, FAST, Université de Ouagadougou, 77 p.
- Lazos, E.S., Tsaknis, J., Lalas, S., 1998. Characteristics and composition of tomato seed oil, *Grasas Aceites* 49: 440–445.

- Leclère, V., Béchet, M., Adam, A., Guez, J.S., Wathelet, B., Ongena, M., Thonart, P., Gancel, F., Chollet-Imbert, M., Jacques, P., 2005. Mycosubtilin overproduction by *Bacillus subtilis* BBG100 enhances the organism's antagonistic and biocontrol activities. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:4577–4584.
- Le Marrec, C., Hyronimus, B., Bressollier, P., Verneuil, B., Urdaci, M.C., 2000. Biochemical and genetic characterization of coagulin, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins, produced by *Bacillus coagulans* I (4). *Appl Environ Microbiol.* 66: 5213-5220.
- Le Minor, L., Veron, M., 1989. *Bactériologie Médicale* Flammarion : 1107 p.
- Lee, H., Churey, J.J., Worobo, R.W., 2009. Biosynthesis and transcriptional analysis of thurincin H, a tandem repeated bacteriocin genetic locus, produced by *Bacillus thuringiensis* SF361. *Federation of European Microbiological Societies (FEMS) Microbiology Letters*, 299: 205–213.
- Leger, C.L., 2000. La vitamine E: état actuel des connaissances, rôle dans la préventioncardiovascular, biodisponibilité. *OCL.*, 7 (3), 258-265.
- Lei, J., Yu, J., Yu, H., Liao, Z., 2007. Composition, cytotoxicity and antimicrobial activity of essential oil from *Dictamnus dasycarpus*. *Food Chemistry*.
- Lindegaard Pedersen, L., Owusu-Kwarteng, J., Thorsen, L., Jespersen, L., 2012. Biodiversity and probiotic potential of yeasts isolated from *Fura*, a West african spontaneously fermented cereal. *International Journal of Food Microbiology* 159, 144-151.
- Lisboa, M.P., Bonatto, D., Bizani, D., Henriques, J.A.P. and Brandelli, A. 2006 Characterization of a bacteriocin-like substance produced by *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from the Brazilian Atlantic forest. *Int Microbiol* 9, 111-118.
- Lozniewski, A., Rabaud, C., Nancy., 2010. Résistance bactérienne aux antibiotiques. Fiches conseils pour la prévention du risque infectieux – Infections associées aux soins. CCLIN Sud-Est.
- Luna, V.A., King, D.S., Gullledge, J., Cannons, A.C., Amuso, P.T., Cattani, J., 2007. Susceptibility of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides* and *Bacillus thuringiensis* to 24 antimicrobials using Sensititre® automated microbroth dilution and Etest® agar gradient diffusion methods. *J Ant Chem.* 60: 555-567.

- Lund, T., De Buyser, M.L., Granum, P.E., 2000. A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. *Molecular Microbiology*, 38:254-61.
- Marchadier, E., 2009. Etude fonctionnelle d'un centre d'interactions protéiques chez *Bacillus subtilis* par une approche intégrée. Thèse de Doctorat de l'Université Paris XI, UFR Scientifique D'Orsay. 203p.
- Madhaiyan, M., Poonguzhali, S., Kwon, S., Sa, T., 2010. *Bacillus methylotrophicus* sp. Nov., a methanol-utilizing, plant-growth-promoting bacterium isolated from rhizosphere soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60, 2490-2495.
- Maget-Dana, R., Thimon, L., Peypoux, F., Ptak, M., 1992. Surfactin/iturin A interactions may explain the synergistic effect of surfactin on the biological properties of iturin A. *Bioch* 74, 1047–1051.
- Martin-Cabrejas, M.A. et al., 1999. Modifications to physicochemical and nutritional properties of hard-to-cook beans (*Phaseolus vulgaris* L.) by extrusion cooking. *J.Agric. Food. Chem.*, 47: 1174-1182.
- Martinez Viedma, P., Sobrino Lopez, A., Ben Omar, N., Abriouel, H., Lucas Lopez, R., Valdivia, E., Martin Belloso, O., Galvez, A., 2008. Enhanced bactericidal effect of enterocin AS-48 in combination with high-intensity pulsed-electric field treatment against *Salmonella enterica* in apple juice. *Int J Food Microbiol.*128: 244-249.
- Marx, R., Stein, T., Entian, K-D., Glaser, S.J., 2001. Structure of the *Bacillus subtilis* peptide antibiotic subtilosin A determined by ¹H-NMR and matrix assisted laser desorption/ ionization time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Protein Chemistry*, 20:501-506.
- Mazza, G., Miniati, E., 2000. Anthocyanin in fruits, vegetables and grains, CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- McAuliffe, O., Ross, R.P., Hill, C., 2001. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *Federation of European Microbiological Societies (FEMS) Microbiology Reviews* 25, 285-308.
- McClintock, N.C., El Tahir, I.M., 2004. *Hibiscus sabdariffa* L., in: Grubben G.J.H., Denton, O.A. (Ed.), *PROTA 2 (Plant Resources of Tropical Africa): vegetables*, PROTA, Wageningen., Netherlands.
- McClintock, N.C., 2004. L'Oseille au Sénégal et au Mali. *AGRIDAPE*, Volume 20-1-Valorisation de la diversité culturelle. Pays Bas.

- Menkhaus, M., Ullrich, C., Kluge, B., Vater, J., Vollenbroich, D., Kamp, R.M., 1993. Structural and functional organization of the surfactin synthetase multienzyme system. *Journal of Biological Chemistry* 268, 7678–7684.
- Ministère de l'Economie et des Finances (MEF)., 2011. Guide d'intégration de l'environnement et des liens Pauvreté-Environnement lors de l'élaboration des politiques sectorielles au Burkina Faso, 47 p.
- Mizumoto, S., Hirai, M., Shoda, M., 2007. Enhanced iturin A production by *Bacillus subtilis* and its effect on suppression of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*. *Appl Microbiol Biotechnol* 75:1267–1274.
- Mohamadou, B., Mbofung, C.M., Thouvenot, D., 2008. Bacterial fermentation induced mineral dynamics during the production of Mbuja from *Hibiscus sabdariffa* seeds in earthen-ware pots. *Annals of Microbiology* 58, 447 – 451.
- Mohamadou, B.A., Mbofung, C.M.F, Thouvenot, D., 2007. Functional potential of a product from traditional biotechnology antioxidant and probiotic potential of *Mbuja*, produced by fermentation of *Hibiscus sabdariffa* seeds in Cameroon. *Journal of Food Technology* 5, 164-168.
- Mohamed, R., Fernandez, J., Pineda, M., Aguilar, M., 2007. Roselle (*Hibiscus sabdariffa*) seed oil is a rich source of γ -tocopherol. *J. Food Sci.* 72 (3), 207–211.
- Motarjemi, Y., 2002. Impact of small scale fermentation technology on food safety in developing countries. *International Journal of Food Microbiology* 75, 213-229.
- Moreno M.R.F., Rea M.C., Cogam T.M. and de Vuyst L. (2002). Applicability of a bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* as a co-culture in Cheddar cheese manufacture. *International Journal of Food Microbiology*, 81:73-84.
- Morton, J., 1987. Roselle. In: *Fruits of warm climates*. P. 281-286.
- Motta, A.S., Lorenzini, D.M., Brandelli, A., 2007a. Purification and Partial Characterization of an Antimicrobial Peptide Produced by a Novel *Bacillus* sp. Isolated from the Amazon Basin. *Current Microbiology* 54, 282-286.
- Motta, A.S., Cannavan, F.S., Tsai, S., Brandelli, A., 2007b. Characterization of a broad range antibacterial substance from a new *Bacillus* species isolated from Amazon basin. *Archives of Microbiology* 188, 367–375.
- Motta, A.S., Brandelli, A., 2002. Characterization of an antibacterial peptide produced by *Brevibacterium linens*. *Journal of Applied Microbiology*, 92:63–71.

