

# Utilisation de la levure et des bactéries pour le contrôle des vibrions pathogènes dans les cultures d'*Artemia*

Use of yeast and bacteria to control pathogenic *Vibrio* in *Artemia* cultures

Abdelkarim Mahdhi\*, Abir Bahi, Zeineb Hmila, Amina Bakhrouf

Laboratoire d'Analyse, Traitement et Valorisation des Polluants de l'Environnement et des Produits.

Faculté de Pharmacie, 5000 Monastir. Tunisie.

\*Corresponding author: Mahdhi Abdelkarim: abdelkarim\_mh@yahoo.fr

## Résumé

Mahdhi A., A. Bahi, Z. Hmila, A. Bakhrouf – Utilisation de la levure et des bactéries pour le contrôle des vibrions pathogènes dans les cultures d'*Artemia*. *Mar. Life*, 17 : 39-46.

L'utilisation des probiotiques en aquaculture s'est avérée efficace en améliorant la résistance à la maladie, la nutrition et/ou la croissance des organismes cultivés. Ce travail s'est intéressé à l'étude des propriétés probiotiques de deux souches de *Geobacillus* et une souche de levure *Candida famata*, ainsi que la possibilité de leur utilisation pour le contrôle des *Vibrio* pathogènes responsables de lourdes pertes économiques dans le secteur aquacole. Les microorganismes isolés à partir de margine pure prélevée d'un pressoir à olives ont été identifiées comme *Geobacillus thermoleovorans*, *Geobacillus stearothermophilus* et *Candida famata*. Les souches étudiées ont une activité antibactérienne contre les différents pathogènes testés.

L'étude de l'adhésion a révélé que les isolats sont moyennement adhérents. Les tests d'essai sur une culture axénique d'*Artemia* ont montré que la protection contre le *Vibrio* pathogène a été améliorée après l'introduction des souches étudiées dans le milieu de culture d'*Artemia*. En se basant sur ces résultats, nous pouvons conclure que les souches étudiées peuvent être utilisées comme candidats probiotiques potentiels pour la culture d'*Artemia*.

### MOTS CLÉS :

bactérie, levure, pathogène, probiotique, *Artemia*, aquaculture.

## Abstract

Mahdhi A., A. Bahi, Z. Hmila, A. Bakhrouf – [Use of yeast and bacteria to control pathogenic *Vibrio* in *Artemia* cultures]. *Mar. Life*, 17 : 39-46.

The use of probiotics in aquaculture is proving to be effective in improving disease resistance, nutrition and/or growth of cultured organisms. This paper presents a study relating to the probiotic properties of two strains of *Geobacillus* and a yeast *Candida famata*, and their possible use for controlling the pathogenic *Vibrio* responsible for heavy economic losses in the aquaculture sector. The microorganisms were identified as *Geobacillus thermoleovorans*, *Geobacillus stearothermophilus* and *Candida famata*. The strains studied exhibit antibacterial activity against the different pathogenic tested. Adherence assays revealed that the isolates are fairly adherent. The challenge test on axenic *Artemia* culture showed that the protection against pathogenic *Vibrio* was improved. On the basis of these results, we can suggest that the strains studied can be used as potential probiotic candidates for the culture of *Artemia*.

### KEY WORDS:

bacteria, yeast, pathogen, probiotics, *Artemia*, aquaculture.

