



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة والحياة

Département : Microbiologie

قسم : الميكروبيولوجيا

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Microbiologie, Option : Biotechnologie des Mycètes : Fermentation et production de substances fongiques

Intitulé :

Isolement et caractérisation des levures oléagineuses, à partir de différents sols en Algérie

Présenté et soutenu par : *REMRAM Zineb / MANA Yazid*

Le : 23/06/2016

Jury d'évaluation :

Président du jury : Melle. CHENTLI Amira Dr. Univ. Des Frères Mentouri Constantine

Rapporteur : Melle. BATAICHE Insaf Dr. Univ. Des Frères Mentouri Constantine

Examinatrice : Melle. CHERFIA Radia MAA. Univ. Des Frères Mentouri Constantine

*Année universitaire
2015 – 2016*

Remerciement

En préambule, nous remercions notre Dieu ALLAH qui nous a aidé et nous a donné la patience et le courage durant ces années d' études

Nos remerciements s' adressent au Professeur *KACEM CHAOUICHE Noredine*, pour nous avoir accueilli de travailler au sein du laboratoire de mycologie de biotechnologie et de l' activité microbienne « LaMyBaM ».

Nous tenons à remercier Melle *BATAICHE Insaf* pour son encadrement tout au long de ces trois mois de pratique et notamment durant la rédaction de ce manuscrit, ainsi que pour sa patience, son encouragement quotidien et ses conseils, nous laissant la liberté nécessaire à l' accomplissement de ce modeste travail.

Nous tenons à exprimer nos remerciements aux membres du jury, qui nous ont fait l' honneur de participer au jury de ce travail, Melle *CHENTLI Amira*, Dr. à l' Université des Frères Mentouri Constantine, on vous remercie d' avoir accepté de présider le jury de ce mémoire. Merci à Melle *CHERFIA Radia*, MAA. Egalement à l' Université des Frères Mentouri Constantine d' avoir accepté d' être l' examinatrice de ce manuscrit.

On remercie le personnel du Laboratoire de mycologie de biotechnologie et de l' activité microbienne « LaMyBaM » et, plus particulièrement, madame *YOUCEF-ALI Mounia* qui nous a appris et initié à la réalisation des manipulations de laboratoire.

Nous adressons nos sincères remerciements à tous les professeurs, intervenants et toutes les personnes qui par leurs paroles, leurs écrits, leurs conseils et leurs critiques ont guidé nos réflexions et ont accepté de nous répondre à nos questions durant nos études.

Nos salutations les plus chaleureuses à nos amies et collègues avec qui nous avons eu la chance de travailler quotidiennement : *Baraa, Hadjer, Zeineb, Maissa, Amira, Ouneissa, Maroua* et *Soundouss*... Sans oublier tous les mycologistes de notre promotion 2016 ... pour leurs échanges et leur amitié qui ont rendu agréable le cadre de ce travail.

On termine en remerciement nos familles, qui se sont intéressées à nos études. Merci également à nos parents, qui nous ont toujours soutenus tout au long de notre scolarité. Sans eux, on n' aurait probablement pas pu arriver là... En espérant qu' ils bénissent toujours nos pas dans ce monde.

Dédicaces

Ce travail est dédié à

Mes grands-parents paternels et maternels

Mes parents

Ma famille

Mes amis et collègues

*Une pensée spéciale pour mes chères amies Randa , Rania, Meryouma, Rayoun,
milka, Assia, bessma, kanan, Mimiche et Jujou ...*

A moi-même.... Zineb

REMARAM Zineb

Dédicaces

Je dédie ce mémoire à :

Mes parents :

Mon père, qui peut être fier et trouver ici le résultat de longues années de sacrifices et de privations pour m'aider à avancer dans la vie. Puisse Dieu faire en sorte que ce travail porte son fruit ; Merci pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutien permanent venu de toi.

Ma mère, qui a œuvré pour ma réussite, de par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie, reçois à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude.

Mes frères et sœurs qui n'ont cessé d'être présents pour moi en étant un exemple de persévérance, de courage et de générosité.

Je remercie également ma binôme REMRAM zineb, de m'avoir soutenu et supporter durant tous ces mois ;

Mes enseignants du département de microbiologie, qui doivent voir dans ce travail la fierté d'un savoir bien acquis.

A tous mes ami(e)s et collègues

MANA YAZID

Liste des abréviations

- AG** : Acides Gras.
- AGPI** : Acides Gras Polyinsaturés.
- AMP** : Adénosine Monophosphate.
- ATP** : Adénosine Triphosphate.
- B** : Bourgeoisements.
- DAC** : Les Diglycérides.
- HOU** : Huiles d'Organismes Unicellulaires.
- LP** : Particules Lipidiques.
- MAG** : Mono-Glycérides.
- OGA** : Oxytetracycline Glucose Agar.
- O** : Ovale.
- PDA** : Potato Dextrose Agar.
- PHB** : Poly- β -Hydroxibutyrate.
- PL** : Les Phospholipides.
- SCO** : Huiles De Cellules Individuelles.
- SM** : Solution Mère.
- TAG** : Les Triacylglycérides.
- YCB** : Yeast Carbon Base.
- YNB** : Yeast Nitrogene Base.
- YPGA** : Yeast Peptone Glucose Agar.

Liste des figures

Figure 1: Exemple de numérotation des carbones et de doubles liaisons de l'acide palmitique..	4
Figure 2: Représentation de la structure d'un phospholipide.....	5
Figure 3: La molécule de sphingosine.....	6
Figure 4: Représentation d'un triglycéride.....	6
Figure 5: La molécule d'ergostérol.....	7
Figure 6: Mécanisme d'induction de l'accumulation de lipides chez les levures oléagineuses...	14
Figure 7: Photographie de stockage d'une levure oléagineuse au microscope optique.....	17
Figure 8 : Lieu d'échantillonnage à Sonatrach (Skikda).....	20
Figure 9 : Champ pétrolier à Hassi-Messaoud.....	21
Figure 10 : Lieu d'échantillonnage à El-Kantara.....	22
Figure 11 : Région d'El- Djemaa à El-Oued.....	23
Figure 12 : Région de Touggourt à Ouargla.....	24
Figure 13 : Technique d'ensemencement sur milieu OGA à partir de solution mère et des dilutions décimales.....	26
Figure 14 : Différents étapes de purification des levures.....	27
Figure 15 : Caractères morphologiques de la souche L9.....	43
Figure 16: Caractères morphologiques de la souche L''5.....	44
Figure 17: Fermentation des sources carbonées de la souche L9.....	45
Figure 18: Fermentation des sources carbonées de la souche L''5.....	45
Figure 19: Tests d'assimilations des sources carbonées de la souche L9.....	46
Figure 20: Tests d'assimilations des sources carbonées de la souche L''5.....	46
Figure 21: Tests d'assimilations des sources azotées de la souche L9.....	47
Figure 22: Tests d'assimilations des sources azotées de la souche L''5.....	47
Figure 23: Test de l'uréase de la souche L9.....	48
Figure 24 : Test de l'uréase de la souche L''5.....	48
Figure 25 : Test de l'osmophilie chez des souches L9 et L''5.....	49

Liste des tableaux

Tableau 1 : Teneurs maximales en lipides totaux associées aux profils en acides gras observées chez différentes espèces de bactéries oléagineuses.....	9
Tableau 2 : Teneurs maximales en lipides totaux associées aux profils en acides gras observées chez différentes espèces de micro-algues oléagineuses.....	10
Tableau 3 : Teneurs maximales en lipides totaux associées aux profils en acides gras observées chez différentes espèces de moisissures oléagineuses.....	11
Tableau 4 : Teneurs maximales en lipides totaux associées aux profils en acides gras observées chez différentes espèces de levures oléagineuses.....	2
Tableau 5 : Performance d'accumulation lipidique (teneur en lipides et rendement) suivant différentes limitations nutritionnelles chez <i>R. glutinis</i>	15
Tableau 6 : Valeurs moyennes du taux spécifique de croissance et du rendement de conversion du glucose en biomasse observables avec une levure oléagineuse.....	16
Tableau 7 : Isolement et purification des levures à partir des différents échantillons naturels explorés.....	32
Tableau 8 : Étude macroscopique des colonies isolées à partir de sols de différentes régions en Algérie.....	33
Tableau 9 : Étude microscopique des souches isolées.....	36
Tableau 10 : Analyse qualitative et quantitative des lipides intracellulaires par coloration au Noir de Soudan B.....	39
Tableau 11 : Caractéristiques morphologiques, biochimiques et physiologiques de levures sélectionnées.....	41

Table de matières

Remerciement	
Dédicace	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
1- Introduction	1
2- Revue bibliographique	3
2.1- Les lipides	3
2.1.1- Définition	3
2.1.2- Classification et fonctionnement des	3
• Les acides gras	4
• Les phospholipides	4
• Les cérides	5
• Les sphingolipides	5
• Les glycérides (MAG, DAG, TAG)	6
• Les stérols et leurs esters	6
2.1.3- Lipides de réserve	7
2.1.4- Les lipides levuriens	7
2.2- Les microorganismes oléagineux	8
2.2.1- Définition et caractéristiques	8
2.2.2- Les bactéries oléagineuses	8
2.2.3- Les algues oléagineuses	9
2.2.4- Les champignons oléagineux	10
2.2.5- Les levures oléagineuses	11
2.3- Accumulation lipidique	13
2.3.1- Généralité	13
2.3.2- Mécanisme de déclenchement de l'accumulation lipidique	13
• Induction du métabolisme d'accumulation	13
• Facteurs influençant l'accumulation lipidique	15
➤ <i>Les limitations nutritionnelles</i>	15
➤ <i>La concentration en oxygène dissous</i>	16
➤ <i>Le pH</i>	16
➤ <i>La température</i>	16
2.3.3- Stockage des substances lipidiques	17

2.3.4- Impact et importance.....	17
3- Matériel et méthodes.....	19
3.1- Écosystèmes explorés.....	19
3.1.1- Raffinerie de Skikda (Sonatrach).....	19
3.1.2- Raffinerie de Hassi-Messaoud (Sonatrach).....	20
3.1.3- Zone de prélèvement à Biskra (El Kantara).....	21
3.1.4- Zone de prélèvement à El-Oued (El-Djemaa).....	22
3.1.5- Zone de prélèvement à Ouargla (Touggourt).....	23
3.2- Technique d'échantillonnage.....	24
3.3- Analyses microbiologiques des sols.....	24
3.3.1- Isolement des souches levuriennes.....	24
➤ Enrichissement.....	24
➤ Préparation de la solution mère.....	25
➤ Préparation des dilutions.....	25
➤ Isolement des levures.....	25
3.3.2- Purification des levures.....	26
3.3.3- Conservation des souches isolées.....	27
3.3.4- Caractéristiques des souches purifiées.....	27
➤ Aspect macroscopique.....	28
➤ Aspect microscopique.....	28
3.3.5- La sélection des souches oléagineuses.....	28
➤ Coloration par noir de soudan B.....	28
➤ Observation des souches colorées.....	29
3.3.6- Identification présomptive des souches sélectionnées.....	29
• Caractéristiques morphologiques des cellules végétatives.....	29
➤ Aptitude à la filamentation.....	29
• Caractéristiques biochimiques.....	30
➤ <i>Fermentation des sucres</i>	30
➤ <i>Assimilation des sources carbonées</i>	30
➤ <i>Assimilation des sources azotées</i>	31
➤ <i>Test de l'uréase</i>	31
• Caractéristiques physiologiques.....	31
➤ <i>Croissance à 37°C</i>	31
➤ <i>Résistance au NaCl</i>	31
4- Résultats.....	32
4.1- Isolement et purification des levures.....	32
4.2- Caractéristiques des souches purifiées.....	33
4.2.1- Aspect macroscopique.....	33
4.2.2- Aspect microscopique.....	36
4.3- Sélection des souches oléagineuses.....	38

4.4-	Identification présomptive des levures oléagineuses sélectionnées.....	41
4.4.1-	Études des caractères morphologiques.....	43
4.4.2-	Caractéristiques biochimiques et physiologiques.....	44
•	<i>Fermentation des sucres</i>	45
•	<i>Assimilation des sources carbonées</i>	46
•	<i>Assimilation des sources azotées</i>	48
•	<i>Test de l'uréase</i>	49
•	<i>Croissance à 37C°</i>	50
•	<i>Résistance au NaCl</i>	50
5-	Discussion	51
6-	Conclusion et perspectives	55
7-	References bibliographiques	57

Annexes

Abstract

ملخص

Résumé

Introduction

1- Introduction

Depuis longtemps, dans les industries huilières, les procédés chimiques utilisés lors des différentes étapes de la production et du traitement de la matière grasse (hydrogénation, raffinage, hydrolyse alcaline des triglycérides ...), avaient tendance à céder la place aux procédés biotechnologiques. Ces derniers présentent une spécificité bien supérieure aux procédés chimiques et des conditions de mise en œuvre plus douces (Papanikolaou, 1998).