- Mota-Meira, M., LaPointe, G., Lacroix, C., Lavoie, M.C., 2000. MICs of mutacin BNy266, nisin A, vancomycin, and oxacillin against bacterial pathogens. *Antimicrob Agents Chemother.* 44: 24-29.
- Mounigan, P., Badrie, N., 2007. Physicochemical and sensory quality of wines from red sorrel/ roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) calyces: effects of pretreatments of pectolase and temperature/time, *Int. J. Food Sci. Technol.* 42 469–475.
- Nacoulma-Ouédraogo., 1996. Plantes médicinales et pratiques traditionnelles au Burkina Faso. Cas du plateau central. Thèse de Doctorat d'Etat, Tome II. Université de Ouagadougou, FAST, pp 288-293.
- Nakano, M.M., Zheng, G., Zuber, P., 2000. Dual control of *Sbo-alb* operon expression by the Spo0 and ResDE systems of signal transduction under anaerobic conditions in *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology*, 182:3274–3277.
- Nanama, S., Okezie, O., Traore, A.S., 1999. Etude comparée de la rétention de lysine, du développement d'acidité grasse et du rancissement oxydatif dans des farines infantiles conditionnées dans trois types de matériaux. Comm. Int. Workshop: Small scale food industry for a healthy nutrition in West Africa, 22-24 Nov. Ouagadougou, Burkina Faso.
- Nanama, S., 1998. Contribution à l'étude des farines infantiles au Burkina Faso : Thèse de Doctorat 3eme cycle, Université de Ouagadougou, FAST, 124p;
- Nascimento, M.S., Moreno, I., Kuaye, A.Y., 2010. Antimicrobial activity of *Enterococcus faecium* fair-e 198 against Gram-positive pathogens. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41:74-81.
- Ndir, B., Gningue, R.D., Keita, N.G., Souane, M., Laurent, L., Cornelius, C., Thonart, P., 1997. Microbiological and organoleptic characteristics of commercial *netetu*. *Cahiers d'étude et de recherche francophones / Agricultures*, 6: 299–304.
- Ndir, B., Hbid, C., Cornelius, C., Roblain, D., Jacques, P., Vanhentenryck, F., Diop, M., Thonart, P., 1994. Propriétés antifongiques de la microflore sporulée du *netétu*. *Cahiers Agricultures*, 3: 23–30.
- Nielsen, D.S., Teniola, O.D., Ban-Koffi, L., Owusu, M., Andersson, T.S. and Holzapfel, W.H., 2007. The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations analysed using culture-dependent and culture-independent methods. *International Journal of Food Microbiology* 114, 168- 186.

- Niu, W.W., Neu, H.C., 1991. Activity of mersacidin, a novel peptide, compared with that of vancomycin, teicoplanin, and daptomycin. *Antimicrob Agents Chemother.*35: 998-1000.
- Nout, M.J.R., Beernink, G., Bonantsvanlaarhoven, T.M.G., 1987. Growth of *Bacillus cereus* in soyabean tempeh. *International Journal of Food Microbiology*, 4: 293– 301.
- Odunfa, S.A., Oyewole, O.B., 1998. African fermented foods. In *Microbiology of Fermented Foods* ed. Wood, London B.J.B., 713-752.
- Odunfa, S.A., Adewuyi, E.Y., 1985. Optimization of process conditions for the fermentation of African Locust bean (*Parkia biglobosa*): effect of time, temperature and humidity. *Food Chemistry Microbiology Technology*, 9: 6– 10.
- Odunfa, S.A., 1985. Biochemical changes during “iru” fermentation. *Journal of Food Technology*, 20:295-303.
- Odunfa, S.A., 1981. Micro-organisms associated with the fermentation of African locust bean *Parkia filicoidea*, during ‘iru’ fermentation. *Journal of Plant Foods*3, 245–250.
- Oguntoyinbo, F.A., Sanni, A.I., Franz, C.M.A.P., Holzapfel, W.H., 2007. In vitro fermentation studies for selection and evaluation of *Bacillus* strains as starter cultures for the production of *okpehe*, a traditional African fermented condiment. *International Journal of Food Microbiology*, 113:208–218.
- O’Hagan, D., 1995. Biosynthesis of fatty acid and polyketide metabolites. *Nat Prod Rep* 12, 1-32.
- Omafuvbe, B.O., Shonukan, O.O. and Abiose, S.H. (2000). Microbiological and biochemical changes in the traditional fermentation of soybean for ‘soy-daddawa’ - Nigerian food condiment. *Food Microbiology* 17, 469–474.
- Omobuwajo, T.O., Sanni, L.A., Balami, Y.A., 2000. Physical properties of sorrel (*Hibiscus sabdariffa*) seeds, *J.Food Eng.*45 37-47.
- Ongena, M., Jacques, P., 2008. *Bacillus* lipopeptides: Versatile weapons for plant disease control. *Trends Microbiol.* 16:115-125.
- Ortwin S and Igbasan F., 2002. In vitro properties of phytases from various microbial origins. *Int. J. Food Sci. Tech.* 37:813-822