## Introduction

Le secteur aquacole est l'un des secteurs de production alimentaire qui croît le plus rapidement de nos jours. Mais l'accroissement des maladies est devenu une contrainte importante pour la production de l'aquaculture et le commerce, affectant ainsi le développement du secteur économique dans de nombreux pays (Subasinghe *et al.*, 2001). Les espèces de *Vibrio* sont parmi les plus importants microbes pathogènes dans les cultures de crevettes et ils sont responsables de plusieurs maladies et mortalités dans le secteur aquacole (Bakhrouf *et al.*, 1992 ; Diggle *et al.*, 2000). De ce fait, plusieurs méthodes de préventions et de traitements telles que l'utilisation d'antibiotiques ont été largement utilisées pour l'élevage en aquaculture (Moriñigo *et al.*, 2002) particulièrement pendant les phases critiques (stades précoces, métamorphose, transferts d'animaux), mais aussi chez les animaux en croissance (Nicolas *et al.*, 2007). L'utilisation des antibiotiques pour le contrôle des maladies et la promotion de la croissance des animaux, augmente la pression sélective exercée sur la flore microbienne et encourage l'émergence naturelle de la résistance bactérienne. Les bactéries résistantes peuvent se multiplier après l'utilisation massive d'un antibiotique et ainsi transférer leurs gènes de résistance à d'autres bactéries qui n'ont jamais été exposées à l'antibiotique (Moriarty, 1997). De nos jours, les méthodes d'élevage des crustacés et des poissons dans les stations aquacoles favorisent plutôt la modification des conditions d'élevage, la sélection d'animaux génétiquement résistants aux maladies et l'utilisation des probiotiques. Ces derniers sont définis comme des adjuvants microbiens vivants ayant des effets bénéfiques sur l'hôte tels que la modification de la flore microbienne, l'augmentation de la réponse de l'hôte vis-à-vis des autres pathogènes, l'utilisation optimisée de l'alimentation et l'amélioration de la qualité de son environnement (Sanders, 2000). Tous ces effets bénéfiques engendrent une réduction des maladies dues aux bactéries pathogènes associées aux cultures d'*Artemia*, souvent redoutées en aquaculture telles que la vibriose et la pasteurellose. Les probiotiques peuvent protéger leur hôte par la production de métabolites qui empêchent la colonisation ou la croissance d'autres micro-organismes pathogènes ou la compétition pour l'alimentation (Vine *et al.*, 2004). Mahdhi *et al.* (2010a), ont montré que *Pseudomonas stutzeri* et *Bacillus* sp., ainsi que la levure *Candida utilis* améliorent les conditions d'élevage d'*Artemia*. Balcazar et Luna-Rojas (2007) et Zhou *et al.* (2009), ont signalé que l'activité inhibitrice de *Bacillus subtilis* confère une protection pour les juvéniles de la

crevette *Litopenaeus vannamei* contre le pathogène *Vibrio alginolyticus*. Liu *et al.* (2010) ont démontré que *B. subtilis* E20 peut être utilisé comme probiotique dans l'élevage larvaire de *L. vannamei* en améliorant le taux de survie larvaire, le développement et la résistance aux pathogènes.

Au cours de ce travail, dans le but de rechercher des candidats probiotiques potentiels en aquaculture, nous nous sommes intéressés à l'étude de certaines propriétés probiotiques des souches bactériennes *Geobacillus thermoleovorans* et *Geobacillus stearothermophilus* et de la levure *Candida famata*. Nous avons par la suite étudié leurs rôles dans la protection des cultures d'*Artemia* contre une souche pathogène *Vibrio alginolyticus*.

## Matériel et méthodes

### Isolement des souches

Les souches ont été isolées à partir de la margine pure prélevée d'un pressoir à olives de la zone du Msaken à Sousse (Tunisie) et enrichies dans le bouillon nutritif pendant 24 h à 37°C. À partir du bouillon nutritif, nous avons repiqué 10 µL sur la gélose nutritive (GN) pour les bactéries et sur gélose Sabouraud spécifique des levures et des champignons. Les boîtes de GN et de gélose Sabouraud sont incubées à des températures de 37°C et 44°C respectivement, pendant 24 à 48 h. Pour les purifier, les colonies isolées et différenciées par leur morphologie et leur couleur ont été repiquées deux fois sur les mêmes milieux.

### Identification biochimique des souches

L'examen morphologique sous microscope optique et les tests du Gram et Catalase ont été utilisés en premier lieu pour l'identification des souches. Nous avons ensuite utilisé les galeries Api 20 E et Api 50 CHB (Biomérieux, France) pour identifier les souches bactériennes. La galerie API Candida (Biomérieux, France), a été utilisée pour l'identification des levures. La lecture des résultats de l'identification biochimique a été réalisée par un logiciel numérisé (Api Web, Biomérieux, Marcy l'Etoile, France).

### Étude de l'activité antibactérienne par la méthode des puits (WDAA: Well Diffusion Agar Assay)

La méthode de diffusion sur milieu Mueller Hinton Agar (MHA) a été utilisée pour examiner l'activité antimicrobienne (Hjelm *et al.*, 2004). Les bactéries pathogènes utilisées sont *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802, *Vibrio*

*alginoliticus* (VA) isolée de poisson malade (*Sparus aurata*) (Ben Kahla-Nakbi *et al.*, 2006), *Escherichia coli* ATCC 35218, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Salmonella typhimurium* ATCC 1408. Ces bactéries ont été enrichies dans 10 mL de bouillon nutritif et cultivées pendant 24 heures sur gélose nutritive à 37°C. Les colonies communes de la culture pure ont été suspendues dans 10 mL de milieu physiologique et vortexées pendant 5 minutes. 1 mL de chaque suspension de bactérie pathogène a été étalé sur un milieu solide de Mueller Hinton (MHA) et incubé pendant 30 minutes à 37°C. Les microorganismes isolés ont été incubés dans un bouillon nutritif (24 h à 37°C). Des puits ont été creusés stérilement dans le milieu (MHA) et remplis par 100 µL de chaque suspension bactérienne enrichie dans le bouillon nutritif. La production d'une zone d'inhibition autour des puits indique la présence d'une activité antibactérienne. Après 24 heures, les zones d'inhibition ont été mesurées (Parish, Davidson, 1993).