Par ailleurs, la demande croissante en continu et l'utilisation de la première génération de biodiesel (esters méthyliques d'acides gras provenant principalement de la transestérification d'huiles végétales), a augmenté le coût des divers produits alimentaires, et cette situation a conduit à la nécessité d'une nouvelle découverte " non conventionnelle " sources d'huiles qui pourraient ensuite être convertis en biodiesel (Ratledge *et al.*, 2008 ; Zhao *et al.*, 2007 ; Aggelis *et al.*, 2009).

A partir de là, un important secteur de la biotechnologie lipidique se concentre sur la capacité des micro-organismes pour convertir diverses substances naturelles dans la réserve lipidique. Ces lipides, à savoir : l'Huile d'Organismes Unicellulaires (H.O.U) ou « *single cell oil*, » produites par des microorganismes dits oléagineux (microbes accumulant des quantités supérieures de 20% en masse de matière grasse rapportée à la matière sèche) (Papanikolaou *et al.*, 2011 ; Triantaphyllidou *et al.*, 2015).

Ce domaine présente de plus d'intérêts aux niveaux scientifiques, économiques et industriels en raison de la capacité des divers microorganismes à synthétiser des lipides qui contiennent une quantité importante d'acides gras polyinsaturés (AGPI) ; tels que acide linoléique (C18), il joue un rôle important dans la constitution et l'intégrité des membranes cellulaires (Sakuradani et Shimizu, 2009).

Les microorganismes oléagineux tels que les champignons et les micro-algues peuvent accumuler des quantités importantes de lipides dépendantes des conditions de culture appropriées. Le potentiel des souches en tant que sources de production de lipides élevées a attiré les attentions des chercheurs (Marjan *et al.*, 2013). Généralement, les levures ont un taux de stockage de lipides élevé dans les corps gras à l'intérieur de cellules (Li *et al.*, 2008 ; Drucken, 2008 ; Mullner *et al.*, 2004; Melickova *et al.*, 2004). Afin de produire ces derniers, les levures peuvent également utiliser des milieux de fermentation à faible coût comme les déchets de produits agricoles et industriels (Amaretti *et al.*, 2012 ; Pirozzi *et al.*, 2014).



C'est sur cette logique que décolle le but de ce travail. Il se repose sur l'isolement des levures oléagineuses performantes, qui ont de capacités importantes de stockage des lipides à l'intérieur de cellules. Pour cela, divers éléments sont abordés en étapes de recherche :

- Isolement et purification des levures à partir des sols des différentes régions en Algérie, pollués en hydrocarbures et/ou riches en matières organiques ;
- Sélection des souches levuriennes oléagineuses en raison de leurs potentiels de productivité lipidique ;
- Recherche des isolats levuriens les plus performants à stocker des corps gras lipidiques ;
- Enfin, identification présomptive des isolats par des tests dichotomiques classiques.

Revue bibliographique

2- Revue bibliographique

2.1- Les lipides

2.1.1- Définition

Le terme « lipide » sert à désigner une famille hétérogène de substances biologiques qui partagent la propriété d'être insoluble dans l'eau, soluble dans les solvants organiques comme le chloroforme, les hydrocarbures ou les alcools (**Najjar, 2010**).

Ces molécules amphiphiles, constituent en solution dans l'eau, des structures dans lesquelles le pôle hydrophobe est enfoui tandis que l'extrémité polaire s'expose en surface au contact de l'eau (micelles, vésicules, etc.). Cela leur permet de constituer des structures bidimensionnelles, telles que des membranes fluides tout en étant totalement imperméables à l'eau et aux molécules polaires, à la base de toutes les membranes biologiques. Ainsi, bien que non polymérisable, cette classe de molécule joue un rôle structural important chez les êtres vivants (membrane cellulaire). Ces molécules constituent également des éléments énergétiques car leur état d'oxydation est très bas (en particulier s'il s'agit de graisses ou de triacylglycérols) (**Beopoulos, 2009 ; Harvey et al., 2011**).

Dans tout le monde vivant, les lipides sont trouvés dans tous les types de cellules, et ces molécules peuvent être impliquées de la régulation de la transcription de gènes à la régulation de voies métaboliques vitales. Néanmoins, on peut diviser les lipides en deux grandes catégories : ceux constitués à partir des acides gras et ceux constitués à partir de stérols (**Voelker et Kinney, 2001**).

2.1.2- Classification et fonctionnement des lipides

Du fait de la grande diversité des lipides et de la difficulté à adopter une définition universelle, il n'existe pas de classification unique des lipides. Dans cette partie en se basant sur leurs propriétés physico-chimiques en présence d'eau, les lipides sont classés en deux groupes « polaires » et « apolaires » (**Beopoulos, 2009**).

Les lipides polaires constituent une classe à part dans les matières grasses puisque comme leur nom l'indique, ces lipides possèdent une partie hydrophile qui leur permet de jouer un rôle prépondérant au niveau des interfaces que ce soit dans les organismes vivants ou dans les systèmes dispersés (**Babau, 2015**).

• Les acides gras

Les acides gras sont les constituants de nombreux types de lipides. Ils sont constitués d'un squelette alcane (R) portant une fonction acide carboxylique terminale (-COOH). Ils se distinguent par une longueur de la chaîne hydrocarbonée variable, son degré d'insaturation, la localisation et la conformation (*cis*, *trans*) des doubles liaisons, la présence et la position de modifications éventuelles (hydroxylation, époxydation, etc) (**Anonyme 1**).

La grande majorité des acides gras naturels présentent les caractères communs suivants : (Figure 1) (**Anonyme 1**).

- ❖ Monocarboxylique ;
- ❖ Chaîne linéaire avec un nombre pair de carbones ;
- ❖ Saturés ou en partie insaturés avec un nombre de double liaisons maximal de 6 ;
- ❖ Le nombre de doubles liaisons (Δ), leurs positions et leurs configurations (*cis* ou *trans*).

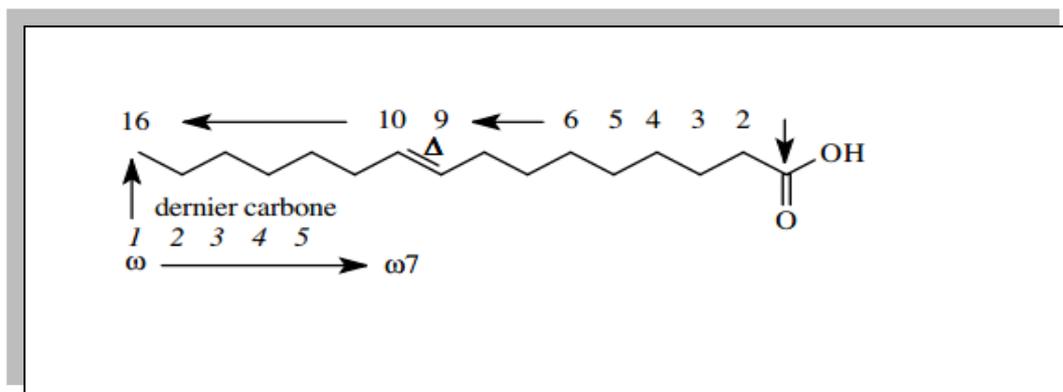


Figure 1 : Exemple de numérotation des carbones et de doubles liaisons de l'acide palmitique. Il peut s'écrire comme C 16 :1 Δ 9, ω 7 ou n-7 (**Beopoulos, 2009**).

• Les phospholipides

Les phospholipides (Figure 2), sont des molécules amphiphiles dont les parties hydrophobes peuvent s'associer entre elles, en excluant l'eau du milieu, les parties hydrophiles restant en interaction avec l'environnement aqueux, ce qui a pour conséquence la formation spontanée de bicouches, à l'origine des membranes (**Beopoulos, 2009 ; Babau, 2015**). Ces membranes permettent aux cellules de séparer leurs constituants internes de l'environnement externe. C'est ce même principe que la cellule utilise afin de différencier ses organelles. La parcellisation

permet la ségrégation des réactions chimiques, d'accroître leur efficacité biochimique et d'éviter la dispersion des produits réactionnels.

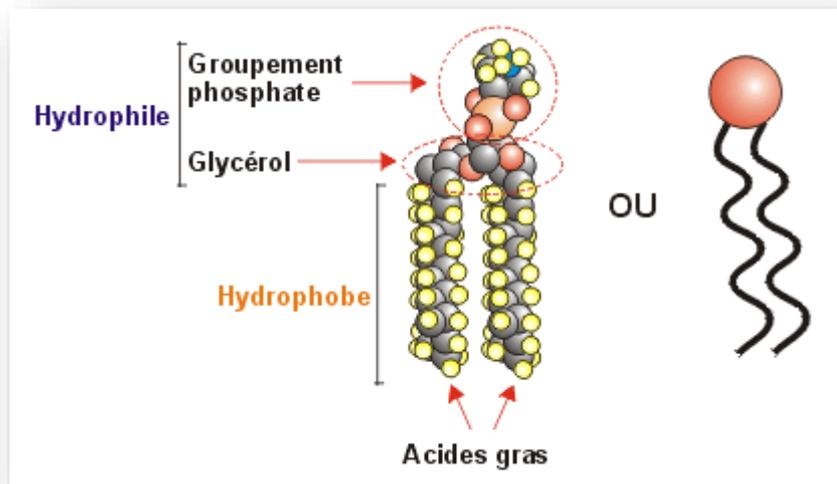


Figure 2 : Représentation de la structure d'un phospholipide (Babau, 2015).

Les phospholipides sont donc composés d'un squelette glycérol contenant des chaînes acyles liées par une liaison ester en positions *sn1* et *sn2*. Le troisième carbone est estérifié par une liaison phosphodiester d'un dérivé X de l'acide phosphorique (XPO_4) et constitue la tête polaire (Babau, 2015).

- **Les cériques**

Ils doivent leur nom générique au fait qu'ils sont les principaux constituants des cires animales, végétales et bactériennes. Les cériques sont des monoesters d'acides gras et d'alcools aliphatiques à longue chaîne qui sont en général des alcools primaires, à nombre pair de carbones, saturés et non ramifiés (Beopoulos, 2009 ; Ochoa, 2014 ; Babau, 2015).

- **Les sphingolipides**

Il s'agit du deuxième constituant des membranes, étant présent dans la membrane plasmique à des concentrations très faibles, à hauteur de 0,4% (g lipide /g biomasse). Ils dérivent tous d'une même molécule la sphingosine (Figure 3). Elle peut fixer un phosphate sur son OH primaire et un AG sur sa fonction NH_2 . Dès lors, la liaison sur un groupement phosphate donnera un sphingolipide. Il y a deux types de sphingolipides chez la levure : la dihydrosphingosine et la phytosphingosine. Les sphingolipides de la levure contiennent majoritairement la phytosphingosine. Sa similarité de structure avec la PC lui confère des propriétés analogues. (Beopoulos, 2009 ; Ochoa, 2014 ; Babau, 2015).