- Oscariz, J.C., Pisabarro, A.G., 2000. Characterisation and mechanism of action of cerein 7, a bacteriocin produced by *Bacillus cereus* Bc7. *Journal of Applied Microbiology*, 89: 1–10.
- Ouoba, L.I.I., Parkouda, C., Diawara, B., Scotti, C., Varnam, A.H., 2008. Identification of *Bacillus* spp from *Bikalga*, fermented seeds of *Hibiscus sabdariffa*: phenotypic and genotypic characterization, *Journal of Applied Microbiology* 104, 122-131.
- Ouoba, L.I.I., Diawara, B., Jespersen, L., Jakobsen, M., 2007. Antimicrobial activity of *Bacillus subtilis* and *Bacillus pumilus* during the fermentation of African locust bean (*Parkia biglobosa*) for Soumbala production. *Journal of Applied Microbiology*, 102:963-970.
- Ouoba, L.I.I., Diawara, B., Amoa-Awua, W.K., Traore, A.S., Moller, P.L., 2004. Genotyping of starter cultures of *Bacillus subtilis* and *Bacillus pumilus* for fermentation of African locust bean *Parkia biglobosa*, to produce *soumbala*. *International Journal of Food Microbiology*, 90:197–205.
- Ouoba, L.I.I., (2003). Caractérisation génotypique, biochimique et activité antimicrobienne de *Bacillus* spp. en vue de la mise au point de starters pour la production contrôlée du *Soumbala*. *Memoire de doctorat, UFR-SVT, Université de Ouagadougou*, 124 p.
- Paik, S.H., Chakicherla, A., Hansen, J.N., 1998. Identification and characterization of structural and transporter genes for, and the chemical and biological properties of, Sublancin 168, a novel lantibiotic produced by *Bacillus subtilis* 168. *Journal of Biological Chemistry*, 273:134–23 142.
- Palé, É., Kouda-Bonafos, M., Nacro, M., 2004. Caractérisation et mesure des activités anti radicalaires d'anthocyanes de plantes du Burkina Faso, *C. R. Chimie* 7 973– 980.
- Park, S.Y., Kim, Y., 2009. Surfactin inhibits immunostimulatory function of macrophages through blocking NK-kB, MAPK and Akt pathway. *Int Immunopharmacol* 9:886–893.
- Parkouda, C., Thorsen, L., Compaoré, C.S., Nielsen, D.S., Tano-Debrah, K., Jensen, J.S., Diawara, B., Jakobsen, M., 2010. Microorganisms associated with *maari*, a baobab seed fermented product. *International Journal of Food Microbiology*, 142:292–301.

- Parkouda, C., Diawara, B., Ouoba, L.I.I., 2008. Technology and physico-chemical characteristics of *bikalga*, an alkaline fermented seeds of *Hibiscus sabdariffa*. *African Journal of Biotechnology*, 7: 916–922.
- Patel, P.S., Hang, S., Fisher, S. Pirnik, D., Aklonis, C., Dean, L., Meyers, E., Fernandes, P. And Mayerl, F., 1995. Bacillaene, a Novel Inhibitor of Prokaryotic Protein Synthesis Produced by *Bacillus subtilis*: Production, Taxonomy, Isolation, Physico-Chemical Characterization and Biological Activity. *The Journal of Antibiotics* 48, 997-1003.
- Pattnaik, P., Kaushik, J.K., Grover, S., Batish, V.K., 2001. Purification and characterization of a bacteriocin-like compound (lichenin) produced anaerobically by *Bacillus licheniformis* isolated from water buffalo. *J Appl Microbiol* 91: 636–645.
- Peypoux, F., Bonmatin, J.M., Wallach, J., 1999. Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Appl Microbiol Biotechnol* 51:553–563.
- Peypoux, F., Pommier, M.T., Marion, D., Ptak, M., Das, B.C., Michel, G., 1986. Revised structure of mycosubtilin, a peptidolipid antibiotic from *Bacillus subtilis*. *J Antibiot (Tokyo)* 39:636–641.
- Peypoux, F., 1978. Structure of iturine A, a peptidolipid antibiotic from *Bacillus subtilis*. *Biochemistry* 17:3992–3996.
- Pilosof, A.M.R., Bartholomai, G.B., Chirife, J., Boquet, R., 1982. Effect of heat treatment on sorption isotherms and solubility of flour and protein isolated from bean (*Phaseolus vulgaris*). *J. Food Sci.* 47: 1288.
- Pu, R., 1996. Nutrient composition and biological evaluation of Mesta (*Hibiscus sabdariffa*) seeds. *Plant Foods Hum. Nutr.*, 49:27-34.
- Rabaud, C., May, T., 2000. Acide fusidique. *Encycl Méd Chir, Maladies infectieuses*, 8-004-J-20, 3 p.
- Rabaud, C., May, T., 2007. Glycopeptides. *Encycl Méd Chir, Maladies infectieuses*, 8-004-L-10, 7 p.
- Razafindralambo, H., Paquot, M., Baniel, A., Popineau, Y., Hbid, C., Jacques, P., Thonart, P., 1996. Foaming properties of surfactin, a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis*. *J Am Oil Chem Soc* 73:149–151.
- Riley, M.A., Wertz, J.E., 2002. Bacteriocin diversity: ecological role of bacteriocins in bacterial competition. *Trends in Microbiology*, 7: 129-133.

- Robertson, A., Tirado, C., Lobstein, T., Jermini, M., Knai, C., Jensen, J.H., Ferro-Luzzi, A., James, W.P., 2004. Food and health in Europe: a new basis for action. *WHO Reg Publ Eur Ser.* i-xvi, 1-385, back cover.
- Rodríguez, J.M., Martínez, M., IKok, J., 2002. Pediocin PA-1, a wide-spectrum bacteriocin from lactic acid bacteria. *Crit Rev Food Sci Nutr.*42: 91-121.
- Romero, D., De Vicente, A., Rakotoaly, R.H., Dufour, S.E., Veening, J.W., Arrebola, E., Cazorla, F.M., Kuipers, O.P., Paquot, M., Perez-Garcia, A., 2007. The iturin and fungycin families of lipopeptides are keys factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podosphaera fusca*. *Mol. Plant Pathogen Interact.* 20:430-440.
- Rückert, C., Blom, J., Chen, X-H., Reva, O., Borriss, R., 2011. Genome sequence of *B.amyloliquefaciens* type strain DSM7T reveals differences to plant-associated *B. amyloliquefaciens* FZB42. *J Biotechnol* 155, 78– 85.
- Sander, M.E., Morelli, L., Tompkin, S., 2003. Spore formers as human probiotics: *Bacillus*, *Sporobacillus*, and *Brevibacillus*. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2:101-110.
- Sanni, A.I., Ayernor, G.S., Sakyi-Dawson, E., Sefa-Dedeh, S., 2000. Aerobic spore-forming bacteria and chemical composition of some Nigerian fermented soup condiments. *Plant Foods for Human Nutrition* 55, 111–118.
- Sanni, A.I., 1993. The needs of optimization of African fermented foods and beverages. *International Journal of Food Microbiology*, 18: 85-95.
- Sanni, A.I., Ogbonna, D.N., 1991. The production of owoh - A Nigerian fermented seasoning agent from cotton seed *Gossypium Hirsutum* L. *Food Microbiol* 8: 223–29.
- Sarangi, N.P., Athukorala, W.G., Dilantha, F., Khalid, Y.R., 2009. Identification of antifungal antibiotics of *Bacillus* species isolated from different microhabitats using polymerase chain reaction and MALDI-TOF mass spectrometry. *Canadian Journal of Microbiology* 55, 1021-1032.
- Sarkar, P.K., Hasenack, B., Nout, M.J.R., 2002. Diversity and functionality of *Bacillus* and related genera isolated from spontaneously fermented soybeans Indian kinema and locust beans African Soumbala. *International Journal of Food Microbiology*, 77: 175–186.
- Sarni-Manchad, P., Cheynier, V., 2006. Les polyphénols en agroalimentaire, Éd Tec & Doc., Coll. Sci. & Techn. Agroaliment., Lavoisier, Paris, 398 p.