### Étude semi quantitative de l'adhésion des souches isolées

L'adhésion aux surfaces, en particulier au mucus intestinal, est un paramètre important permettant aux bactéries probiotiques de coloniser le tractus gastro-intestinal. La méthode utilisée est celle décrite par Christensen *et al.* (1985) et Mahdhi *et al.* (2010a, 2010b). Après culture des souches bactériennes dans le bouillon Tryticase Soy Broth (TSB, Bio-Rad, France) à 44°C et celle de la levure dans le bouillon Sabouraud à 37°C pendant 18 à 24 heures, nous avons ajusté la densité optique des cultures à 0.3 pour une longueur d'onde de 570 nm. Ces cultures ont été diluées à 1/100 dans le bouillon TSB additionné de 2% (P/V) de glucose. Un volume de 200 µL de chaque suspension a été transféré dans les puits d'une plaque de 96 puits en polystyrène en forme de U (Nunc, Roskilde, Danemark). Chaque souche a été testée trois fois. Le bouillon TSB stérile a servi de témoin négatif. La plaque a été incubée à 37°C en aérobiose pendant 24 heures puis lavée trois fois par une solution de PBS (7 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 130 mM de NaCl, pH 7.3) pour éliminer les cellules non adhérentes. Elle est ensuite séchée en position renversée. Les cellules adhérentes sont fixées par l'éthanol à 95 %, ensuite colorées par 100 µL d'une solution de cristal violet 1 % (Merck, France) pendant 5 min. Le surplus du cristal violet est rejeté et les puits sont lavés vigoureusement à l'eau distillée stérile. La plaque est à nouveau séchée. Les puits sont de nouveau lavés avec 300 µL d'eau distillée stérile. La densité optique de chaque puits a été mesurée à 570 nm en utilisant un lecteur ELISA (automate Gio. DE VITAEC,

Rome Italy). L'adhésion est dite forte si  $OD_{570} \geq 1$ , moyenne si  $0.1 \leq OD_{570} < 1$  et non adhérente si  $OD_{570} < 0.1$ .

### Étude de l'effet des souches isolées sur la culture d'*Artemia*

#### 1. Préparation des nauplii d'*Artemia* axéniques

Nous avons versé 0.03 g de cystes d'*Artemia* dans un tube à essais en verre bouchonné et contenant 10 mL d'eau de mer filtrée et autoclavée (EMFA), le tube est agité continuellement pendant une heure et demi à 30°C afin d'hydrater les cystes. Nous avons par la suite ajouté 10 mL d'hypochlorite de sodium de 12° chlorométrique au tube contenant les cystes hydratés (Vol/Vol) qui est agité manuellement pendant 10 minutes. La décapsulation a eu lieu lorsque les cystes changent de couleur du marron vers le jaune orangé. Les cystes décapsulés sont transférés dans un nouveau tube à essai en verre bouchonné contenant 20 mL d'EMFA avec agitation manuelle. Cette procédure a été répétée 8 à 12 fois en utilisant à chaque fois de nouveaux tubes contenant d'EMFA pour parvenir à un rinçage suffisant de l'hypochlorite de sodium. Les cystes décapsulés et lavés sont transférés dans des flacons de 90 mL contenant 30 mL d'EMFA chacun. Les flacons sont préservés dans un appareil automatisé « Shaker, JEIO TECH, SI-600, Korea » à une température de 28°C avec une intensité lumineuse constante et une rotation de 100 rpm. Dans ces conditions, l'éclosion débutera après 15 à 24 heures et les nauplii sont ensuite collectés.

#### 2. Préparation des suspensions bactériennes et de levure

Les suspensions à base des bactéries et de levure ( $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup>) sont obtenues par ajustement de la densité optique à une longueur d'onde à 600 nm à partir d'une culture bactérienne jeune de 18 à 24 h cultivée sur gélose nutritive et gélose Sabouraud préparée à l'eau de mer. Le dénombrement de chaque souche se fait à différentes densités optiques selon le protocole de Hoben et Somasegaran (1982).