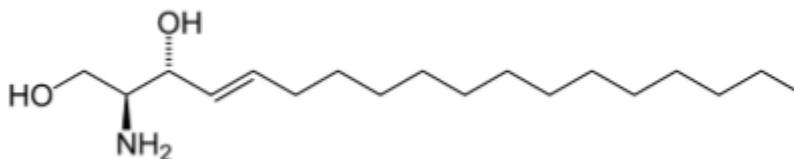


Figure 3 : La molécule de sphingosine (**Beopoulos, 2009**).

- **Les glycérides (MAG, DAG, TAG)**

Les glycérides comprennent les mono-glycérides (MAG), les diglycérides (DAG) et les triglycérides (TAG) selon le degré de substitution du squelette du glycérol. Ils sont capables de former des membranes en solution dans l'eau, toutefois dans une cellule ils n'ont pas ce rôle, ils constituent plutôt une réserve de lipide pour une utilisation ultérieure. Il s'agit des graisses neutres. On distingue les TAG simples, où tous les carbones du glycérol sont estérifiées par le même acyl ($R_1 = R_2 = R_3$), comme la tristéarine (bougie) ou la trioléine (huile d'olives) ; des TAG mixtes avec au moins un R différent des deux autres comme chez le cacao (Figure 4) (**Beopoulos, 2009 ; Ochoa, 2012**). Les molécules utilisées pour la constitution du TAG sont des diglycérides modifiés. Deux groupements hydroxyles sont impliqués dans une liaison avec les acides gras, au troisième se fixe un groupement de nature variée et fortement polaire. L'un des plus connus est l'ion phosphate - la molécule résultante étant un phospholipide - qui sert de point de fixation à diverses molécules telles que la choline (**Ochoa, 2012**).

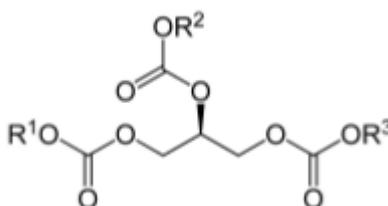


Figure 4 : Représentation d'un triglycéride (**Beopoulos, 2009**).

- **Les stérols et leurs esters**

Les stérols sont une famille de lipides dérivés du noyau cholestérol. Le chef de file est le cholestérol chez les animaux, la famille des terpènes chez les végétaux et l'ergostérol chez les champignons et les levures. Ils sont spécifiques des eucaryotes et sont bien représentés chez les animaux. Ils sont présents principalement dans la couche extérieure de la membrane plasmique.

Les stérols constituent des tampons de fluidité : de même que certains acides faibles constituent des tampons de pH, ils permettent de conserver une fluidité à peu près constante dans une gamme de température plus large. Chez les animaux, les stérols sont à la base de toute une famille d'hormones, les hormones stéroïdes (**Beopoulos, 2009**). Chez les levures, l'ergostérol (Figure 5) qui représente environ 50% des stérols totaux est généralement trouvé sous forme libre et associé à la membrane plasmique. Les 50% restant sont en général des intermédiaires de biosynthèse qui sont estérifiés et localisés dans des particules lipidiques. L'ergostérol joue aussi un rôle dans la formation des radeaux ou rafts qui sont des micro-domaines de la membrane impliqués dans le trafic membranaire et la signalisation cellulaire (**Bagnat et al., 2000**). Les stérols en général jouent en plus un rôle dans l'endocytose chez la levure (**Munn et Riezman, 1994**).

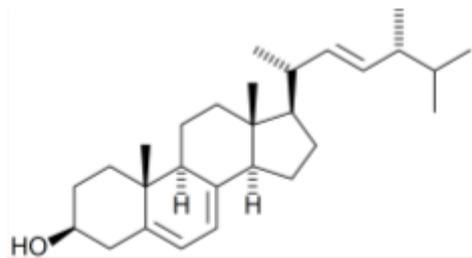


Figure 5 : La molécule d'ergostérol (**Beopoulos, 2009**).

2.1.3- Lipides de réserve

Les lipides de réserve sont les triglycérides ou plus exactement les triacylglycérols (TAG). Il s'agit de molécules très hydrophobes, constituant une forme de réserve de l'énergie cellulaire, formées par l'estérification de trois acides gras sur une molécule de glycérol. L'acide phosphatidique est un intermédiaire de la synthèse des TAG mais aussi à la base de la synthèse des phospholipides. Les diacylglycérols et monoacylglycérols sont des intermédiaires de la synthèse des TAG et représentent entre 0 à 5% des lipides totaux (**Beopoulos, 2009**).

2.1.4- Les lipides levuriens

Une levure est un mycète unicellulaire possédant un seul noyau vrai et se reproduisant soit de façon asexuée par bourgeonnement et division transversale soit de façon sexuée par formation de spores. Chaque bourgeon qui se sépare, se développe en une nouvelle levure ; certains restent

groupés pour former des colonies. Généralement la taille des cellules de levures est plus grande que celle des bactéries, leur longueur ne dépassant pas une dizaine de micromètres (**portelli, 2011**). Les levures sont entourées d'une paroi rigide étroitement liée à la membrane plasmique sous-jacente. Cette dernière, entoure les cellules d'où sa fonction fondamentale est d'isoler le milieu intracellulaire du milieu extérieur. L'épaisseur de ces membranes est de l'ordre de sept nanomètres. Toute membrane cellulaire présente une zone centrale hydrophobe entourée de deux zones périphériques hydrophiles.

Les constituants principaux de la membrane plasmique sont les lipides, les protéines et de courtes chaînes formées par l'association de quelques molécules de sucre simple qui sont à leur tour liées à des protéines ou des lipides formant ainsi des glycoprotéines ou des glycolipides (**portelli, 2011**).

2.2- Les microorganismes oléagineux

2.1- Définition et caractéristiques

Le métabolisme lipidique est présent chez tous les microorganismes. Néanmoins l'accumulation de réserves lipidiques majoritairement constituées d'acides gras existe principalement chez les cellules eucaryotes. Du fait de la toxicité des acides gras libres, c'est sous la forme d'esters de stérol et de triacylglycérols qu'ils sont principalement stockés dans les cellules eucaryotes. Lorsque la teneur en lipides accumulés atteint un minimum de 20 % de la masse sèche des cellules, le micro-organisme est dit oléagineux ou lipogène (**Cescut, 2009; Portelli, 2011; Babau, 2015**).

Les micro-organismes oléagineux peuvent être des bactéries, des champignons ou des micro-algues.

2.2- Les bactéries oléagineuses

Le potentiel bactérien d'accumulation de triacylglycérols (TAG) est aujourd'hui en cours d'exploration (**Babau, 2015**). Les bactéries accumulent en général moins de lipides que les autres micro-organismes (Tableau 1), le taux moyen d'accumulation étant situé entre 20 et 40%. L'avantage majeur des bactéries oléagineuses est leur taux de croissance élevé et une culture facile à mettre en œuvre s'il n'y a pas filamentation (**Shi et Valle-Rodriguez, 2011**).

Cependant, des taux élevés en triacylglycérides ont été quantifiés chez les Actinomycétales (*Nocardia sp.*, *Mycobacterium sp.*, *Rhodococcus sp.*). La bactérie *Arthrobacter AK19* peut

produire jusqu'à 70% de lipides (g lipides /g biomasses sèche) composés à 90% de triglycérides. Mais la faible vitesse de croissance de ces micro-organismes rend leur utilisation difficile. (Portelli, 2011).

Enfin, les bactéries filamenteuses du genre *Streptomyces* synthétisent aussi des triacylglycérols sous limitation azote jusqu'à un taux intracellulaire maximal de 25% en masse sèche (Arabolaza *et al.*, 2008).

Tableau 1 : Teneurs maximales en lipides totaux associées aux profils en acides gras observées chez différentes espèces de bactéries oléagineuses (Babau, 2015).

Bactéries	Pourcentage d'accumulation lipidique %	Références
<i>Acinetobacter sp.211</i>	25	Alvarez <i>et al.</i> , 1997
<i>Arthrobacter AK19</i>	78	Wayman <i>et al.</i> , 1984 d'après Boutlon et Ratledge, 1984
<i>Pseudomonas aeruginosa 44T1</i>	38	Alvarez <i>et al.</i> , 2002
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	21	Alvarez <i>et al.</i> , 2002
<i>Rhodococcus opacus</i>	87	Alvarez <i>et al.</i> , 2002
<i>Rhodococcus ruber</i>	26	Alvarez <i>et al.</i> , 2002
<i>Nocardia corralina</i>	23.9	Alvarez <i>et al.</i> , 2002

2.3- Les algues oléagineuses

La recherche concernant les micro-algues oléagineuses a débuté dans les années soixante-dix et s'est intensifiée au cours des dernières années. Alors que le caractère autotrophe des algues permettant l'utilisation de dioxyde de carbone comme substrat est un point fort dans leur utilisation industrielle, leur cinétique de croissance demeure lente comparativement aux autres micro-organismes allant de 3 à 5 jours Avec un taux d'accumulation très intéressant pouvant excéder 70%. Les huiles produites sont composées majoritairement d'acides gras insaturés comme les acides palmitoléique, oléique, linoléique et linoléinique, il reste de nombreux verrous

scientifiques et technologiques sur lesquels des équipes de recherche et des industriels se mobilisent afin de faire émerger la filière (Tableau 2) (Meng *et al.*, 2009).

La productivité théorique en huile des microalgues est supérieure à celle des plantes terrestres et leur développement peu lié à la disponibilité en terres agricoles. Cependant, en comparaison d'autres microorganismes, la culture de microalgues pour la production de lipides demande une grande surface de par leur activité photosynthétique 24h (Shi et Valle-Rodriguez, 2011). Cette dernière demande donc l'approvisionnement en énergie solaire conséquente laissant les cultures tributaires des conditions climatiques et du cycle circadien 24h (Shi et Valle-Rodriguez, 2011). La nuit, il peut même avoir reconsommation des lipides produits le jour. De plus, la densité cellulaire de ces cultures est faible et implique une demande forte en eau (Chisti, 2007). Enfin, le génôme des microalgues étant peu étudié, les stratégies d'ingénierie génétiques semblent pour l'instant difficiles à mettre en place.

Tableau 2 : Teneurs maximales en lipides totaux associées aux profils en acides gras observées chez différentes espèces de micro-algues oléagineuses (Babau, 2015).

Micro- algue	Pourcentage d'accumulation lipidique %	Références
<i>Chlirella vulgaris</i>	40	Ratledge <i>et al.</i> , 2002
<i>Cyclotella DI-35</i>	42	Sheehan <i>et al.</i> , 1998
<i>Cylindrotheca closterium</i>	17-20	Pruvost <i>et al.</i> , 2011
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	71.4	Takagi <i>et al.</i> , 2006
<i>Hantzchia DI-160</i>	66	Sheehan <i>et al.</i> , 1998
<i>Nannochloris oculata</i>	19.3- 59.3	Van vooren <i>et al.</i> , 2012
<i>Nannochloris sp</i>	68	Sheehan <i>et al.</i> , 1998
<i>Neochloris oleabundans</i>	25-37	Pruvost <i>et al.</i> , 2009
<i>Nitzschia sp</i>	50	Sheehan <i>et al.</i> , 1998
<i>Schizochytrium limacinum</i>	50-77	Yokoshi <i>et al.</i> , 1998
<i>Thalassiosira pseudomona</i>	21-31	Brown <i>et al.</i> , 1996

2.4- Les champignons oléagineux :

En 1984, Ratledge dénombra 64 espèces de champignons capables d'accumuler plus de 25% de lipides intracellulaires mais un très grand nombre d'espèces accumulent entre 20 et 25%. La qualité d'être oléagineux est en général souche dépendante et non espèce dépendante. Parce que les champignons filamenteux se développent sous forme de mycélium et non sous forme de cellules isolées, leur culture en milieu liquide est très difficile. Les cultures sont donc en général statiques, mais ne permettent pas une homogénéité des cultures et la maîtrise des paramètres de culture (pH, oxygène, mélange, etc.) (Tableau 3) (Portelli, 2011).