- Satomi, M., La Duc, T.M., Venkateswaran, K., 2006. *Bacillus safensis* sp. Nov., isolated from spacecraft and assembly-facility surfaces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56, 1735-1740.
- Savadogo, A., Tapi, A., Chollet, M., Wathelet, B., Traoré, A.S., 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. *International Journal of Food Microbiology* 151, 299–306.
- Sawadogo, L., 1998. Etude des souches microbiennes du *Soumbala* productrices de lipopeptides. Mémoire de Diplôme d'Etude Spécialisées en Gestion des Biotechnologies, Faculté universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux, Centre Wallon de Biologie Industrielle, Belgique, 79p.
- Sena, L.P., Vanderjagt, D.J., Rivera, C., Tsin, A.T.C., Muhamadou, O., Millson, M., 1998. Analysis of nutritional components of eight famine foods of the Republic of Niger. *Plant Foods Hum. Nut.* 52, 17-30.
- Shen, B., 2003. Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms. *Curr Op Chem Biol* 7, 285-295.
- Simpson, T.J., 1995. Polyketide biosynthesis. *Chem Ind* 407-411.
- Sorokulova, I.B., Pinchuk, I.V., Denayrolles, M., Osipova, I.G., Huang, J.M., Cutting, S.M., Urdaci, M.C., 2008. The safety of two *Bacillus* probiotic strains for human use. *Digestive Diseases Sci.* 53: 954-963.
- Stachelhaus, T., Mootz, H.D., Marahiel, M.A., 2002. Nonribosomal assembly of peptide antibiotics on modular protein templates. Pages 415-435. In: *Bacillus subtilis and Its Closest Relatives: From Genes to Cells*. A. L. Sonenshein, J. A. Hoch, and R. Losick, eds. American Society for Microbiology Press, Washington, D.C., U.S.A.
- Stenfors, A.L.P., Fagerlund, A., Granum, P.E., 2008. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiology Review* 32, 579-606.
- Stenfors, L.P., Granum, P.E., 2001. Psychrotolerant species from the *Bacillus cereus* group are not necessarily *Bacillus weihenstephanensis*. *FEMS Microbiology Letters*, 197:223-228.
- Stein, T., 2008. Whole-cell matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry for rapid identification of bacteriocin/lantibiotic-producing bacteria. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 22:1146-1152.

- Stein, T., 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology* 56, 845–857.
- Stein, T., Düsterhus, S., Stroh, A., Entian, K.D., 2004. Subtilosin production by two *Bacillus subtilis* subspecies and variance of the sbo-alb cluster. *Applied and Environmental Microbiology*, 70:2349–2353.
- Stein, T., Borchert, S., Conrad, B., Feesche, J., Hofemeister, B., Hofemeister, J., Entian, K.D., 2002. Two different lantibiotic-like peptides originate from the ericin gene cluster of *Bacillus subtilis* A 1/3. *Journal of Bacteriology*, 184:1703-1711.
- Steinkraus, K.H., 1996. *Handbook of Indigenous Fermented Foods*, Second Edition, Revised and Expanded, Marcel Decker, New York.
- Streinkraus, K.H., Cullen, R.E., Pederson, C.S., Nellis, L.F. 1986. *Handbook of indigenous fermented foods*. New York: M. Dekker Inc.
- Sumi, H., Sasaki, T., Yatagai, C., Kozaki, Y., 2000. Determination and properties of the fibrinolysis accelerating substance (FAS) in Japanese fermented soybean *Natto*. *Nippon No-gi Kagakukaishi* 74, 1259–1264.
- Sun, L., Lu, Z., Bie, X., Lu, F., Yang, S., 2006. Isolation and Characterization of a co-producer of fengycins and surfactins, endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* ES-2, from *Scutellariabaicalensis Georgi*. *World J Microbiol Biotechnol*, 22: 1259-1266.
- Sutyak, K.E., Wirawan, R.E., Aroutcheva, A.A., Chikindas, M.L., 2008. Isolation of the *Bacillus subtilis* antimicrobial peptide subtilosin from the dairy product-derived *Bacillus amyloliquefaciens*. *Journal of Applied Microbiology*, 104:1067–1074.
- Tabbene, O., Slimene, B.I., Djebali, K., Mangoni, A-L., Urdaci, M-C., Limam, F., 2009. Optimization of Medium Composition for the Production of Antimicrobial Activity by *Bacillus subtilis* B38. *Biotechnology Program* 25, 1267-1274.
- Tapi, A., Chollet-Imbert, M., Scherens, B., Jacques, P., 2010. New approach for the detection of non-ribosomal peptide synthetase genes in *Bacillus* strains by polymerase chain reaction. *Appl Microbiol Biotechnol* 85, 1521-1531.
- The Merk Index, 1996. *Encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals*. 12th Ed. Merk & Co., Inc. Whitehouse Station, NJ.

- Thimon, L., F, Peypou., R, Maget-Danat., B,Roux., G, Michel., 1992. Interaction of bioactive lipopeptides, iturin A and surfactin from *Bacillus subtilis*, *Biotech. Appl.Biochem.*, 16:144-151.
- Thomas, L.V., Clarkson, M.R., Delves-Broughton, J., 2000. Nisin. In: Naidu, A. S.(Eds). *Natural Food Antimicrobial Systems*. CRC-Press. F. L. pp 463-524.
- Thonart, P., Heuzé, V., Destain, J., Meurise, E., Jacques, P., Lepoivre, P., Razafindralambo, H., Paquot, M., 1994. *Bacillus subtilis* as a biopesticide : biochemical and technological aspects; Proceeding of the 6th European Congress on Biotechnology,1075-1079.
- Thorsen, L., Azokpota, P., Hansen, B.M., Hounhouigan, D.J., Jakobsen, M., 2010. Identification, genetic diversity and cereulide producing ability of *Bacillus cereus* group strains isolated from Beninese traditional fermented food condiments. *International Journal of Food Microbiology*, 142:247-250.
- Tosato, V., Albertini, A.M., Zotti, M., Sonda, S., Bruschi, C.V., 1997. Sequence completion, identification and definition of the fengycin operon in *Bacillus subtilis* 168. *Microbiology* 143, 3443–3450.
- Trischman, J.A., Jensen, P.R., Fenical, W., 1994. Halobacillin: a cytotoxic cyclic acylpeptide of the iturin class produced by a marine *Bacillus*. *Tetrahedron Lett* 35:5571–5574.
- Tsai, P.J.,1995. Studies on the color deterioration of Roselle during post-harvest handling, drying and storage, *Natl. Chung Hsing Univ.*, Ph. D diss., Taiwan.
- Tsuge, K., Akiyama, T., Shoda, M., 2001. Cloning, sequencing, and characterization of the iturin A operon. *Journal of Bacteriology* 183, 6265-6273.
- Turnbull, P.C., Kramer, J.M., Jorgensen, K., Gilbert, R.J., Melling, J., 1979. Properties and production characteristics of vomiting, diarrheal, and necrotizing toxins of *Bacillus cereus*. *American Journal of Clinical Nutrition*, 32:219-228.
- Uwaegbute, A.C., 1996. African Locust Beans In: *Food from Legumes and Oil seeds*. (E. Nwok3la and J.A. Smart, eds). Chapman and Hall, London. p.124-129.
- Vanittanakom, N., Loeffler, W., Koch, U., Jung, G., 1986. Fengycin – a novel antifungal lipopeptide antibiotic produced by *Bacillus subtilis* F-29–3. *J Antibiot (Tokyo)* 39:888–901.
- Vater, J., 1986. Lipopeptides, an attractive class of microbiologic surfactants; *Progr.Colloid.Polymer.Sci.*72 12-18.