#### 3. Tests d'essai des candidats probiotiques potentiels sur la culture d'*Artemia*

Pour évaluer l'effet des microorganismes isolés sur la culture d'*Artemia* ainsi que leur capacité à supprimer le pathogène *Vibrio alginolyticus in vivo*, différents tests ont été réalisés. Essai 1 : *Artemia* en présence d'un aliment artificiel commercialisé (Red papper, BERN AQUA) (A+AL) ; essai 2 : *Artemia* avec la souche pathogène *V. alginolyticus* (A+VA) ; les essais 3, 4 et 5 ont été

faits avec les trois souches *Candida famata* (A+CFM), *Geobacillus stearothermophilus* (A+D8a) et *G. thermoleovorans* (A+T32); le sixième test a été effectué en présence de l'aliment et de la souche pathogène de *V. alginolyticus* (A+AL+VA); les essais 7, 8 et 9 ont été effectués en utilisant les trois souches à effet bénéfique en présence du pathogène *V. alginolyticus* (A+CFM+VA), (A+ D8a+VA) et (A+T32+VA).

Les suspensions contenant les souches étudiées (*C. famata*, *G. stearothermophilus* et *G. thermoleovorans*) et la bactérie pathogène (*V. alginolyticus*) ont été préparées et ajoutées à la culture d'*Artemia* à des concentrations estimées à  $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup> dans le milieu de culture. Toutes les manipulations ont été réalisées dans des conditions stériles sous hotte à flux lumineuse. Après l'ajout des suspensions bactériennes et de levure, les cultures d'*Artemia* ont été incubées dans un appareil automatisé « Shaker » à la température de 28°C avec une intensité lumineuse constante et une rotation de 100 rpm. Toutes les expériences ont été réalisées en triplicata, en utilisant 10 nauplii au stade I obtenus à partir d'une culture axénique d'*Artemia*. Le suivi consiste à déterminer le taux de survie des larves d'*Artemia* au cours du traitement. La survie est déterminée quotidiennement par le dénombrement des nauplii mobiles en utilisant la formule suivante : Pourcentage de survie = (Nombre de nauplii survivants × 100) / Nombre total de nauplii.

#### 4. Vérification du caractère axénique de la culture d'*Artemia*

La vérification de l'axénité du milieu d'éclosion est déterminée par ensemencement de 100 µL d'eau de culture sur des milieux solides, la gélose nutritive préparée à l'eau de mer (GNEM) et la gélose Sabouraud, et incubation à 30°C pendant 5 jours.

#### Analyse statistique

Les données obtenues dans chaque expérience ont été transformées en Arcsinus pour satisfaire les conditions de la distribution normale. Elles ont été par la suite comparées par analyse de la variance (ANOVA) et le test de Duncan pour la comparaison multiple des moyennes (Statistica, Version 5.5 pour Windows).

## Résultats

### Identification des souches

La souche de levure (CFM) identifiée est *Candida famata*. Les deux souches bactériennes correspondent respectivement à *Geobacillus thermoleovorans* (T32) et *G. stearothermophilus* (D8a) (**Tableau I**).

### Étude de l'activité antibactérienne

L'effet antagoniste des bactéries probiotiques constitue une des propriétés importantes des bactéries probiotiques étant donné les infections intestinales fréquemment causées par les germes pathogènes tels que les entérobactéries. Nos résultats ont montré que tous les isolats possèdent une activité antibactérienne contre les différentes souches pathogènes testées avec un diamètre d'inhibition compris entre 12 et 19.5 mm. (**Tableau II**).

### Étude semi quantitative de l'adhésion des souches isolées

Après lecture de la densité optique (DO) à 570 nm, les résultats ont montré que toutes les souches (T32, D8a et CFM) sont moyennement adhérentes avec des valeurs de 0.123, 0.195 et 0.603 respectivement (**Tableau I**).

### Tests d'essai *in vivo* sur les nauplii d'*Artemia*

La comparaison du taux de survie des nauplii d'*Artemia* en présence des souches testées (A+CFM; A+T32; A+D8a) avec le traitement contrôle "Artemia plus aliment commercial" (A+AL), a montré des différences non significatives ( $P > 0.05$ ). En effet, l'ajout des souches identifiées dans le milieu de culture d'*Artemia* a donné un taux de survie supérieur à 50 %. Ces souches ont la capacité d'inhiber le pathogène *V. alginolyticus*. Au cours des traitements (A+CFM+VA; A+T32+VA; A+D8a+VA), les nauplii d'*Artemia* ont un taux de survie qui varie entre 30 et 50 %. Aucune différence significative n'a été obtenue ( $P > 0.05$ ) par comparaison avec le traitement où nous avons utilisé l'aliment en présence du pathogène (**Figure 1**). Cependant, une différence significative a été notée lors de la comparaison avec le traitement (A+VA), où le taux de survie s'annule à partir du quatrième jour ( $P < 0.05$ ). Nous avons noté que les taux de survie dans les tests où la culture d'*Artemia* a été traitée par les souches probiotiques et le pathogène *Vibrio* s'améliorent d'une façon significative par rapport au traitement *Artemia* en présence du pathogène uniquement (A+VA) ( $P < 0.05$ ).