La faible vitesse de croissance des champignons filamenteux et l'impact de la filamentation sur les transferts de masse, de chaleur et de quantité de mouvement rendent problématique la mise en œuvre industrielle de ces microorganismes (Cescut, 2009 ; Babau, 2015).

Tableau 3 : Teneurs maximales en lipides totaux associées aux profils en acides gras observées chez différentes espèces de moisissures oléagineuses (Babau, 2015).

Champignons filamenteux	Pourcentage d'accumulation lipidique %	Références
<i>Cunninghamella japonica</i>	60	Ratledge <i>et al.</i> , 2002
<i>Entomophthora coronata</i>	43	Ratledge <i>et al.</i> , 2002
<i>Mortierella alpina</i>	50	Ratledge <i>et al.</i> , 2002
<i>Mucor circinelloides</i>	25	Ratledge <i>et al.</i> , 2002
<i>Pythium ultimum</i>	48	Ratledge <i>et al.</i> , 2002

2.5- Les levures oléagineuses

Les levures se distinguent par leur facilité de culture. Le nombre de levures oléagineuses est réduit en comparaison au nombre total de levures connues (plus de 600) (Ratledge, 1984). Parmi les levures oléagineuses, il existe deux catégories : celles qui accumulent entre 20 et 30% de lipides et celles qui peuvent accumuler plus de 40% (g lipides/g de biomasse). L'efficacité

de conversion du substrat en lipides dépend de la nature du substrat, de la présence des autres éléments nutritionnels et des conditions de culture, il a donc fallu trouver un critère de détermination des microorganismes oléagineux plus précis. Ratledge a donc proposé que la qualité d'être oléagineux repose plutôt sur le fait de posséder les enzymes nécessaires à la synthèse de lipides de réserve, et plus particulièrement l'ATP-citrate lyase. Ainsi, selon certaines conditions, même *Saccharomyces cerevisiae* peut accumuler jusqu'à 22% de lipides (g lipides /g de biomasse) mais ne possède pas d'ATP-citrate lyase. Les genres présentant des souches oléagineuses sont principalement *Lipomyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Endomyces*, *Rhodosporidium*, *Rhodotorula* et *Yarrowia* dont certaines sont représentées dans le tableau 4. Ainsi, *Rhodosporidium toruloides* et *Lipomyces starkeyi* peuvent accumuler des lipides jusqu'à un taux de 60% et 70% en masse sèche, respectivement (Meng *et al.*, 2009).

Tableau 4 : Teneurs maximales en lipides totaux associées aux profils en acides gras observées chez différentes espèces de levures oléagineuses (Babau, 2015).

Levures	Pourcentage d'accumulation lipidique %	Références
<i>Cyptococcus curvatus</i>	46	Hassan <i>et al.</i> , 1996
<i>Candida 107</i>	40	Hall <i>et al.</i> , 1977
<i>Lipomyces lipofer</i>	44	Boutlon <i>et al.</i> , 1981
<i>Lipomyces stakei</i>	36	Angerbauer <i>et al.</i> , 2008
<i>Rhodotorula glutinis</i>	68	Granger, 1992 ; Cescut, 2009
<i>Rhodotorula graminis</i>	72	Ratledge <i>et al.</i> , 2002
<i>Yarrowia lipolytica</i>	36	Ratledge <i>et al.</i> , 2002
<i>Candida albidus</i>	36	Hansson <i>et al.</i> , 1986

3- Accumulation lipidique

3.1- Généralité

Chez les organismes oléagineux le déclenchement de l'accumulation de lipides a lieu normalement quand la levure est cultivée en présence des grandes quantités de la source carbonée tandis que la source azotée est limitée (**Achoa, 2012**), normalement apporté sous forme de NH_4^+ . Pour mesurer le taux d'accumulation des lipides dans une levure, le milieu de culture doit être préparé de façon à être limitant en azote et en excès de carbone. Lorsque l'azote devient indisponible, les cellules ne peuvent plus proliférer, car l'azote est essentiel à la biosynthèse des protéines et des acides nucléiques. Pourtant, le carbone continue à être assimilé par les cellules (**Beopoulos, 2009**). Ces dernières, convertissent le substrat incorporé en acide gras et en triglycérols, qui vont immédiatement être stockés dans les corps lipidiques. Outre l'azote, d'autres nutriments peuvent également être limitant pour la croissance. Il peut s'agir, par exemple, du phosphate, du magnésium, du sulfate ou du fer. Néanmoins, ces nutriments sont susceptibles d'affecter des processus métaboliques autres que la biosynthèse de protéines et la production des acides nucléiques. Cela conduit à un taux de croissance moins important. Les organismes non – oléagineux n'accumulent pas autant de lipides. Lors d'une limitation en azote, certains de ces organismes cessent de croître et peuvent accumuler les hydrocarbures disponibles dans le milieu de culture et les convertir en divers polysaccharides (glycogène, glucanes, mannanes). Dans ce dernier cas l'accumulation de lipides peut atteindre 15% de la biomasse (**Ratledge, 1994**).

3.2- Mécanisme de déclenchement de l'accumulation lipidique

3.2.1- Induction du métabolisme d'accumulation

Une limitation ou une carence en azote du milieu de culture du microorganisme oléagineux induit des réactions aboutissant à la surproduction d'acétyl-CoA (**Hall et al., 1977 ; Briffaud et Engasser, 1979 ; Boulton et Ratledge, 1981 ; Davies et Holdsworth, 1990 ; Moresi et al., 1994 ; Anastassiadis et Rehm, 2005**) (Figure 6).

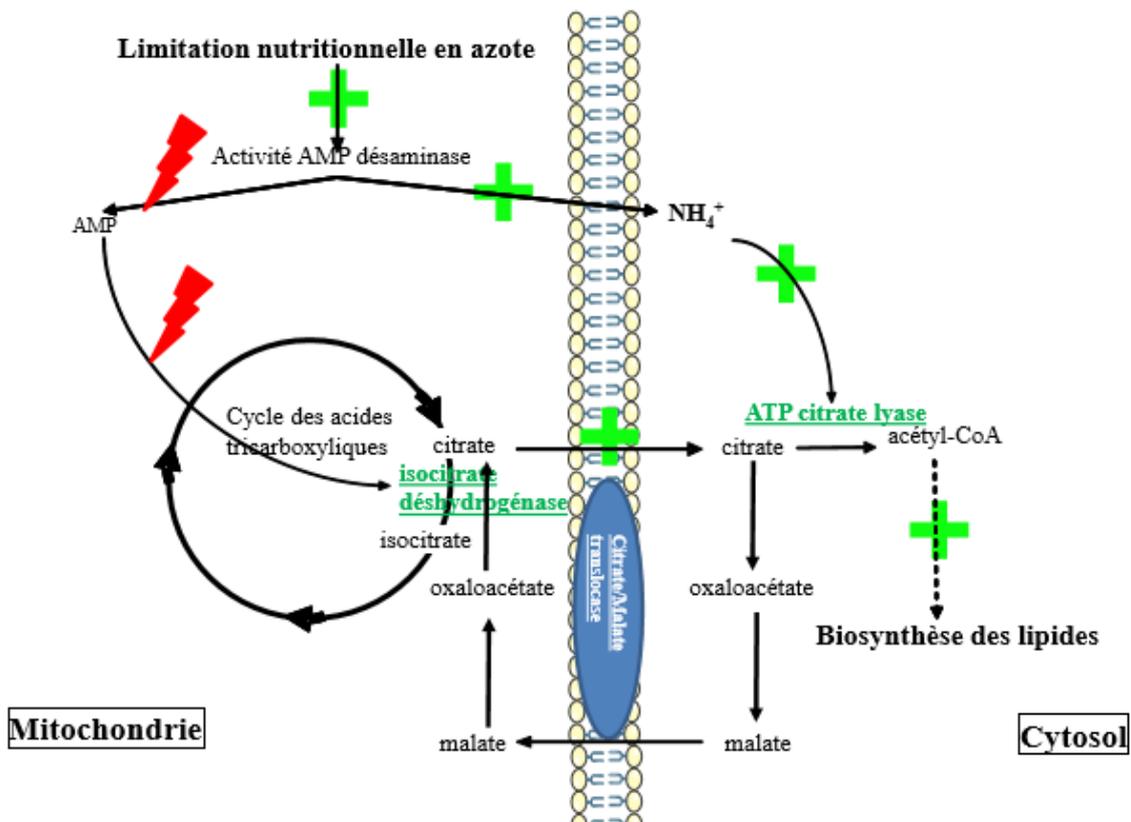
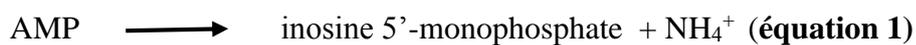


Figure 6 : Mécanisme d'induction de l'accumulation de lipides chez les levures oléagineuses (Babou, 2015).

Lors de la limitation en azote, il y a augmentation de l'activité de l'adénosine monophosphate (AMP) désaminase qui catalyse la réaction décrite par l'équation 1. Cette enzyme pourrait être aperçue comme le mécanisme permettant d'atténuer la déficience d'azote nécessaire à la synthèse des protéines et des acides nucléiques pour la prolifération cellulaire à court-terme lorsqu'une limitation nutritionnelle s'impose. D'après (Hamid *et al.* 2001 ; Wynn *et al.*, 2002) ce mécanisme engendre aussi un ralentissement de la consommation d'oxygène après l'épuisement d'azote dans le milieu de culture chez les microorganismes oléagineux



Ainsi, l'augmentation d'activité de cette enzyme entraîne une baisse de la concentration en AMP dans le cytosol et dans la mitochondrie avec également une augmentation de la concentration en ion ammonium (Boulton et Ratledge, 1981). La diminution de la concentration en AMP dans la mitochondrie stoppe l'activité de l'isocitrate déshydrogénase. Ce phénomène s'explique soit par le fait que cette enzyme est strictement dépendante de la présence d'AMP, soit parce que l'accumulation de NH_4^+ diminuerait l'effet de rétro-inhibition

du citrate sur la phosphofructokinase autorisant un flux illimité de carbone à travers la glycolyse (**Habison et al., 1979 ; Kubicek et Röhr, 1980**). De ce fait l'isocitrate ne peut plus être catabolisé ; il s'accumule et s'équilibre avec l'acide citrique (action de l'enzyme aconitase). Le citrate s'accumule alors dans la mitochondrie. Les mitochondries des levures oléagineuses sont reconnues comme possédant une concentration en citrate de trois à quatre fois supérieure par rapport aux levures non oléagineuses (**Evans et al., 1983 ; Babou, 2015**), ce qui permet ensuite la mise en place du métabolisme d'accumulation des lipides selon les étapes décrites ci-dessus.

3.2.2- Facteurs influençant l'accumulation lipidique

- *Les limitations nutritionnelles*

Bien que la limitation ou la carence en azote soit la plus connue et donc la plus étudiée pour la synthèse lipidique, d'autres éléments peuvent avoir un effet similaire. Ainsi, par exemple, l'effet de la carence en phosphore, zinc ou fer a été testé sur la production de lipides d'une souche de *Rhodotorula glutinis* sur substrat glucose (**Granger et al., 1993**). Bien que le métabolisme lipidique soit initié lors de l'ensemble des carences testées, il en ressort que les meilleurs rendements apparents de conversion du sucre en lipides sont observés lors d'une limitation en azote (Tableau 5).

Tableau 5 : Performance d'accumulation lipidique (teneur en lipides et rendement) suivant différentes limitations nutritionnelles chez *R. glutinis* (**Granger, 1992**).

Limitation	% lipide [glip.gX ⁻¹]	Rendement maximum [mglip.gglu ⁻¹]
Azote	31.1%	139.0
Zinc	6.1%	33.4
Fer	23.3%	104.5
Phosphore	18.2%	97.5

- **La concentration en oxygène dissous**

Chez les levures aérobies strictes, l'ensemble de leurs fonctionnements est affecté lorsqu'elle se trouve en limitation en oxygène. Les résultats présentés dans le Tableau 6 mettent en évidence l'impact de la concentration en oxygène dissous sur le taux de croissance et le rendement apparent de conversion du glucose en biomasse (**Granger, 1992**).