- Vining, L. C., 1990. Function of secondary metabolites. *Annu Rev Microbiol* 44, 395-427.
- Wang, L.T., Lee, F.L., Tai, C.J., Kasai, H., 2007. Comparison of *gyrB* gene sequences, 16S rRNA gene sequences and DNA-DNA hybridization in the *Bacillus subtilis* group. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57, 1846-1850.
- Wang, C.J., Wang, J.M., Lin, W.L., Chu, C.Y., Chou, F.P., Tseng, T.H., 2000. Protective effect of *Hibiscus* anthocyanins against tert-butyl hydroperoxide-induced hepatic toxicity in rats. *Food Chem. Toxicol.* 38, 411-416.
- Wang, J., Fung, D.Y.C., 1996. Alkaline-fermented foods: A review with emphasis on *pidan* fermentation. *Critical Review in Microbiology* 22, 101-138.
- Wong, P.K., Yusof, S., Ghazali, H.M., Che Man, Y.B., 2002. Physicochemical characteristics of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.), *Nutr. Food Sci.* 32, 68–73.
- Xie, J., Zhang, R., Shang, C., Guo, Y., 2009. Isolation and characterization of a bacteriocin produced by an isolated *Bacillus subtilis* LFB112 that exhibits antimicrobial activity against domestic animal pathogens. *African Journal of Biotechnology*, 8:5611-5619.
- Yagoub, A.A., Mohammed, A.M., 2008. *Furundu*, a meat substitute from fermented roselle (*Hibiscuss sabdariffa* L) seed: Investigation on amino acids composition, protein fractions, minerals content and HCl-extractability and microbial growth. *Pakistan Journal of Nutrition.* 7, 352–358.
- Yagoub, A.A., Mohamed, E.B., Ahmed, A.H.R., El Tinay, A.E., 2004. Study on furundu, a traditional Sudanese fermented roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) seed: effect on *in vitro* protein digestibility, chemical composition, and functional properties of the total proteins, *J. Agric. Food Chem.* 52, 6143–6150.
- Yala, D., Merad, A.S., Mohamedi, D., Ouar–korichi, M.N., 2001. *Médecine du Maghreb*, n°91, p5-12.
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., Madden, T., 2012. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics.* 13:134.
- Yoshida, S., Hidarate, S., Tsukamoto, T., Hatakeda, K., Shirata, A., 2001. Antimicrobial activity of culture filtrate of *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2 isolated from mulberry leaves. *Phytopathology* 91: 181-187.

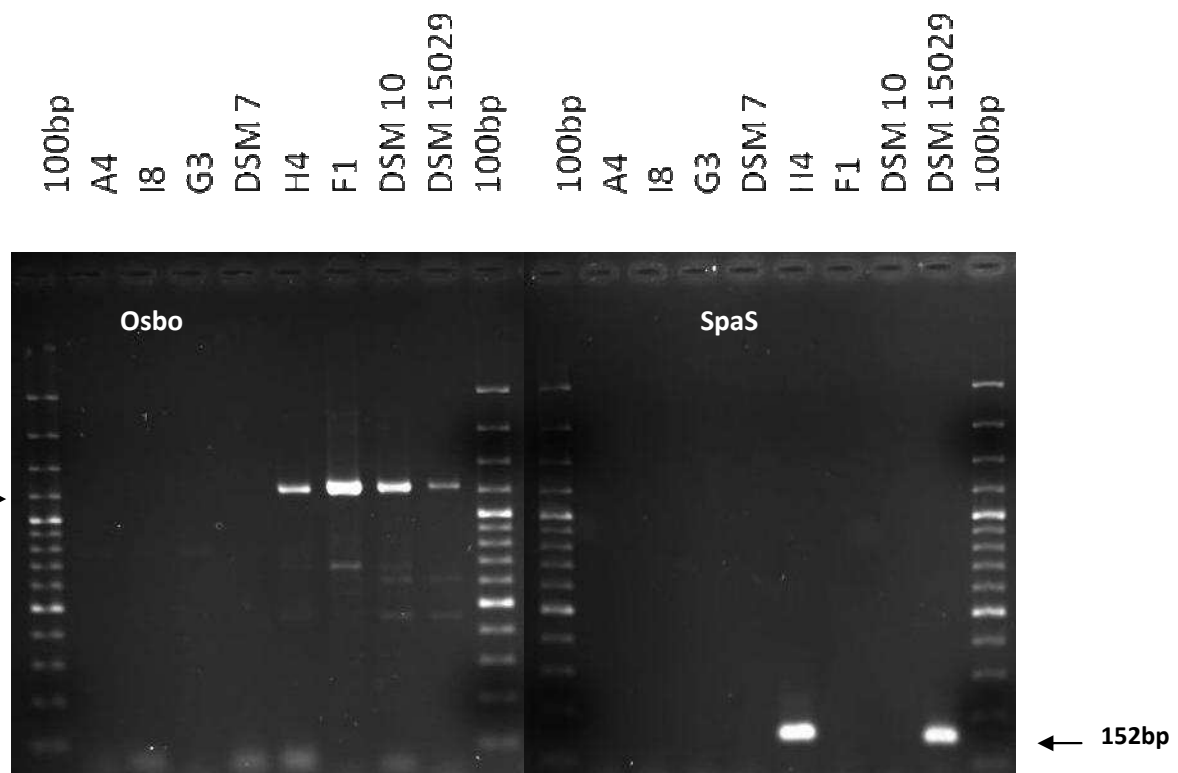
- Yu, G.Y., Sinclair, J.B., Hartman, G.L., Bertagnolli, B.L., 2002. Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. Soil Biol. Biochem. 34:955-963.
- Zheng, G.L., Yan, L.Z., Vederas, J.C., Zuber, P., 1999. Genes of the sbo-alb locus of *Bacillus subtilis* are required for production of the antilisterial bacteriocin subtilosin. Journal of Bacteriology, 181:7346-7355.
- Zimmerman, S.B., Schwartz, C.D., Monaghan, R.L., Pelak, B.A., Weissberger, B., Gilfillan, E.C., Mochales, S., Hernandez, S., Currie, S.A., Tejera, E. and Stapley, E.O., 1986. Difficidin and Oxydifficidin: Novel Broad Spectrum Antibacterial Antibiotics Produced by *Bacillus Subtilis*. I. Production, Taxonomy and Antibacterial Activity. The Journal of Antibiotics 12, 1677-1681.