Tableau I

Souche	Gram	Catalase	Identification	Adhésion au polystyrène OD <sub>570</sub> ±SD
T32	+	+	<i>Geobacillus thermoleovorans</i>	0.123 ± 0.03
D8a	+	+	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	0.195 ± 0.19
CFM	nr	nr	<i>Candida famata</i>	0.603 ± 0.13

Identification biochimique des souches étudiées et étude semi quantitative de l'adhésion. + : Réaction positive ; nr : non réalisée.

Biochemical identification of the studied strains and semi-quantitative study of the adhesion. +: positive reaction; nr: Not done.

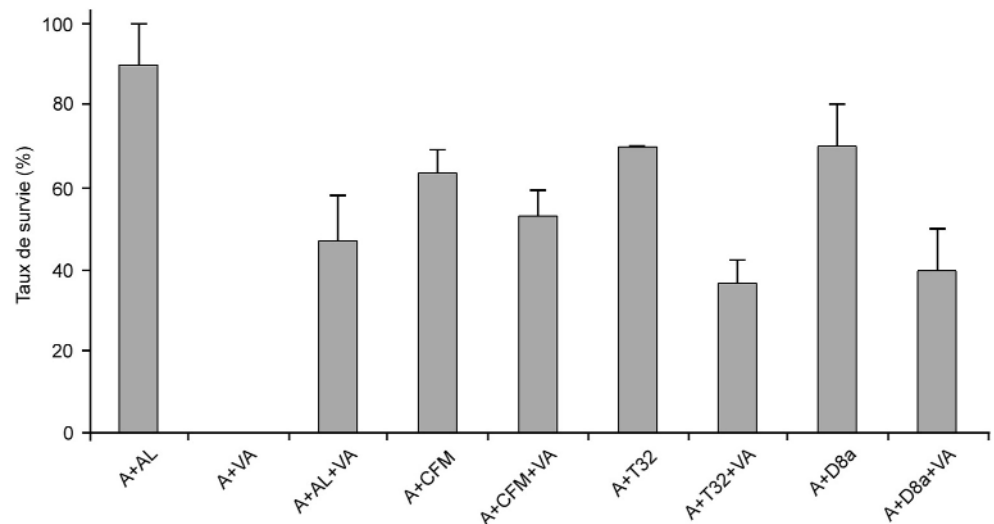
Tableau II

Souches	T32	D8a	CFM
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 1408	16 ± 00	18 ± 1.73	12 ± 00
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	14.5 ± 1.13	15.5 ± 1.32	13.5 ± 0.98
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ATCC 17802	15 ± 1	19.5 ± 0.86	0 ± 00
<i>Vibrio alginolyticus</i> (VA)	16.6 ± 1.38	17.5 ± 0.5	12.5 ± 0.5
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	17 ± 1	17.6 ± 0.36	12.5 ± 0.1

Étude de l'activité antibactérienne des trois souches vis-à-vis des souches pathogènes. T32 : *Geobacillus thermoleovorans* ; D8a : *Geobacillus stearothermophilus* ; CFM : *Candida famata*.

Study of the antibacterial activity of the three bacterial strains towards pathogenic strains. T32: *Geobacillus thermoleovorans*; D8a: *Geobacillus stearothermophilus*; CFM: *Candida famata*.

Figure 1



Taux de survie des nauplii d'*Artemia* à la fin du traitement (Jour 6). A : *Artemia* ; AL : aliment commercialisé ; VA : *Vibrio alginolyticus* ; CFM : *Candida famata* ; T32 : *Geobacillus thermoleovorans* ; D8a : *Geobacillus stearothermophilus*.

Survival rate of *Artemia* nauplii at the end of treatment (day 6). A: *Artemia*; AL: commercial food; VA: *Vibrio alginolyticus*; CFM: *Candida famata*; T32: *Geobacillus thermoleovorans*; D8a: *Geobacillus stearothermophilus*.

## Discussion

Au cours de ce travail, nous avons pu isoler à partir d'un échantillon de margine provenant d'un pressoir à olives situé à Msaken de la Gouvernera de Sousse deux souches de *Geobacillus* et une souche de levure. Ces souches peuvent servir de candidats probiotiques potentiels (Tai *et al.*, 2004 ; Lagzouli *et al.*, 2007). En effet, les souches ont montré une activité antibactérienne vis à vis des pathogènes testés. Ce résultat peut expliquer en partie l'amélioration de la culture d'*Artemia* par inhibition de la

