

ACTIVITE ANTIBACTERIENNE D'*ENTEROCOCCUS.SP* ET *LEUCONOSTOC.SP* SUR LES BACTERIES EN PISCICULTURE LARVAIRE

Rim EL JENI^{1,2}, Wael BELLILA², Balkiss BOUHAOUALA-ZAHAR² et Monia EL BOUR¹

1-Laboratoire de Biodiversité et biotechnologie marines (INSTM Salammbô), 28 rue du 2 mars 1934, 2025 Tunis Tunisie.

2-Institut Pasteur de Tunis, laboratoire des Venins et Molécules Thérapeutiques, 13 Place Pasteur, BP-74, 1002 Tunis, Tunisie.

Email : eljeni.rime@gmail.com; balkiss.bouhaouala@pasteur.rns.tn; monia.elbour@instm.rnrt.tn

ABSTRACT

The ability of lactic acid bacteria to produce bacteriocins with antibacterial activity, has gained a lot of interest in the improvement of food security and in the control of infectious diseases, enhancing the bacteria's use in the control aquaria. The objective of this study was to demonstrate the antibacterial activity of *Enterococcus* sp and *Leuconostoc* sp (El Jeni et al., in press) lactic acid bacteria, against freshly isolated bacteria which according to the 16S gene sequences belong to the species *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter citrobacter* and *Braakii freundi*, respectively.

RESUME

La capacité des bactéries lactiques à produire des bactériocines, a gagné d'intérêt dans l'amélioration de la sécurité alimentaire et dans le contrôle des maladies infectieuses, d'où l'intérêt de l'utilisation des bactéries lactiques pour le contrôle microbiologique des poissons en aquarium. L'objectif de cette étude est de démontrer l'activité antibactérienne de deux espèces lactiques *Enterococcus* sp. et *Leuconostoc* sp., contre des bactéries pathogènes associées aux larves de poisson en élevage. Ces bactéries ont été pré-identifiées comme appartenant respectivement aux espèces *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter braakii* et *Citrobacter freundi*.

INTRODUCTION

Durant les dernières années, il y'eut un intérêt croissant pour les bactéries lactiques à potentiel probiotique notamment pour leurs peptides antimicrobiens de faible poids moléculaire. Ces derniers peptides ont une activité inhibitrice dirigée contre les bactéries d'espèces proches avec un spectre d'action plus ou moins large. La présente étude décrit l'effet de deux espèces de bactéries probiotiques (*E. Enterococcus* sp et *H. Leuconostoc* sp.) de notre collection d'isolats (à partir de poissons d'eaux douces), sur trois isolats de saprophytes associés aux larves de sandre en élevage et rapporte les résultats de détection de leur activité antibactérienne *in vitro*.

MATERIEL ET METHODES

Matériel biologique : Les bactéries lactiques E et H appartiennent à notre collection de souches de bactéries lactiques isolées à partir du mucus de poissons d'eau douce (El Jeni et al., 2015).

Isolement et caractérisation biochimique des souches associées aux larves

Les bactéries ont été isolées à partir d'un échantillon de matériel biologique associé aux larves d'aquarium de poisson carnacien, dès leur réception au sein du laboratoire.

Caractérisation biochimique des souches associées aux larves : Test catalase, Oxydase (Prescott et al., 2003) et coloration de Gram.

Détection de l'activité antibactérienne : Elle a été effectuée en utilisant le test des puits (Shnit-Orland & Kushmaro, 2008).

Identification moléculaire des souches associées aux larves : Le séquençage du gène ADN_r 16S a été effectué en utilisant des amorces universelles (p8FPL/p806R). L'homologie des séquences a été trouvée en utilisant l'outil BLAST de NCBI. Les séquences nucléotidiques ont été comparées et alignées en utilisant le programme CLUSTALW (Thompson et al., 1994).

RESULTATS

La caractérisation biochimique des isolats a été rapportée au niveau du tableau (1). Les résultats de séquençage du gène ADN_r 16S ont démontré que les trois bactéries associées aux larves appartiennent respectivement aux espèces *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter braakii* et *Citrobacter freundi* (Tab. 2). Ces trois types de bactéries sont sensibles à l'activité antibactérienne avérée des deux souches lactiques (E et H). En leur présence, des anneaux d'inhibition de croissance importants sont observés (Fig.1). Ce test a été reproduit en duplicate.