Tableau 6 : Valeurs moyennes du taux spécifique de croissance et du rendement de conversion du glucose en biomasse observables avec une levure oléagineuse (**Granger, 1992**).

[O ₂] dissous [%]	μ [h ⁻¹]	RS/X [CmolX.Cmolglu ⁻¹]
8.0 < [O ₂] dissous < 20	0.260	0.69
0.4 < [O ₂] dissous < 1.2	0.056	0.42

Ces résultats montrent l'importance de contrôler la concentration en oxygène dissous afin de cultiver la souche dans un environnement non limitant en oxygène c'est-à-dire avec une concentration en oxygène dissous supérieure à 20% (**Babou, 2015**), ces résultats ont été obtenus avec différentes concentrations en oxygène dissous en réacteur agité glucose initial à 50g.L⁻¹, T : 30°C, pH 5.5 (**Granger, 1992; Babou, 2015**).

- **Le pH**

La vitesse de synthèse des acides gras et le rendement de conversion du glucose en acides gras semblent être maximaux pour un pH de 5.5. Le rendement carbone semble augmenter avec le pH, jusqu'à la valeur de 0.55 g.g⁻¹ atteinte pour un pH de 7 ; au-delà, la croissance et la production sont inhibées. La vitesse de production croît également avec le pH jusqu'à la valeur-pallier de 5.5 où elle atteint un maximum de 0.28 mg.gx⁻¹.h⁻¹ (**Johnson et al., 1992, Granger, 1992**).

- **La température**

Selon Suutari (1990), les levures « s'adaptent » aux changements de températures. Ces travaux concernent les changements de compositions des acides gras des souches *Candida oleophila*, *Candida utilis*, *Lipomyces starkeyi*, *Rhodospiridium toruloides* et *Saccharomyces cerevisiae* pour des températures d'incubation inférieures à 20°C et supérieures à 26°C. Les résultats de ces expérimentations démontrent que les mécanismes d'adaptation portant sur les acides gras

varient en fonction des souches. Pour *S. cerevisiae*, *C. oleophila*, *C. utilis* et *L. starkeyi* la réponse à une modification de la température est un changement du nombre moyen de carbone des acides gras.

3.2.3- Stockage des substances lipidiques

Les lipides neutres sont accumulés et stockés dans des organelles dérivés du réticulum endoplasmique appelés particules lipidiques (LP), gouttelettes lipidiques ou corps lipidiques (Figure7). Les LP, qui ont récemment acquis le statut d'organelle, ne sont pas un simple compartiment de stockage, mais une structure dynamique qui participe activement au maintien de l'homéostasie lipidique (Babou, 2015).

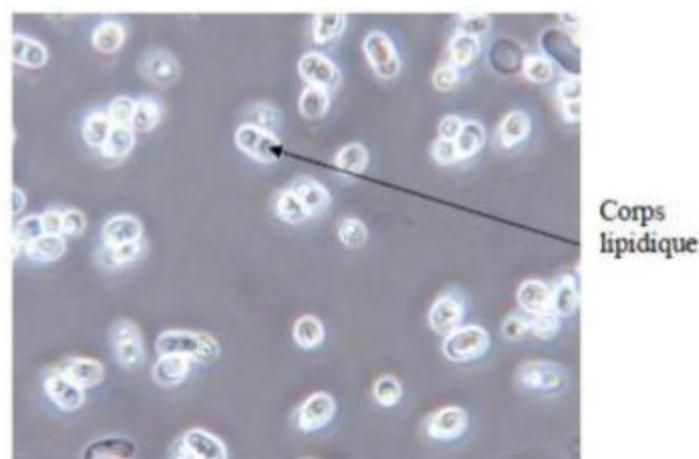


Figure 7 : Photographie de stockage d'une levure oléagineuse au microscope optique (Babou, 2015).

4- Impact et importance

L'utilisation de micro-organismes oléagineux (qui peuvent accumuler les lipides à un pourcentage supérieur à 20% de leur masse cellulaire sèche) comme sources de matières grasses (huiles de cellules individuelles SCO) dans les opérations à l'échelle industrielle présente un grand intérêt (Papanikolaou, 2011). D'après Céline (2012), les industriels utilisateurs de corps gras représentent une filière très diversifiée, majoritairement constituée par les industries agroalimentaires, ainsi que les usages cosmétiques des corps gras végétaux sont aujourd'hui assez répandus. De ce fait, le développement induit par la mise au point des produits biosourcés, représente un enjeu considérable.

Renaud (1990), a mentionné une des huiles microbiennes importante à savoir les acides gras polyinsaturés, linoléique (C18: 2) et linoléinique (C18: 3) ces dernières ne sont pas synthétisés par le corps humain et, par conséquent, elles doivent être obtenues à partir de l'apport

alimentaire des aliments qui les contiennent. Il a été mentionné aussi par Li *et al.* (2008), que les huiles microbiennes pourraient devenir l'une des matières premières de pétrole potentiel pour la production de biodiesel. D'autre façon, Chatzifragkou *et al.* (2013), ont rapporté que les biodiesels sont méthyliques d'acides et les esters éthyliques gras dérivés de sources lipidiques renouvelables et ces carburants sont de bonnes alternatives aux combustibles fossiles en raison d'être renouvelable, biodégradable et non toxique.

De son tour, Steen *et al.* (2010), ont mentionné que les levures oléagineuses servent de source renouvelable d'huile comestible et d'un produit intermédiaire pour l'oléochimie tels que des carburants, des savons, des matières plastiques, des peintures, des détergents, des textiles, du caoutchouc, des tensioactifs, des lubrifiants, des additifs pour les aliments et les industries cosmétiques.

Matériel et méthodes

3- Matériel et méthodes

Le présent travail porte principalement sur la collection des levures oléagineuses, les plus performantes, à partir de différents sols en Algérie. Il se propose dans une première étape d'isoler des levures à partir des sites de prélèvements qui suivent ; Skikda et Hassi-Messaoud (Sonatrach), Biskra (El-Kantara), EL-Oued (El- Djemaa) et Ouargla (Touggourt). Quant à la deuxième étape, un test de coloration nous a permis de sélectionner les isolats oléagineux. Enfin, parmi ces derniers, les levures les plus performantes sont retenues pour une identification présomptive. Ce travail a été réalisé au sein du Laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM) à Chaab-Erssas, Université des Frères Mentouri, Constantine.

3.1- Écosystèmes explorés

Les échantillons proviennent de plusieurs niches écologiques ; en l'occurrence : d'une part, des zones polluées en hydrocarbures (Skikda et Hassi-Messaoud) et d'autre part, des oasis sahariens et sub-sahariens riche en matière carbonée (Biskra, El Oued et Ouargla).

3.1.1- Raffinerie de Skikda (Sonatrach)

La raffinerie de Skikda (Sonatrach) est située dans la zone industrielle à 2Km de la mer (**Hadef et Soukehal, 2004**). La ville est par sa situation géographique, bénéficie d'un climat méditerranéen très favorable caractérisé par un hiver doux et humide en minimale de 11°C au mois de Janvier, et un été chaud et sec avec une température maximale de 28.05°C au mois d'Août (**Djema, 2013**).

La zone d'échantillonnage était précisément autour des bacs au niveau du service d'exploitation de la raffinerie de Skikda (Sonatrach) (Figure 8). Le sol qui caractérise cette zone est du type solide, contaminé par les hydrocarbures. (**Guergouri, 2010**).



Figure 8 : Lieu d'échantillonnage à Sonatrach (Skikda).

3.1.2- Raffinerie de Hassi-Messaoud (Sonatrach)

Le champ de Hassi-Messaoud occupe la partie centrale de la province triasique. De par sa superficie et ces réserves, il est le plus grand gisement de pétrole d'Algérie et, s'étend sur près de 2200 Km² de superficie. Le climat qui caractérise la région est désertique vu que c'est une zone éco-climatique aride, d'où la température est entre 0°C et 47°C (**Haddad et Boudjada, 2015**).

La zone d'échantillonnage était au niveau de la raffinerie de Hassi-Messaoud (Figure 9), autour des bacs (d'où il y avait des fuites du pétrole lors de raffinage). Le sol qui caractérise cette zone est du type sableux, humide, contaminé par le pétrole. (**Djerbaoui, 2011**).



Figure 9 : Champ pétrolier à Hassi-Messaoud (www.lemidi-dz.com).

3.1.3- Zone de prélèvement à Biskra (El Kantara)

La wilaya de Biskra se trouve dans le Nord-Est du Sahara algérien avec une altitude de 124m. Sa latitude est de 34.48m Nord et sa longitude est de 05.44 m Est, et elle s'étend sur une superficie de 216712 km². La position géographique de la région, lui donne un climat instable. Ce climat est influencé relativement par le froid surtout en hiver et par les hautes températures dues aux vents soufflant depuis le Sud en été et du sirocco (vent chaud et sec). (**Achoura et Belhamra, 2010**)

Notre échantillon a été prélevé autours des palmeraies (Figure 10), d'où le sol d'après Achoura et Belhamra (2010), est généralement d'une texture équilibré riche en matières organiques.



Figure 10 : Lieu d'échantillonnage à El-Kantara .(www.lemidi-dz.com).

3.1.4- Zone de prélèvement à El-Oued (El-Djemaa)

La Wilaya d'El-Oued est située au Sud-Est de l'Algérie elle à une superficie de 44586.80Km². La ville est surnommée « La ville aux mille coupes » elle se trouve à 720 Km au Sud d'Alger (**Boudemagh, 2007**). Cette région se caractérise par un climat aride de type saharien désertique. En hiver, la température baisse au-dessous de 0°C alors qu'en été, elle atteint 50°C. La pluviométrie moyenne varie entre 80 et 100 mm/an (période d'Octobre à Février).

L'échantillon pris dans cette région est également à partir des palmeraies dans la région d'El-Djemaa (Figure 11), cette dernière est une région connue par son type du sol sableux.



Figure 11 : Région d'El- Djemaa à El-Oued (www.alamy.com).

3.1.5- Zone de prélèvement à Touggourt

La région de Touggourt est un ensemble d'oasis qui se situe dans le Sud-Est de l'Algérie (Figure 12), à la bordure occidentale de l'impressionnant océan de dunes qu'on appelle « Grand Erg Oriental ». Elle s'étend sur environ 140 km du Nord au Sud, le long d'Oued Righ, dont les eaux suivent pour l'essentiel un cours souterrain. Le climat de la région Touggourt est typiquement Saharien. Il est caractérisé par de très basses températures au mois de Février (température moyenne mensuelle de 5.2°C) ; alors que le mois de Juillet signale de hautes températures (température moyenne mensuelle de 34.4°C). L'humidité dans cette zone est relativement faibles (**Sebaa, 2014**).

Notre échantillon a été prélevé à partir des palmeraies, d'où le sol est de type sablo-limoneux (**Cortin, 1969 ; Achour, 2003**). Ce sol a un caractère hydromorphe, ce qui engendre la remontée des niveaux de nappes phréatiques et de la concentration des sels (**Khedraoui, 2006**).



Figure 12 : Région de Touggourt à Ouargla (www.algerie-monde.com).

3.2- Technique d'échantillonnage

Les échantillons du sol, cités précédemment, sont prélevés après avoir écarté les cinq premiers centimètres de la couche superficielle de la terre. Les prélèvements concernant les zones : Touggourt, El-Oued et El-Kantara ont été effectués dans les contours des palmiers en raison de la présence de la matière organique. Alors que, les prélèvements concernant les zones : Skikda et Hassi-Messaoud, dont les sols sont pollués aux hydrocarbures, ont été fait autour des bacs de stockage.

Les échantillons (des cinq sols) sont récupérés aseptiquement dans des flacons stériles qui sont ensuite acheminés jusqu'au laboratoire où ils ont subis des analyses microbiologiques.