croissance de la bactérie pathogène (*V. alginolyticus*) introduite dans le milieu de culture. Les mécanismes d'inhibition observés n'étaient pas caractérisés dans cette étude, mais plusieurs études ont suggéré que les effets inhibiteurs des microorganismes à effet probiotique pourraient être dus au changement de pH du milieu de croissance ou à la production de composés volatils (Chaurasia *et al.*, 2005). En outre, des études précédentes ont indiqué que *Bacillus* sp. produit des polypeptides et des antibiotiques, tels que la bacitracine, le polymyxine et le tyrotricidine, qui ont une activité contre une large

gamme de bactéries à Gram positives et Gram négatives (Perez *et al.*, 1993). Beaucoup d'espèces appartenant au genre *Bacillus* ont un effet antimicrobien contre des micro-organismes, y compris des bactéries pathogènes pour les poissons, les mollusques et les crustacés et ont la capacité de produire des exotoxines (Rengpipat *et al.*, 2000 ; Holmstrom *et al.*, 2002 ; Balcazar, Luna-Rojas, 2007 ; Mahdhi *et al.*, 2010b).

L'étude semi quantitative de l'adhésion a révélé que les trois souches, *Candida famata*, *Geobacillus stearothermophilus* et *G. thermoleovorans* sont moyennement adhérentes. Cette propriété permet à ces microorganismes de persister dans l'intestin pendant plusieurs jours et d'être actifs pendant le transit intestinal. Ainsi, ils peuvent éliminer des agents pathogènes potentiels et participent à la création d'un environnement sain et à l'amélioration de la qualité de l'eau et des conditions de la culture d'*Artemia*. Ce résultat est en accord avec les résultats publiés par Mahdhi *et al.* (2010b) qui ont montré que des candidats probiotiques potentiels à base du *Bacillus* avec une capacité moyenne d'adhésion peuvent améliorer les conditions d'élevage et la protection contre les pathogènes souvent redoutés en aquaculture.

Les tests d'essai sur les nauplii d'*Artemia* en présence du pathogène, ont révélé que le taux de survie des nauplii d'*Artemia* s'annule vers le quatrième jour. Ceci peut être dû à l'effet néfaste du pathogène. En effet, il a été démontré que l'attachement de certains pathogènes tels que *V. alginolyticus* et *V. parahaemolyticus* à la surface des nauplii causent des effets délétères qui peuvent expliquer leurs effets négatifs (Gunther, Catena, 1980).

L'ajout des souches isolées dans le milieu de culture permet d'inhiber l'effet pathogène du *V. alginolyticus*. Cette amélioration des conditions d'élevage peut être expliquée par les pouvoirs antibactérien et adhésif démontrés chez les souches testées. En effet, la capacité d'adhésion aux surfaces biotiques et abiotiques et celle d'inhibition des pathogène *in vivo* et *in vitro* est considérée parmi les principaux critères de sélection des microorganismes probiotiques. Elle permet aux microorganismes de coloniser le tractus digestif afin de pouvoir exercer leurs effets bénéfiques sur la santé de l'hôte (Arthur *et al.*, 2002). Le genre *Bacillus* montre une forte activité antibactérienne en présence de pathogènes tel que *Vibrio* sp. dans les cultures de poissons, mollusques et crustacés (Gatesoupe, 1999 ; Zhou *et al.*, 2009 ; Mahdhi *et al.*, 2010b).

La levure a aussi été utilisée pour le contrôle de *Vibrio* pathogènes dans les cultures de vertébrés et d'invertébrés marins. Mahdhi *et al.* (2010a) ont démontré que *C. utilis* peut être utilisé pour l'amélioration des

conditions d'élevage d'*Artemia*. Ces levures telles que *Saccharomyces cerevisiae* et les bactéries telles que *Bacillus* sp. peuvent être utilisées pour protéger les cultures d'*Artemia* contre *Vibrio campbellii* et *Vibrio proteolyticus* (Marques *et al.*, 2006). Cette protection peut être corrélée également aux pouvoirs adhésif et antibactérien démontrés chez les souches testées. Le genre *Geobacillus* excrète également des enzymes, telles que la lipase et l'hydrolase, qui peuvent améliorer le processus digestif (Quintana-Castro *et al.*, 2009 ; Pinzón-Martínez *et al.*, 2010). Balcazar et Luna-Rojas (2007) et Deng-Yu *et al.* (2009) ont montré que l'administration de *B. subtilis* à la culture de juvéniles de crevettes *Litopenaeus vannamei* a stimulé leur système immunitaire et a renforcé leur résistance aux maladies. Ainsi, l'utilisation d'une souche de *Bacillus* S11 dans une culture de crevette *Penaeus monodon* a amélioré le taux de survie, la croissance, la stimulation du système immunitaire et la résistance aux maladies (Rengpipat *et al.*, 2000).