Tableau 1 : Caractérisation biochimique des bactéries associées aux larves de poisson en aquarium

Isolat	Test oxydase	Test catalase	Coloration de Gram
Isolat 1	+	-	Coque Gram négatif
Isolat 2	+	-	Coque Gram négatif
Isolat 3	+	+	Bacille Gram négatif

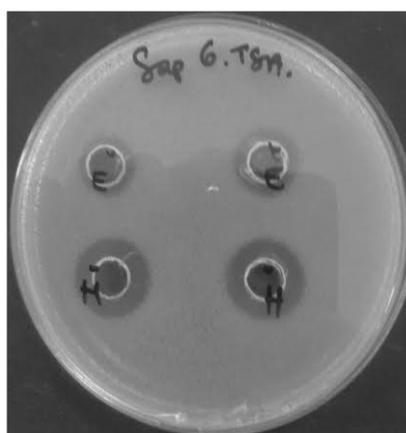


Figure 1 : Détection de l'activité antibactérienne vis à vis de l'isolat. 2 pour E: *Enterococcus sp.* H: *Leuconostoc sp.*

Tableau 2 : Identification moléculaire des bactéries isolées par BLASTn (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch)

Saprophytes	Identification avec Blast	Sequences	Identification
Isolat 1	<i>Klebsiella oxytoca</i>	TTGCCAGCGaTTCGGTCGGGAActCAAAGGAGACTGCCAGTG ATAAACTGGAGGAAG GTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGG CTACACACGTGCTACAA TGGCATATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGG ACCTCATAAAGTATGTC GTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCG GAATCGCTAGTAATCGTG GATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACA CACCGCCCGTCACACCA TGGGAGTGGGTTGCAAAAGAAGTAGGTAGCTTAACCTTCGG GAGGGCGCTACCACTTTGTT	99%
Isolat 2	<i>Citrobacter braakii</i> strain	GGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGTAGCACAGAGG AGCTTGCTCCTTGGGTGACGA GTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCCGATGG AGGGGGATAACTACTGGAACGGTAGCTAATACCGCATAAC GTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGC CATCGGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTA ACGGCTCACCTAGGCGACG ATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAC TGAGACACGGTCCAGACTC	100%

		<p>CTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCA AGCCTGATGCAGCCATGCC GCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTTCAGC GAGGAGGAAGGTGTTGTGGT TAATAACCGCAGCGATTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACC GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGC AAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGC GGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGG GAACTGCATC</p>	
Isolat 3	<i>Citrobacter freundii strain</i>	<p>ATGCAGTCGAACGGTAGCACAGAGGAGCTTGCTCCTTGGGT GACGAGTGGCGGACGGGTG AGTAATGTCTGGGAACTGCCCGATGGAGGGGGATAACTAC TGGAAACGGTAGCTAATAC CGCATAACGTTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCT CTTGCCATCGGATGTGCCCA GATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGC GACGATCCCTAGCTGGTCTG AGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGA CTCCTACGGGAGGCAGCA GTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCA TGCCGCGTGTATGAAGAAGG CCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTTCAGCGAGGAGGAAGGTGTT GTGGTTA</p>	100%

DISCUSSION

Au cours de cette étude, deux espèces de bactéries lactiques (E: *Enterococcus faecium* et H: *Leuconostoc mesenteroides*) appartenant à notre collection de souches à potentiel probiotique, ont été testées pour leur capacité d’inhibition de la croissance de trois bactéries associées aux larves de poissons d’élevage en aquarium. La prè-identification de ces bactéries montrent qu’il s’agit d’espèces *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter braakii* et *Citrobacter freundii* qui s’avèrent être sensibles à la présence des souches lactiques E et H. Ce travail rapporte le spectre antibactérien intéressant des espèces E et H et leur application potentielle pour un meilleur contrôle microbiologique des élevages de poisson en aquarium.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été mené dans le cadre du projet transfrontalier BIOVecQ PS1.3_08 co-financé par l’UE.

BIBLIOGRAPHIE

EL JENI R., EL BOUR M., CALOMATA P., BOHEM K., IMMACULATA FC., BARROS-VELASQUEZ J. and BOUHAOUALA-ZAHAR B.(2015). *In-vitro* probiotic profiling of *Enterococcus faecium* and *Leuconostoc mesenteroides* Lactic Acid Bacteria strains

from Tunisian freshwater fishes. *Canadian J. Microbiol.*(Sous Presse)
 PRESCOTT N., WATHES C. and JARVIS J. (2003). Light, vision and the welfare of poultry. *Animal Welfare*, 12, 269-288.
 SHNIT-ORLAND M. and KUSHMARO A. (2008) Coral mucus bacteria as a source for antibacterial activity. *Proceedings of the 11th International Coral Reef Symposium, Ft. Lauderdale, Florida.*
 THOMPSON J. D., HIGGINS D. G., GIBSON T. J. and CLUSTAL W. (1994): improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22, 4673-4680.