3.3- Analyses microbiologiques des sols

3.3.1- Isolement des souches levuriennes

➤ Enrichissement

Les échantillons des sols ont été mis séparément dans un milieu d'enrichissement liquide « pour les levures » (Annexe 1), ce qui permet la multiplication des microorganismes recherchés. Cinq grammes de chaque échantillon du sol ont été inoculés dans des erlenmeyers de 250 ml avec un volume final de 100 ml. Ce milieu est additionné de l'antibiotique (Amoxicilline), qui sert à

inhiber la croissance des bactéries. L'incubation a été effectuée à 30 °C sous agitation de 150 rpm pendant 24h (**Polbure et al., 2015**).

➤ **Préparation de la solution mère**

A partir de la culture obtenue pour chaque sol, 1 ml de chaque échantillon enrichi est introduit dans des tubes à essai contenant 9 ml d'eau physiologique stérile (Annexe10). Les tubes sont ensuite agités pendant 10 minutes. Le contenu des tubes représente la solution mère (**Ulacio et al., 1997**).

➤ **Préparation des dilutions**

Dans un tube à essai contenant 9 ml d'eau physiologique stérile, 1 ml de la solution mère est ajouté. Le mélange bien agité représente la dilution 10^{-1} . 1 ml de cette dernière est mélangé à 9 ml d'eau physiologique, correspondra à la dilution 10^{-2} . On continue ainsi jusqu'à l'obtention de la dilution 10^{-7} (**Ulacio et al., 1997**). Cette opération est effectuée pour les cinq échantillons du sol.

➤ **Isolement des levures**

Les levures sont isolées sur le milieu OGA « *Oxytetracycline Glucose Agar* » (Institut Pasteur, Algérie). L'ensemencement est fait en surface, par étalement de 0.1 ml de culture (**Hammer et al., 1998**). Les boîtes sont ensuite incubées à 30°C, pendant 3 jours (**Harrigon et Mc lace, 1976**) (Figure 13).

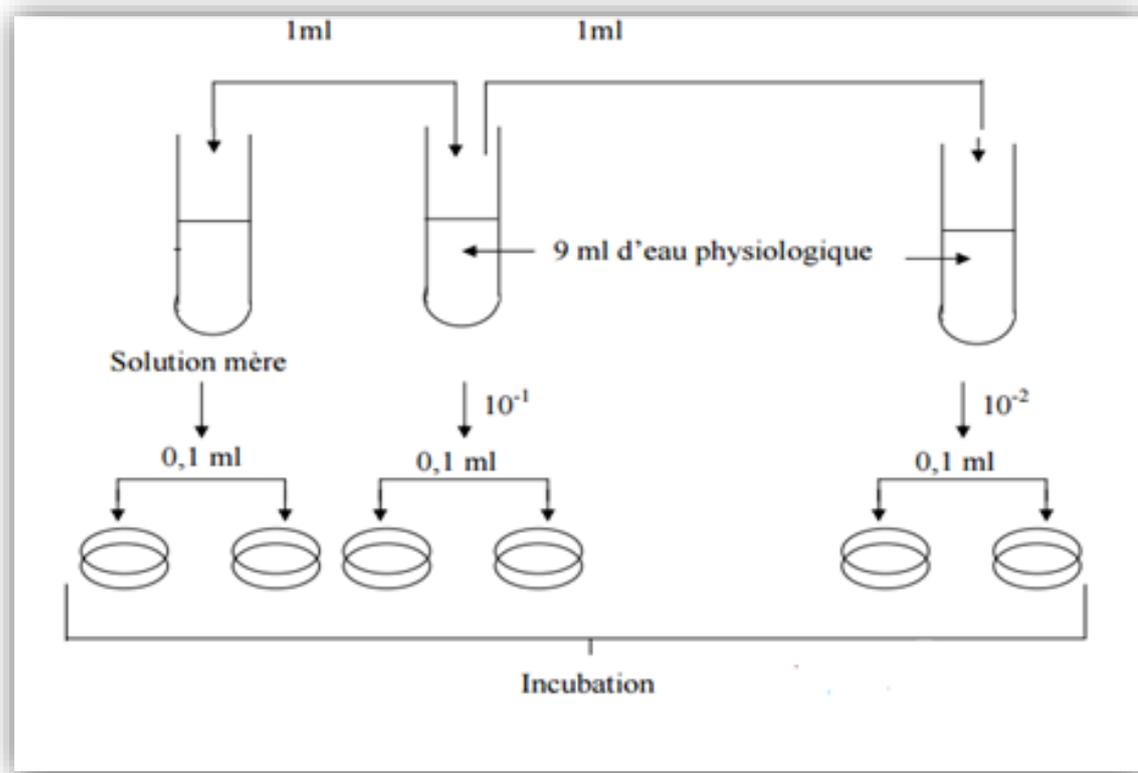


Figure 13 : Technique d'ensemencement sur milieu OGA à partir de solution mère et des dilutions décimales.

3.3.2- Purification des levures

Après le développement des isolats, des colonies présentant les caractères culturaux des levures sont purifiées par réensemencement (selon la méthode des stries) sur boîtes contenant le milieu YPGA « *Yeast Peptone Glucose Agar* » (Annexe 2). A l'aide d'une anse de platine stérile, une colonie est prélevée à partir de la boîte de Pétri d'isolement puis étalée à la surface d'une autre boîte en suivant un motif défini. A certain moment, les cellules isolées se détachent de l'anse en mouvement et se développent en colonies séparées (Prescott *et al.*, 2007). L'incubation des boîtes est effectuée en aérobiose, à 28°C pendant 48h (Harrigon et Mc lace, 1976). L'aspect microscopique est ensuite examiné afin de vérifier la pureté de la souche (Figure 14).

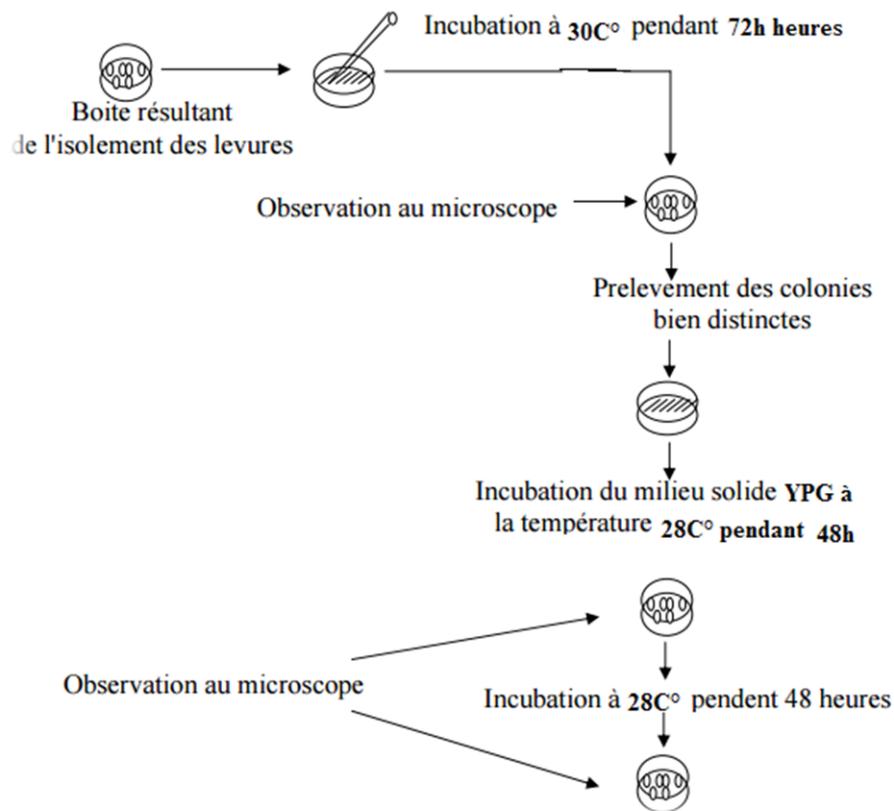


Figure 14 : Différents étapes de purification des levures

3.3.3- Conservation des souches isolées

Les colonies levuriennes purifiées ont été d'abord transférées dans des tubes à essai contenant de l'eau physiologique stérile, puis conservées au réfrigérateur à une température 4°C pendant trois à six mois (Guiraud, 1998).

3.3.4- Caractéristiques des souches purifiées

Les caractéristiques des souches purifiées sont notées en se basant sur l'aspect microscopique et macroscopique après incubation à 28 °C pendant 2 jours sur le milieu YPGA (Bourgeois *et al*, 1996 ; Leveau *et al*, 1979).

➤ **L'aspect macroscopique**

L'observation de l'aspect macroscopique des colonies permet d'effectuer une première caractérisation des isolats. Les éléments d'identifications macroscopiques sont ceux qui sont déclarés par Guiraud (1998) et Joffine et Leyral (2006) ; en l'occurrence :

- Forme des colonies : rondes, irrégulières, régulière, punctiforme, etc.,
- Taille des colonies : par la mesure du diamètre,
- Couleur de la colonie : rose, blanche, etc.,
- Elévation : convexe, concave, plate, etc.,
- Opacité : opaque, translucide ou transparente, etc.,
- Surface : lisse, rugueuse, sèche, dentelée.

➤ **L'aspect microscopique**

Ces caractères sont étudiés à partir des préparations microscopiques (objectif x40) effectuées entre lame et lamelle à l'état frais. L'étude microscopique permet de définir ; d'une part la forme (sphérique, ovoïde, allongée), la taille des cellules en milieu liquide et sur milieu solide, et d'autre part, Le mode de reproduction végétative par scissiparité ou bourgeonnement et dans ce cas le nombre et la position (polaire, latérale) du (ou des) bourgeon (s) sur la cellule mère (**Bourgeois et Leveau, 1980**).

3.3.5- La sélection des souches oléagineuses

Afin de sélectionner les souches oléagineuses, des frottis de levures ont été préparés en présence de noir de soudan B (colorant). Ce dernier représente un composé très soluble dans les lipides. De plus, il est très employé en microscope optique à constante de phase car il permet de mettre en évidence les polymères lipidiques intracellulaires localisés au niveau du cytoplasme des micro-organismes (**Pandolfi, 2006**).

➤ Coloration par noir de soudan B

Après avoir préparé les frottis, les lames ont été séchées à une température ambiante, puis quelques gouttes du colorant noir de soudan B (Annexe 11) ont été déposées pendant 10 minutes. Les lames sont ensuite immergées dans une solution de xylène pendant 10 secondes ce qui mène à une décoloration complète.

La contre coloration est effectuée à la solution en fuchsine (Annexe 12) pendant 15 secondes. Les lames enfin ont subi un lavage à l'eau courante puis égouttées sur papier absorbant. Les cellules colorées sont observées à l'objectif x 100 (**Ravikumar et al., 2012**).

➤ Observation des souches colorées

Les Granules de PHB « poly- β -hydroxybutyrate » peuvent être observés en noir à l'intérieur des cellules colorées en rose.

Les granules de PHB peuvent être quantifiés si la souche est une levure oléagineuse dont le nombre indique la capacité de stockage. De ce fait, les isolats les plus performants (représentés par une meilleure capacité de stockage) sont sélectionnés pour la poursuite du travail.

3.3.6- Identification présomptive des souches sélectionnées

L'identification ne peut être effectuée que sur une souche en culture pure, préalablement sélectionnée comme oléagineuse performante. Elle peut se réaliser à partir des caractères morphologiques, biochimiques et physiologiques (**Wickerham, 1951 ; Bourgeois et Leveau, 1980 ; Guiraud, 1998 ; Kurtzman et al., 2011**).

• Caractéristiques morphologiques des cellules végétatives

Vu que les autres caractéristiques morphologiques (macroscopique et microscopique) sont déjà réalisées, seulement le test de la filamentation a été effectué.