## Conclusion

À la lumière des résultats obtenus, nous pouvons conclure que les souches isolées ont la capacité d'inhiber l'effet néfaste des pathogènes *in vivo* et *in vitro*. Ainsi, les souches isolées peuvent être utilisées comme probiotiques potentiels pour l'amélioration des conditions d'élevage d'*Artemia*. D'autres études méritent d'être développées dans le but de mieux comprendre le mécanisme d'inhibition des pathogènes démontré dans ce travail et de confirmer l'effet probiotique des souches testées par des essais à grande échelle.

## Remerciements

Nous remercions le Dr Nadia LEBAN de l'Université de Monastir pour son assistance et sa collaboration.

## Bibliographie

- Arthur C.O., S. Tarja, T. Satu, S. Seppo**, 2002 - *In vitro* adhesion of propionic acid bacteria to human intestinal mucus. *Lait*, **82** : 123-130.
- Bakhrouf A., H. Ben Ouada, R. Oueslati**, 1992 - Essai d'identification de deux vibrions isolés dans une zone de pisciculture. *Microbiol. Hyg. alim.*, **4** : 9.
- Balcazar J.L., T. Luna-Rojas**, 2007- Inhibitory activity of probiotic *Bacillus subtilis* UTM 126 against *Vibrio* species confers protection against vibriosis in juvenile shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Curr. Microbiol.*, **55** : 409- 412.
- Ben Kahla-Nakbi A., K. Chaieb, A. Besbes, T. Zmantar, A. Bakhrouf**, 2006 - Virulence and enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR of *Vibrio alginolyticus* strains isolated from Tunisian cultured gilthead sea bream and sea bass outbreaks. *Vet. Microbiol.*, **117** : 321-327.
- Chaurasia B., A. Pandey, M.S. Palni, P. Trivedi, B. Kumar, N. Colvin**, 2005 - Diffusible and volatile compounds produced by an antagonistic *Bacillus subtilis* strain cause structural deformations in pathogenic fungi *in vitro*. *Microbiol. Res.*, **160** : 75-81.
- Christensen G.D., W.A. Simpson, J.J. Younger, L.M. Baddour, F.F. Barrett, D.M. Melton, E.H. Beachey**, 1985 - Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J. clin. Microbiol.*, **22** : 996-1006.
- Deng-Yu T., H. Pei-Lin, H. Sung-Yan, C. Sheng-Chi, S. Ya-Li, C. Chiu-Shia, L. Chun-Hung**, 2009 - Enhancement of immunity and disease resistance in the white shrimp, *Litopenaeus vannamei* by the probiotic, *Bacillus subtilis* E 20. *Fish Shellfish Immunol.*, **26** : 339-344.
- Diggles B.K., G.A. Moss, J. Carson, C.D. Anderson**, 2000 - Luminous vibriosis in rock lobster *Jasus verreauxi* (Decapoda: Palinuridae) phyllosoma larvae associated with infection by *Vibrio harveyi*. *Dis. aquat. Org.*, **43** : 127-137.
- Gatesoupe F.J.**, 1999 - The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture*, **180** : 147-165.
- Gunther D.C., A. Catena**, 1980 - The interaction of *Vibrio* with *Artemia* nauplii. In : *The Brine Shrimp Artemia*. Vol. 1, *Morphology, genetics, radiobiology, toxicology*, G. Persoone, P. Sorgeloos, O. Roels, E. Jaspers, (eds), Universa Press, Wetteren, Belgium, pp : 213-221.
- Hjelm M., O. Bergh, A. Riaza, J. Nielsen, J. Melchiorson, S. Jensen, H. Duncan, P. Ahrens, H. Birkbeck, L. Gram**, 2004 - Selection and identification of autochthonous potential probiotic bacteria from turbot larvae (*Scophthalmus maximus*) rearing units. *Syst. appl. Microbiol.*, **27** : 360-371.
- Hoben H.J., P. Somasegaran**, 1982 - Comparison of the pour spread and drop plate methods for enumeration *Rhizobium* spp. in inoculants made from presterilized peat. *Appl. environ. Microbiol.*, **44** : 1246-1247.
- Holmström C., S. Egan, A. Franks, S. McCloy, S. Kjelleberg**, 2002 - Antifouling activities expressed by marine surface associated *Pseudoalteromonas* species. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **41** : 47-58.
- Lagzouli M., Z. Mennane, A. Aitounejjar, S. Wafae, M. Ouhssine, M. Elyachioui, E.H. Berny, M. Jadal**, 2007 - Optimization of growth and extracellular glucoamylase production by *Candida famata* isolate. *Afr. J. Biotechnol.*, **6** : 2590-2595.
- Liu K.F., C.H. Chiu, Y.L. Shiu, W. Cheng, C.H. Liu**, 2010 - Effects of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, on the survival, development, stress tolerance, and immune status of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* larvae. *Fish Shellfish Immunol.*, **28** : 837- 844.
- Mahdhi A., K. Chaieb, F. Kamoun, A. Bakhrouf**, 2010a - Use of *Pseudomonas stutzeri* and *Candida utilis* in the improvement of the conditions of *Artemia* culture and protection against pathogens. *Braz. J. Microbiol.*, **41** : 107-115.
- Mahdhi A., B. Harbi, M. Ángeles Esteban, K. Chaieb, F. Kamoun, A. Bakhrouf**, 2010b - Using mixture design to construct consortia of potential probiotic *Bacillus* strains to protect gnotobiotic *Artemia* against pathogenic *Vibrio*. *Biocontrol Sci. Technol.*, **20** : 983-996.
- Marques A., T. Huynh Thanh, W. Verstraete, J. Dhont, P. Sorgeloos, P. Bossier**, 2006 - Use of selected bacteria and yeast to protect *Artemia* against different pathogens. *J. expl mar. Biol. Ecol.*, **334** : 20-30.
- Moriarty D.J.W.**, 1997 - The role of microorganisms in aquaculture ponds. *Aquaculture*, **151** : 333-349.
- Moriñigo M.A., J.L. Romalde, M. Chabrillon, B. Magariños, S. Arijo, M.C. Balebona, A.E. Toranzo**, 2002 - Effectiveness of a divalent vaccine for gilt-head sea bream (*Sparus aurata*) against *Vibrio alginolyticus* and *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **22** : 298-303.
- Nicolas J.L., F.J. Gatesoupe, S. Frouel, E. Bachere, Y. Gueguen**, 2007 - Quelles stratégies alternatives aux antibiotiques en aquaculture, *INRA Prod. anim.*, **20** : 253-258.
- Parish M.E., P.M. Davidson**, 1993 - Methods of evaluation. In : *Antimicrobials in Foods*, P.M. Davidson, A.L. Branen (eds), Marcel Dekker Inc., New York, pp : 597-615.
- Perez C., C. Suarez, G.R. Castro**, 1993 - Antimicrobial activity determined in strains of *Bacillus circulans* Cluster, *Folia microbiol. Praha*, **38** : 25-28.