ANNEXES

Annexe 1

Electrophorèse sur gel d'agarose (1,5%) des produits PCR pour la détection des gènes codant pour la synthèse de la subtilosine (Amorce Osbo) et de la subtiline (Amorce SpaS) dans le génome des souches A4, I8, G3 et H4.

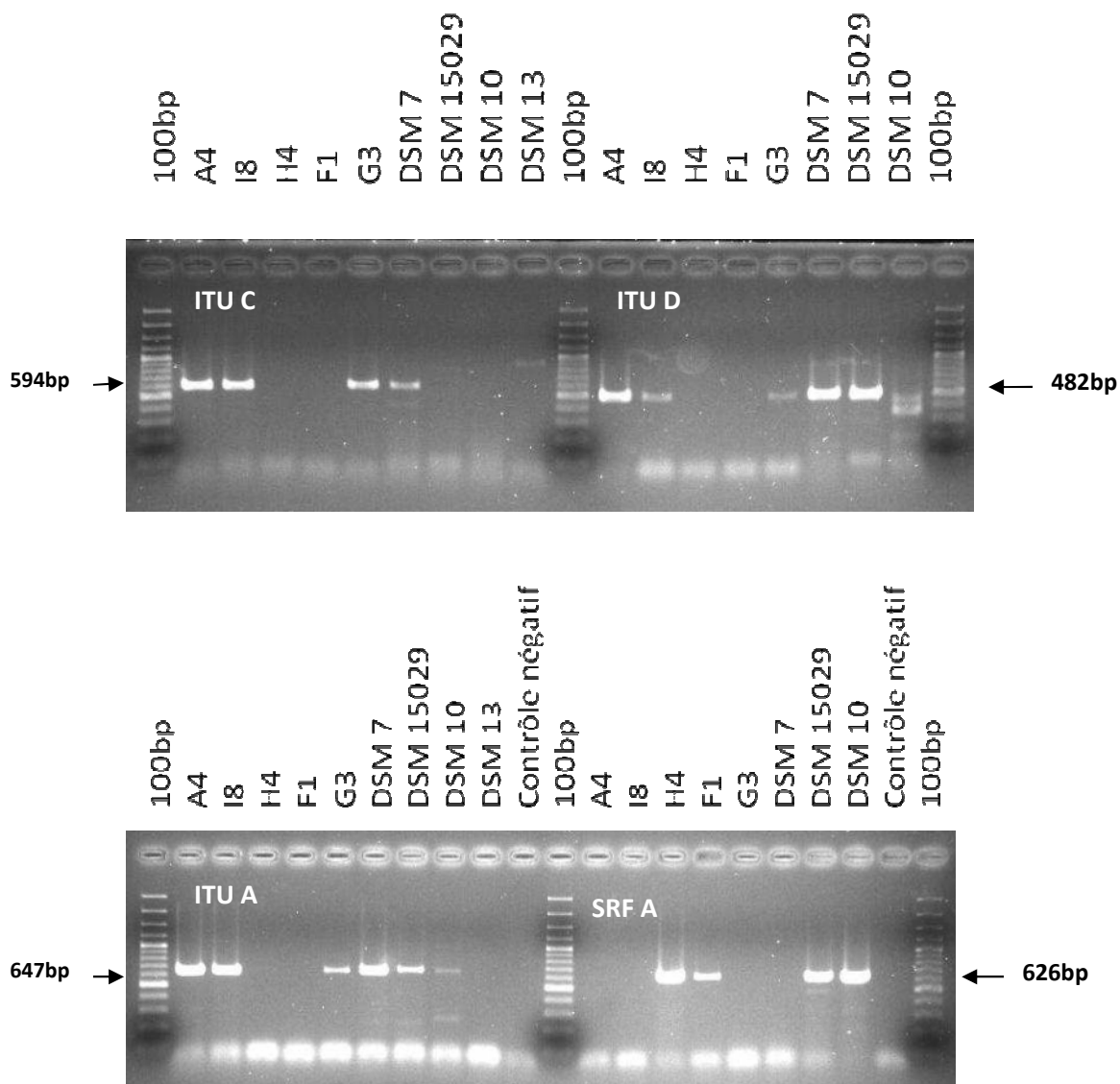
DSM 7 : souche de référence *B. amyloliquefaciens* DSM 7 ; DSM 10= souche de référence *B. subtilis* subsp. *subtilis* DSM 10 ; DSM 15029= souche de référence *B. subtilis* ssp. *spizizenii* DSM 15029.



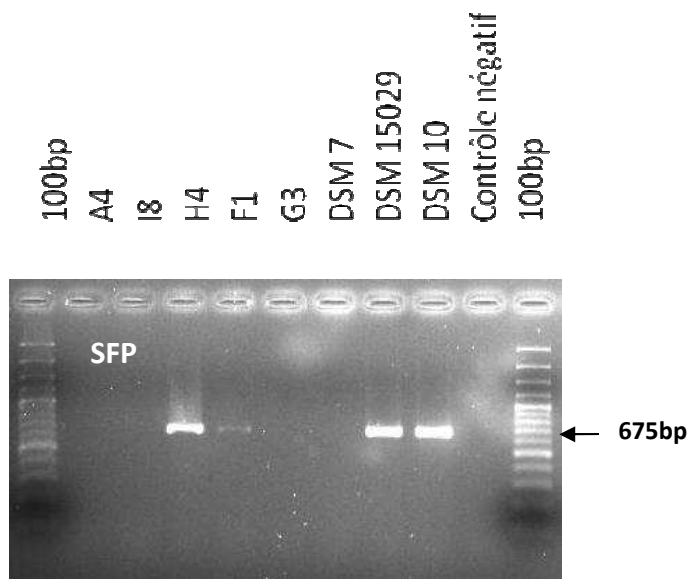
Annexe 2

Electrophorèse sur gel d'agarose (1,5%) des produits PCR pour la détection des gènes codant pour la synthèse des lipopeptides iturines (amorces ITU C, ITU D, ITU A), et surfactines (amorces SFR et SFP) dans le génome des souches A4, I8, G3 et H4.