➤ Aptitude à la filamentation

La recherche systématique de l'aptitude à la filamentation est observée à partir d'une culture sur lame microscopique. De ce fait, le milieu PDA « *Potato dextrose Agar* » (Annexe 4) fondu est déposé sur une lame microscopique stérile dans une boîte de Pétri. Quand le milieu est solidifié, la levure à examiner estensemencée en une strie longitudinale. La lame est incubée dans la boîte de Pétri modérément humidifiée par l'ajout d'eau stérile pour éviter la dessiccation du milieu.

L'observation microscopique se fait après 2 à 3 jours d'incubation (grossissement x 40 ou x100). Par conséquent, la bordure de la culture, sa filamentation ainsi que la nature de mycélium (pseudomycélium ou vrai mycélium), son abondance et sa ramification sont observés et notés.

- **Caractéristiques biochimiques**

Les caractéristiques biochimiques étudiées sont la fermentation des sucres et l'assimilation de source carbonées et azotées.

- **Fermentation des sucres**

Les sucres testés sont : les hexoses (D-glucose, D-galactose, D-fructose), les disaccharides (lactose, maltose, saccharose), les polysaccharides (amidon), ainsi le D-xylose.

Cette étude nécessite la présence d'un témoin négatif (sans sucre). Le milieu d'eau de levure (Annexe 5) est réparti dans des tubes à essai à raison de 9ml par tube, conditionnés avec des cloches de Durham. Les sucres utilisés comme sources de carbones sont additionnés au milieu à raison de 2 %. Les tubes sontensemencés avec 3 gouttes d'une suspension de levure. Puis les cultures sont incubées à 28°C, pendant 3 jours à 4 semaines. La fermentation des sucres est révélée par le dégagement de CO₂ dans la clochette, aperçu par les bulles d'air. (**Giraud, 1998**).

- **Assimilation des sources carbonées**

Ce teste est pratiqué sur les substrats suivants : D-glucose, D-galactose, lactose, maltose, saccharose, l'amidon, D-xylose, acide acétique, éthanol, glycérol.

Le test le plus utilisé consiste en une culture sur le milieu minimum YNB « *Yeast Nitrogene Base* » de Wickerham (Annexe 6) qui ne contient pas de substrats carboné. Ce milieu est stérilisé par filtration à la concentration x10. Par la suite, il est réparti à raison de 1ml par tube qui reçoit ensuite 8 ml d'eau distillée, et 1ml de substrat à 5%. L'inoculum qui ne doit apporter aucune trace de carbone est constitué par 2 à 3 gouttes d'une suspension dans l'eau physiologique réalisé à partir d'une culture sur milieu solide. Il est prudent d'effectuer un témoin sans substrat pour vérifier si il y'a une croissance résiduaire. L'assimilation de la source carbonée se traduit par une croissance de la souche (observation d'un trouble) dans le milieu pendant 3 jours à 4 semaines d'incubation à 28°C.

➤ **Assimilation des sources azotées**

Les levures assimilent généralement l'ammonium, les peptones, les acides aminés et parfois l'urée. Certains substrats azotés comme les nitrates et les nitrites ne sont utilisés que par certaines espèces, ce qui est exploitable pour leur identification. La méthode utilisée est la même que celle employée pour l'assimilation des glucides, mais le milieu dans ce cas contient du glucose et ne comporte aucune trace d'azote ; c'est le milieu YCB « *Yeast Carbon Base* » de Wickerham (Annexe 7). Les sources d'azotes sont utilisées à la concentration finale de 0.1g/L pour le sulfate d'ammonium (utilisé comme témoin positif), 0.08g/L pour le nitrate de potassium. L'assimilation de la source azotée se traduit par une croissance de la souche (observation d'un trouble) dans le milieu après 3 jours à 4 semaines d'incubation à 28°C.

➤ **Test de l'uréase**

L'activité uréase des levures est détectée sur milieu Christensen (Annexe 8). L'uréase transforme l'urée en ammoniac, ce qui provoque l'augmentation de pH qui vire l'indicateur coloré. Une réaction positive se traduit par l'apparition d'une coloration rose à rouge vive dans le milieu de culture après 3 jours d'incubation à 25°C.

• **Caractéristiques physiologiques**

L'étude des caractéristiques physiologiques est réalisée par le test de croissance à 37°C et le test de la résistance au NaCl.

➤ **Croissance à 37°C**

Les levures sont testées sur leurs pouvoir du développement à une température de 37°C, les souches ont été inoculées dans le milieu de culture YPGA, les boîtes sont ensuite incubées à 37°C pendant 2 jours. Une culture positive se traduit par une croissance remarquable dans le milieu.

➤ **Résistance au NaCl**

L'osmophilie des levures a été étudié sur un milieu liquide YNB contenant 0.5% de glucose auquel on rajoute 1% NaCl. L'incubation est réalisée à 28°C pendant 3 jours à 4 semaines. La Croissance des levures dans ce milieu est considérée comme un résultat positif.

Résultats

4- Résultats

Ce présent travail se focalise sur l'isolement des levures oléagineuses à partir de cinq échantillons des sols. Ces derniers appartiennent à différents écosystèmes algériens d'où ils sont riches en hydrocarbures et/ou en matière carbonée. Les isolats les plus performants sont choisis en raison de leurs capacités de stockage des lipides à l'intérieure de leurs cellules. L'identification présomptive des isolats sélectionnés est réalisée suivant des tests morphologiques, biochimiques et physiologiques afin d'identifier leurs genres.

4.1- Isolement et purification des levures

L'isolement et la purification des levures à partir des cinq sols (cités précédemment) ont permis d'obtenir une flore levuriennes dont leur nombre se différent selon les conditions du sol de la région explorée. Le nombre des isolats levuriens cultivés sur les milieux OGA et YPGA, ainsi que leurs codes sont récapitulés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 7 : Isolement et purification des levures à partir des différents échantillons des sols explorés.

Provenance	Le sol	Code des isolats	Texture	Milieu d'isolement et de purification	Nombre des isolats levuriens
Raffinerie de Skikda (Sonatrach)	Sol 1	« L »	Agrégats	OGA/YPGA	20 souches levuriennes
Raffinerie de Hassi-Messaoud (Sonatrach)	Sol 2	« L' »	Sableuse humide	OGA/ YPGA	7 souches levuriennes
Biskra El-Kantara	Sol 3	« L'' »	Limoneuse	OGA/ YPGA	5 souches levuriennes
El- Oued El-djemaa	Sol 4	« L''' »	Sableuse sèche	OGA/ YPGA	4 souches levuriennes

Ouargla Touggourt	Sol 5	« Y »	Sableuse sèche	OGA/YPGA	2 souches levuriennes
----------------------	-------	-------	-------------------	----------	--------------------------

Suite du tableau 7

Sur la base des données présentées au tableau 7, l'isolement des levures a permis de collectionner au totale 38 isolats levuriens de différents sols; leurs proportions peuvent être présentées de la manière suivante: 54% proviennent de la raffinerie de Skikda (Sonatrach), 18% proviennent de la raffinerie Hassi-Messaoud, 13% proviennent d'El-Kantara, 10% proviennent d'El-Oued et enfin 5% proviennent de Touggourt. De ce fait, il a été remarqué que l'échantillon le plus riche en levures est celui de Skikda (Sonatrach).

4.2- Caractéristiques des souches purifiées

4.2.1- Aspect macroscopique

Après 48h de culture sur milieu YPGA, l'étude macroscopique des souches pures obtenues a été réalisée. Les résultats sont notés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 8 : Étude macroscopique des colonies isolées à partir de sols de différentes régions en Algérie.

Les critères			Forme coloniale	Taille	Couleur	Contour	Élévation	Opacité	Consistance
Le sol	Les isolats	Concentration							
Sol 1	L1	SM	Circulaire	Grande	Rose	Régulier	En dôme	Opaque	Crémeuse
	L2	SM	Circulaire	Moyenne	Rose	Régulier	Convexe	Opaque	Crémeuse
	L3	SM	Circulaire	Moyenne	Rose	Régulier	En dôme	Opaque	Crémeuse
	L4	SM	Ronde	Grande	Blanche	Régulier	Élevée	Opaque	Sèche
	L5	10 ⁻²	Punctiforme	Grande	Blanche	Régulier	Convexe	Opaque	Crémeuse
	L6	10 ⁻³	Circulaire	Grande	Blanche	Régulier	Convexe	Opaque	Sèche

	L7	10 ⁻³	Circulaire	Grande	Blanche	Régulier	Convexe	Opaque	Sèche	
	L8	10 ⁻¹	Circulaire	Moyenne	Rose foncé	Régulier	Convexe	Opaque	Crémeuse	
	L9	SM	Circulaire	Moyenne	Blanche	Régulier	Convexe	Opaque	Crémeuse	
	L10	10 ⁻²	Circulaire	Moyenne	Rose foncé	Régulier	Convexe	Opaque	Crémeuse	
	L11	SM	Circulaire	Petite	Rose claire	Régulier	En dôme	Opaque	Sèche	
	L12	10 ⁻¹	Circulaire	Petite	Blanche	Régulier	Convexe	Opaque	Crémeuse	
	L13	10 ⁻³	Circulaire	Grande	orange	Régulier	Convexe	Opaque	Sèche	
	L14	10 ⁻³	Circulaire	Petite	Blanche	Régulier	Convexe	Opaque	Crémeuse	
	L15	10 ⁻³	Circulaire	Moyenne	Blanche	Régulier	En dôme	Opaque	Sèche	
	L16	10 ⁻³	Punctiforme	Petite	Blanche	Régulier	En dôme	Opaque	Sèche	
	L17	10 ⁻³	Circulaire	Petite	Rose foncé	Régulier	Convexe	Opaque	Crémeuse	
	L18	10 ⁻³	Circulaire	Petite	Blanche	Régulier	Convexe	Opaque	Crémeuse	
	L19	10 ⁻³	Circulaire	Grande	Blanche	Régulier	En dôme	Opaque	Crémeuse	
	L20	10 ⁻³	Circulaire	Moyenne	Blanche	Régulier	Convexe	Opaque	Crémeuse	
	Sol 2	L'1	10 ⁻³	Circulaire	Petite	Rose claire	Régulier	En dôme	Opaque	Crémeuse
		L'2	10 ⁻³	Circulaire	Petite	Blanche	Régulier	Convexe	Opaque	Sèche
		L'3	10 ⁻³	Circulaire	petite	saumon	Régulier	Convexe	Opaque	Crémeuse
		L'4	10 ⁻³	Circulaire	petite	beige	Régulier	Convexe	Opaque	Crémeuse
		L'5	10 ⁻³	Circulaire	petite	Blanche	Régulier	En dôme	Opaque	Sèche

	L'6	10 ⁻³	Circulaire	Moyenne	Blanche	Régulier	Convexe	Opaque	Sèche
	L'7	10 ⁻³	Circulaire	Petite	Rose	Régulier	Convexe	Opaque	Crémeuse
Sol 3	L''1	SM	Circulaire	Petite	Blanche	Régulier	En dôme	Opaque	Crémeuse
	L''2	MS	Circulaire	Petite	Blanche	Régulier	En dôme	Opaque	Crémeuse
	L''3	SM	Circulaire	Petite	Blanche	Régulier	En dôme	Opaque	Sèche
	L''4	SM	Circulaire	Petite	Blanche	Régulier	Convexe	Opaque	Sèche
	L''5	SM	Circulaire	Moyenne	Blanche	Régulier	En dôme	Opaque	Sèche
Sol 4	L'''1	SM	Circulaire	Petite	Blanche	Régulier	Convexe	Opaque	Sèche
	L'''2	SM	Circulaire	Petite	Blanche	Régulier	Convexe	Opaque	Sèche
	L'''3	SM	Circulaire	Petite	Blanche	Régulier	Convexe	Opaque	Sèche
	L'''4	10 ⁻¹	Circulaire	Petite	Blanche	Régulier	Convexe	Opaque	Sèche
Sol 5	Y1	SM	Circulaire	Petite	Blanche	Régulier	Convexe	Opaque	Crémeuse
	Y2	SM	Circulaire	Petite	Blanche	Régulier	Convexe	Opaque	Crémeuse

Différents isolats (levures et moisissures) ont été obtenus de l'isolement, dont, 38 isolats levuriens ont fait l'objet de complément d'étude. Le développement des isolats sur milieu YPGA, a abouti à des colonies de diverses formes (punctiforme, circulaire) et de tailles (grandes, moyennes, petites), de reliefs variés (convexe, élevées, en dôme), de couleurs multiples (blanches, rose, orange) et de différents aspects (crémeuse, sèche). Le pourcentage le plus élevé des souches levuriennes s'observe majoritairement sur les solutions mères, ainsi que la concentration 10⁻³.