**Pinzón-Martínez D.L., C. Rodríguez-Gómez, D. Miñana-Galbis, J.A. Carrillo-Chávez, G. Valerio-Alfaro, R. Oliart-Ros**, 2010 - Thermophilic bacteria from Mexican thermal environments: isolation and potential applications. *Environ. Technol.*, **31** : 957-966.

**Quintana-Castro R., P. Díaz, G. Valerio-Alfaro, H.S. García, R. Oliart-Ros**, 2009 - Gene cloning, expression, and characterization of the *Geobacillus thermoleovorans* CCR 11 thermoalkaliphilic lipase. *Mol. Biotechnol.*, **42** : 75-83.

**Rengpipat S., S. Rukpratanporn, S. Piyatitivorakul, P. Menasaveta**, 2000 - Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus S11*). *Aquaculture*, **191** : 271-288.

**Sanders M.E.**, 2000 - Considerations for use of probiotic bacteria to modulate human health. *J. Nut.*, **130** : 384-390.

**Subasinghe R.P., M.G. Bondad-Reantaso, S.E. McGladdery**, 2001 - Aquaculture development, health and wealth. In: *Aquaculture in the third millennium*, R.P. Subasinghe, P. Bueno, M.J. Phillips, **C. Hough, S.E. McGladdery, J.R. Arthur** (eds). Technical Proceedings of the Conference on Aquaculture in the Third Millennium, at Bangkok, 22-25 Feb. 2000, NACA, Bangkok and FAO, Rome, Italy, pp: 167-191.

**Tai S.K., H.P.P. Lin, J. Kuo, J.K. Liu**, 2004 - Isolation and characterization of a cellulolytic *Geobacillus thermoleovorans* T4 strain from sugar refinery wastewater. *Extremophiles*, **8** : 345-349.

**Vine N.G., W.D. Leukes, H. Kaiser, S. Daya, J. Baxter, T. Hecht**, 2004 - Competition for attachment of aquaculture candidate probiotic and pathogenic bacteria on fish intestinal mucus. *J. Fish Dis.*, **27** : 319-326.

**Zhou X., Y. Wang, W. Li**, 2009 - Effect of probiotic on larvae shrimp (*Penaeus vannamei*) based on water quality, survival rate and digestive enzyme activities. *Aquaculture*, **287** : 349-353.

*Received March 2011*

*Accepted August 2011*

*Published electronically October 2011*

*www.marinelife-revue.fr*