DSM 7 : souche de référence *B. amyloliquefaciens* DSM 7 ; DSM 10= souche de référence *B. subtilis* subsp. *subtilis* DSM 10 ; DSM 15029= souche de référence *B. subtilis* ssp. *spizizenii* DSM 15029 ; DSM 13= souche de référence *B. licheniformis* DSM 13.



Annexe 2 suite



Annexe 3 : Posters présentés à des congrès



Université Polytechnique de
Bobo-Dioulasso (UPB)
Burkina Faso



Department of Food
Science
Faculty of Life Sciences
University of
Copenhagen-DK

Broad spectrum antimicrobial activity of small lipophilic compounds produced by *Bacillus amyloliquefaciens* strains isolated from the alkaline fermented food condiment *bikalga*

Clarisse Sidbewendé Compaoré^{1,2,3}, Dennis Sandris Nielsen², Hagrétou Sawadogo-Lingani¹, Torben Sune Berner², Kristian Fog Nielsen⁴, David Bichala Adimpong², Bréhima Diawara¹, Georges Anicet Ouédraogo³, Mogens Jakobsen², Line Thorsen²

¹Département Technologie Alimentaire (DTA / IRSAT / CNRST), Ouagadougou 03 BP 7047, Burkina Faso. ²Department of Food Science, University of Copenhagen, Rolighedsvej 30, 1958 Frederiksberg C, Denmark. ³Institut du Développement Rural/Université Polytechnique de Bobo, BAMSBO, 01 BP 10 91 Bobo-Dioulasso, Burkina-Faso. ⁴DTU Systems Biology, Technical University of Denmark, 2800 Kgs. Lyngby, Denmark. E-mail address: compaclara@yahoo.fr

Introduction

There is an increased interest in searching for bacteria with new antimicrobial properties, that can be used : i) as protective starter cultures for foods; ii) as new probiotics or as producers of alternatives to existing antibiotics; iii) against antibiotic resistant pathogenic bacteria. *Bikalga* is a West African food condiment made from spontaneously fermented seeds of the plant *Hibiscus sabdariffa*. The fermentation is alkaline and dominated by *Bacillus subtilis* group species. Due to the spontaneous nature of the fermentation, some opportunistic human pathogens including *B. cereus*, *Salmonella* spp., *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Micrococcus luteus* are often isolated from the product and might constitute a safety problem for the consumers.

Objectives

- To investigate the antimicrobial activity against various fungi and food borne pathogens of three *B. amyloliquefaciens* (A4, I8, G3) belonging to the predominant *B. subtilis* group spp. isolated from *bikalga*
- To determine the physical and chemical properties of the antimicrobial compounds produced
- To identify these antimicrobial compounds by PCR and UHPLC-HRMS techniques

Materials & methods

- Antimicrobial activity was determined by agar spot assay and agar well diffusion assay against 40 indicator organisms including bacteria and fungi
- Cell-free supernatants of studied isolates were tested for stability to enzymes, heat and pH
- Direct detection of antimicrobial activity was performed on SDS-PAGE gels using TCA precipitated proteins from Cell free supernatants (CFS)
- Ultra High Performance Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry (UHPLC-HRMS) of ethylacetate extract from CFS was conducted on an ultimate 3000 UHPLC system coupled with a maxIS G3 quadrupole time of flight mass spectrometer equipped with an electrospray (ESI) source
- Detection of bacteriocins and lipopeptides synthesis genes was performed by PCR
- Kinetic of antimicrobial substance production was determined in BHI broth at 37°C for 24 h

Results

- All three isolates A4, I8 and G3 exhibited broad spectrum antimicrobial activity against *Penicillium* spp. as well as a wide range of Gram-positive and Gram negative food borne pathogenic bacteria, including *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp., *E. coli*, *Shigella dysenteriae* and *Yersinia enterocolitica*.
- Treatment of cell free supernatants (CFS) to temperatures of 4°C and up to 80 °C, pH 3-11, proteolytic (protease, proteinase K, papain, trypsin) and non-proteolytic (catalase, α -amylase, lipase II) enzymes did not affect the antimicrobial activity against *B. cereus*.
- No antimicrobial activity was observed for proteins > 2.5 kDa precipitated from CFS using trichloroacetic acid, as deduced from SDS page gels overlaid with *Bacillus cereus*
- UHPLC-HRMS analysis of ethyl-acetate extracts with antibacterial activity revealed the presence of the lipopeptides iturins, fengycins and surfactins in addition to some unknown compounds (Fig.1)
- The three strains were PCR negative for genes involved in the synthesis of the *B. subtilis* group related bacteriocins, subtilosin A, subtilin, sublancin and ericin but positive for iturins, surfactins and fengycins synthesis genes (Table 1)
- The antibacterial activity against *B. cereus* in BHI-broth was detected from the middle of the exponential phase, and maximum activity was observed during stationary phase (Fig. 2)

Table 1: PCR detection of bacteriocin and lipopeptide biosynthesis genes from *B. amyloliquefaciens* A4, I8, G3

Bacteriocins/lipopeptides	Genes	PCR product detected
Subtilosin	<i>ywiB</i>	No
	<i>sboA</i>	
	<i>SboX</i>	
	<i>albA</i>	
Subtilin	<i>SpaS</i>	No
Ercin	<i>erC</i>	No
	<i>erSa</i>	
	<i>erSb</i>	
Sublancin	<i>sunT</i>	No
	<i>ituD</i>	Yes
Iturin	<i>ituC</i>	Yes
	<i>ituA</i>	Yes
Surfactin	<i>srfA</i>	No
	<i>SfP</i>	No
	<i>srfIich</i>	Yes
Mycosubtilin /iturin	<i>myc/itu</i>	Yes
	<i>fen</i>	Yes
Flipastatin	<i>pps</i>	Yes

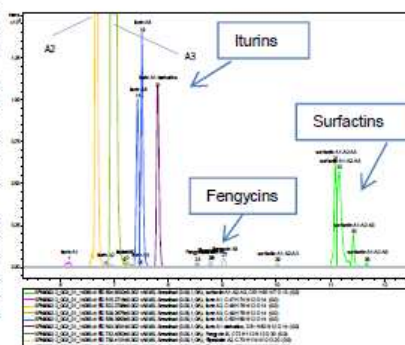


Fig.1 Extracted ion chromatograms of [M+2H]⁺⁺ (\pm 0.005 m/z) of the detected lipopeptides found in the ethyl acetate extract of strain I8.

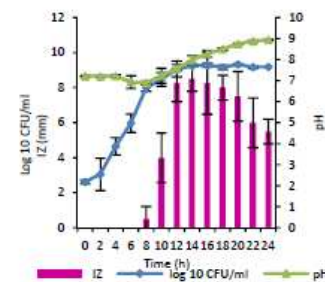


Fig. 2: Production of antimicrobial activity during growth of *B. amyloliquefaciens* I8 in BHI broth at 37°C for 24 h

Conclusion

This study identified *B. amyloliquefaciens* strains isolated from traditional *bikalga* showing significant activity against fungi, Gram-positive and Gram-negative food-borne pathogenic bacteria, and producing a mixture of small lipophilic compounds. The broad spectrum antimicrobial activity may be due to the synergistic effects of the iturins, surfactins and fengycins or possibly due to the non-identified lipophilic compounds. These compounds may represent novel antimicrobial substances with important implication for the bio-control of pathogenic and spoilage microorganisms, and thus for food protection.

Acknowledgement

This work is part of a PhD study supported by DANIDA (Danish International Development Agency). We are grateful to Département Technologie Alimentaire, (DTA/IRSAT/CNRST), University of Bobo-dioulasso and Department of Food Science (University of Copenhagen) for their assistance. We acknowledge to ICFMH for offering the grant to participate to the symposium.

Food Micro 2012 , Istanbul-Turkey 3-7 September

Poster présenté au International Association for Food Protection annual meeting (IAFP 2013), 28-31 July 2013 Charlotte, North Carolina, USA.



Université Polytechnique de Bobo-Dioulasso (UPB) Burkina Faso



Department of Food Science Faculty of Life Sciences University of Copenhagen-Dk

Co-production of Surfactin and a Novel Bacteriocin by *Bacillus subtilis* ssp. *Subtilis* H4 Isolated from Bikalga, an African Alkaline *Hibiscus sabdariffa* Seeds Fermented Condiment

Clarisse S. Compaoré^{1,2,3}, Dennis S. Nielsen², Hagrétou Sawadogo-Lingani¹, Bréhima Diawara¹, Georges A. Ouédraogo³, Mogens Jakobsen², Line Thorsen²

¹DTA/IRSAT/CNRST, Ouagadougou, Burkina Faso. ²Department of Food Science, University of Copenhagen, Denmark. ³Université Polytechnique de Bobo, Bobo-Dioulasso, Burkina-Faso. E-mail address: compaclara@yahoo.fr

Introduction

Bikalga is a fermented food condiment based on the plant *Hibiscus sabdariffa* seeds that serves as a flavoring agent in soups and sauces or as low-cost protein snack in Burkina Faso. The fermentation is alkaline and dominated by *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* and *Bacillus amyloliquefaciens*. Due to the spontaneous nature of the fermentation, some opportunistic human pathogens including *Bacillus cereus*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* are often isolated from the product and might constitute a safety problem for the consumers.

Objectives

- To determine the antimicrobial activity of *B. subtilis* ssp. *subtilis* H4 isolated from Bikalga against various food borne pathogens bacteria.
- To characterize and identify the antimicrobial compounds produced.

Methods

- ◊ Antimicrobial activity was determined by agar well diffusion assay using BHI broth and BHI agar.
- ◊ Antimicrobial substance produced was tested for sensitivity to enzymes, heat, pH and some chemicals.
- ◊ Kinetic of antimicrobial substance production was determined in BHI broth at 37°C for 24 h.
- ◊ Direct detection of antimicrobial activity was performed on SDS-PAGE gels using TCA precipitated proteins and ammonium sulfate precipitated proteins.
- ◊ Detection of bacteriocin and lipopeptide synthesis genes was performed by PCR using specific primers.
- ◊ Antimicrobial compounds were identified by Ultra High Performance Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry (UHPLC-HRMS).

Results

- Cell Free Supernatant (CFS) of *B. subtilis* ssp. *subtilis* H4 was active against Gram-positive pathogenic bacteria including *B. cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus luteus* and *S. aureus*.
- Antimicrobial activity was completely lost with protease, trypsin, α -amylase and lipase II, was sensitive to β -mercaptoethanol but was heat resistant and active at pH 3-10 (Table 1).
- Antimicrobial substance was detected from mid-exponential growth phase with maximum activity obtained at the early stationary growth phase.
- H4 was positive for the genes involved in the biosynthesis of subtilin (*SpaS*), subtilosin (*ywiB*, *sboA*, *sboX*, *albA*), surfactin (*srfA*, *Sfp*, *srfTch*) and lipastatin (*pps*), but negative for the functional genes encoding sublancin, ericin, iturin, fengycin and mycosubtilin.
- Antimicrobial activity of H4 was associated with a single protein band of approximately 4000 Da on the SDS-PAGE gels (Figure 1).
- UHPLC-HRMS analysis of the 4000 Da band however, allowed identification of both the lipopeptide surfactin (approximate size 1000 Da) and a protein with a mono-isotopic mass of 3346.59 Da (Figure 2), which is dissimilar in size to subtilin (3319.56 Da) and subtilosin (3400.57 Da).

Table 1: Effect of enzymes, heat, pH and some chemicals on H4 antimicrobial activity

Treatment	Residual activity %
Enzyme	
Protease	0
Protemase K	100
Papain	90
Trypsin	0
Catalase	100
A-amylase	0
Lipase II	0
Heat	
30°C-100°C/30 min	100
121°C/15 min	95
4°C/30 d	100
-20°C/30 d	100
pH	
3-10	100
11	22.2
Chemicals	
Ethanol	100
Acetone	100
EDTA	100
Trichloroacetic acid	0
β -mercaptoethanol	25.4

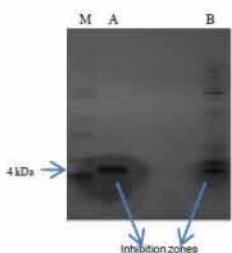


Fig.1: Direct detection of antimicrobial activity against *B. cereus*. M: Mark 12, Novex molecular weight marker; A: proteins precipitated with 20% ammonium sulfate; B: TCA precipitated proteins

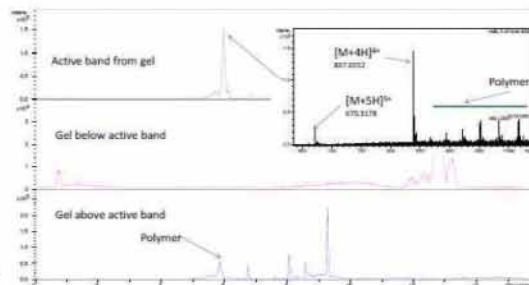


Fig.2: Identification of the protein extracted from the gel. Upper chromatographic trace shows the active band and the two other traces the band just above and below the active band where the small protein peaks is unique. ESI⁺ mass spectrum of the protein is inserted.

Conclusion

This study showed that *B. subtilis* ssp. *subtilis* H4 isolated from Bikalga co-produces in BHI broth the lipopeptide surfactin and a bacteriocin with a mono-isotopic mass of 3346.59 Da. Although subtilin and subtilosin biosynthesis genes were detected in H4 DNA, the molecular mass and the characteristics of this bacteriocin were different from those reported for subtilin and subtilosin. This suggests that H4 in addition to surfactin may produce a novel bacteriocin which may be useful in food industry.

Acknowledgement