4.2.2- Aspect microscopique

L'observation microscopique des levures isolées a été effectuée à l'état frais. Elle a permis de définir leurs forme et leurs arrangement (rectangulaire, sphérique, ronde), leurs mode de division (bourgeoisement, scissiparité, bourgeoisement bipolaire), ainsi que leurs tailles cellulaires (petite, moyenne, grande) (tableau 9).

Tableau 9 : Étude microscopique des souches isolées.

Critères Souches	Forme de l'arrangement	Taille cellulaire	Type de division
L1	Rondes	Grosses	Bourgeoisement
L2	Rondes	Petites	Bourgeoisement
L3	Ovales	Grosses	Bourgeoisement
L4	Sphériques	Grosses	Bourgeoisement
L5	Sphériques	Moyennes	Bourgeoisement
L6	Sphériques	Grosses	Bourgeoisement
L7	Sphériques	Moyennes	Bourgeoisement
L8	Rondes	Moyennes	Bourgeoisement
L9	Rondes	grosses	Bourgeoisement
L10	Rondes	Petites	Bourgeoisement

L11	Sphériques	Grosses	Bourgeonnement
L12	Rondes	Grosses	Bourgeonnement
L13	Sphériques	Grosses	Bourgeonnement
L14	Rectangulaires	Grosses	Scissiparité
L15	Rectangulaires	Grosses	Scissiparité
L16	Rectangulaires	Moyennes	Scissiparité
L17	Rondes	Moyennes	Bourgeonnement
L18	Rectangulaires	Grosses	Scissiparité
L19	Rectangulaires	Grosses	Scissiparité
L20	Rectangulaires	Moyennes	Scissiparité
L'1	Sphériques	Petites	Bourgeonnement
L'2	En citron	Grosses	Bourgeonnement Bipolaire
L'3	Rondes	Petites	Bourgeonnement
L'4	Rectangulaires	Grosses	Scissiparité

L'5	Sphériques	Moyennes	Bourgeoisement
L'6	Rondes	Grosses	Bourgeoisement
L'7	Sphériques	Grosses	Bourgeoisement
L''1	Rondes	Moyennes	Bourgeoisement
L''2	Rondes	Grosses	Bourgeoisement
L''3	Rondes	Moyennes	Bourgeoisement
L''4	Sphériques	Grosses	Bourgeoisement
L''5	Rondes	Moyenne	Bourgeoisement
L'''1	Sphériques	Grosses	Bourgeoisement
L'''2	Sphériques	Grosses	Bourgeoisement
L'''3	Sphériques	Moyennes	Bourgeoisement
L'''4	Sphériques	Grosses	Bourgeoisement
Y1	Rectangulaires	Moyennes	Scissiparité
Y2	Rectangulaires	Moyennes	Scissiparité

Suite tableau 9

4.3- Sélection des souches oléagineuses

Les colonies pures des levures ont été, ensuite, criblées pour leur capacité de produire des lipides par l'analyse qualitative avec la technique de coloration en noir de soudan B. Cette technique permis de sélectionner les souches oléagineuses, de préciser leur teneur et intensité des lipides cellulaires et donc, de donner des informations sur leur capacité d'accumulation lipidique. Les résultats sont montrés dans le tableau 10.

Tableau 10 : Analyse qualitative et quantitative des lipides intracellulaires par coloration au noir de soudan B.

Souches	Nombre de gouttelettes de graisse /cellule.	Intensité	Souches	Nombre de gouttelettes de graisse /cellule.	Intensité
L1	–	–	L10	++++	Moyenne
L2	–	–	L11	+++	Forte
L3	+++++	Faible	L12	+++	Forte
L4	+++	Forte	L13	++	Forte
L5	++	Forte	L14	–	–
L6	+++	Moyenne	L15	+++	Forte
L7	–	–	L16	++	Forte
L8	+++++	Faible	L17	+++	Forte
L9	+++++	Forte	L18	+++++	Moyenne

L19	++++	Forte	L20	+++	Forte
L'1	-	-	L''2	-	-
L'2	+	Faible	L'3	+++	Faible
L'3	+++	Faible	L'4	++++	Faible
L'4	+	Moyenne	L'5	++++	Forte
L'5	++	Forte	L'''1	+	Faible
L'6	+++	Faible	L'''2	++	Forte
L'7	-	-	L'''3	-	-
L''1	+++	Moyenne	L'''4	++	Forte
Y2	++	Moyenne	Y1	+++	Moyenne

Les cellules contenant des corps gras lipidiques ont été indiquées par les signes + : + pour un, ++ pour deux, +++ pour trois ou plus, ++++ pour de nombreux corps gras.

Parmi les isolats levuriens, 30 ont été sélectionnés en tant que producteurs de lipides de leurs biomasses potentielles, soit environ un pourcentage de 79% de la population levuriennes obtenue. Tandis que, huit isolats ne présentaient aucunes gouttelettes de graisse colorées à l'intérieur des cellules. Ces derniers, ont été classés comme levures non oléagineuses. En ce qui concerne les souches oléagineuses, une deuxième sélection quantitative de corps gras lipidiques a été effectuée. Il a été révélé que huit isolats contenaient de nombreux corps lipidiqes, avec des différentes intensités de la coloration en noir de soudant (haute, faibles, moyenne). Ces souches ont été classées comme les plus fortes

productrices de corps gras, parmi celles, que deux souches performantes, L9 et L''5, isolées des régions de Skikda (Sonatrach) et Biskra (El-Kantara) respectivement, ont été choisis pour continuer l'objet de cette étude.

4.4- Identification présomptive des levures oléagineuses sélectionnées

L'identification classique des levures fait appel à des caractères cultureux, morphologiques, et à des critères physiologiques et biochimiques, étudiés sur les souches L9 et L''5, selon les clés d'identification classique de Wickerham (1951), Guiraud (1998) et Kurtzman (2011). Les résultats sont récapitulés dans le tableau 11.

Tableau 11 : Caractéristiques morphologiques, biochimiques et physiologiques de levures sélectionnées.

Caractéristiques physiologiques et biochimiques		L9	L''5
Morphologie	Forme	O	O
	Division	B	B
	Filamentisation	-	-
Fermentation des sucres	Glucose	-	+
	D-Xylose	-	-
	Saccharose	-	-
	Amidon	+	-
	Lactose	-	-
	Maltose	-	+
	Galactose	-	-

	Fructose	-	+
Assimilation des substrats carbonés	Glucose	+	+
	D-Xylose	-	+
	Saccharose	+	+
	Amidon	+	+
	Lactose	-	-
	Acide acétique	-	+
	Maltose	+	+
	Galactose	-	-
	Ethanol	-	+
	Glycérol	+	+
	Assimilation des substrats azotés	Nitrate de potassium	-
Sulfate d'ammonium		+	+
Autres	Osmophilie	-	+
	Uréase	+	-
	Accumulation des lipides	++++ +	++++ +

	Croissance à 30 °C	+	+
	Croissance à 37°C	-	-

Les symboles correspondent à, + : positif, - : négatif, +++++ : pour de nombreuses gouttelettes de corps gras, O : ovale a rond, B : bourgeonnement.

4.4.1- Études des caractères morphologiques

Les caractères morphologiques (culturels et cellulaires) sont étudiés sur milieu YPGA après une incubation pendant 2 jours à 25 à 28°C, puis les deux souches L9 et L'5 ont été examinées. L'étude des caractères morphologiques des souches L9 et L'5 sont présentés dans le tableau 11 (voir partie 4.4) et les figures (15 et 16).

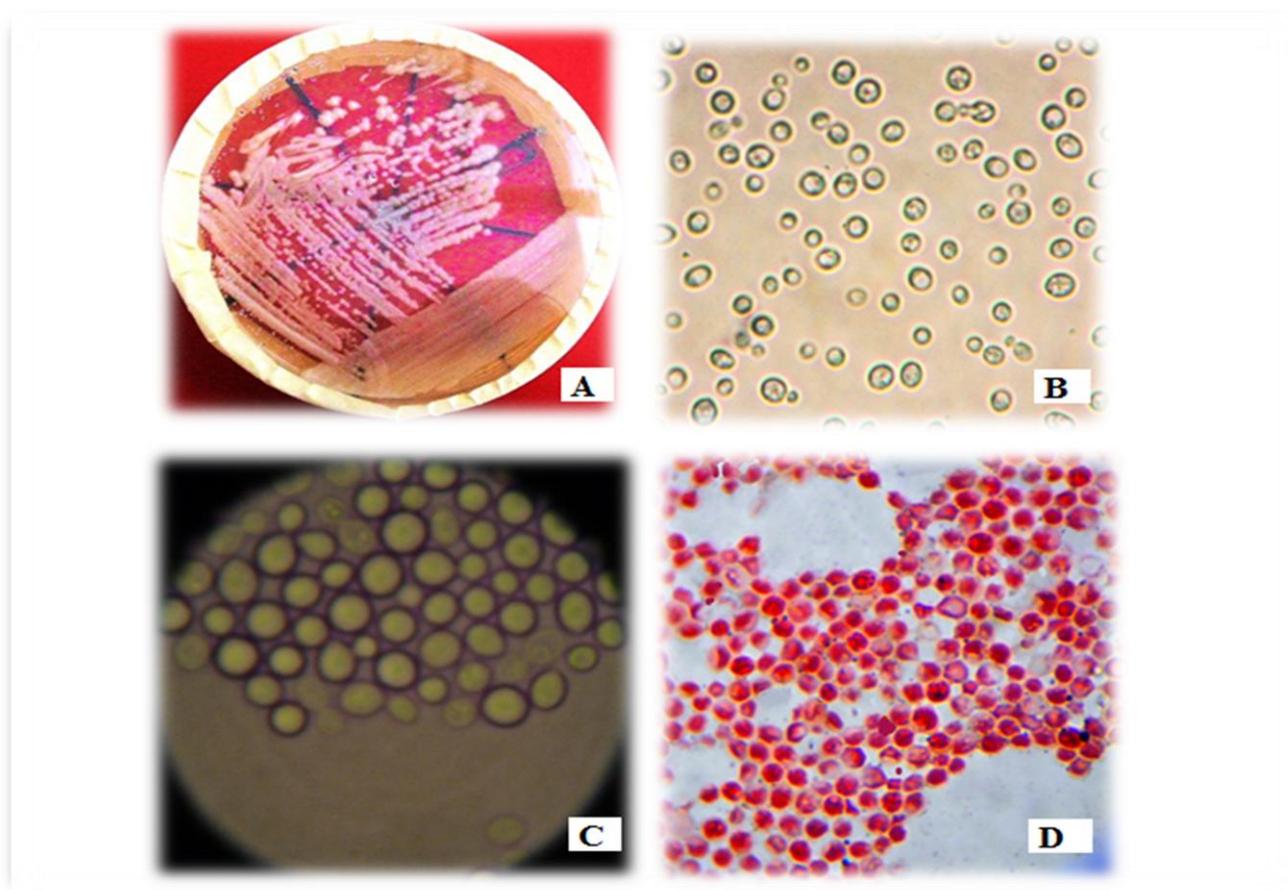


Figure 15 : Caractères morphologiques de la souche L9 ; A : l'aspect macroscopique de la souche L9, B : aspect microscopique de la souche L9 (GX40), C : aptitude à la filamentation (GX40), D : accumulation des lipides (GX100).

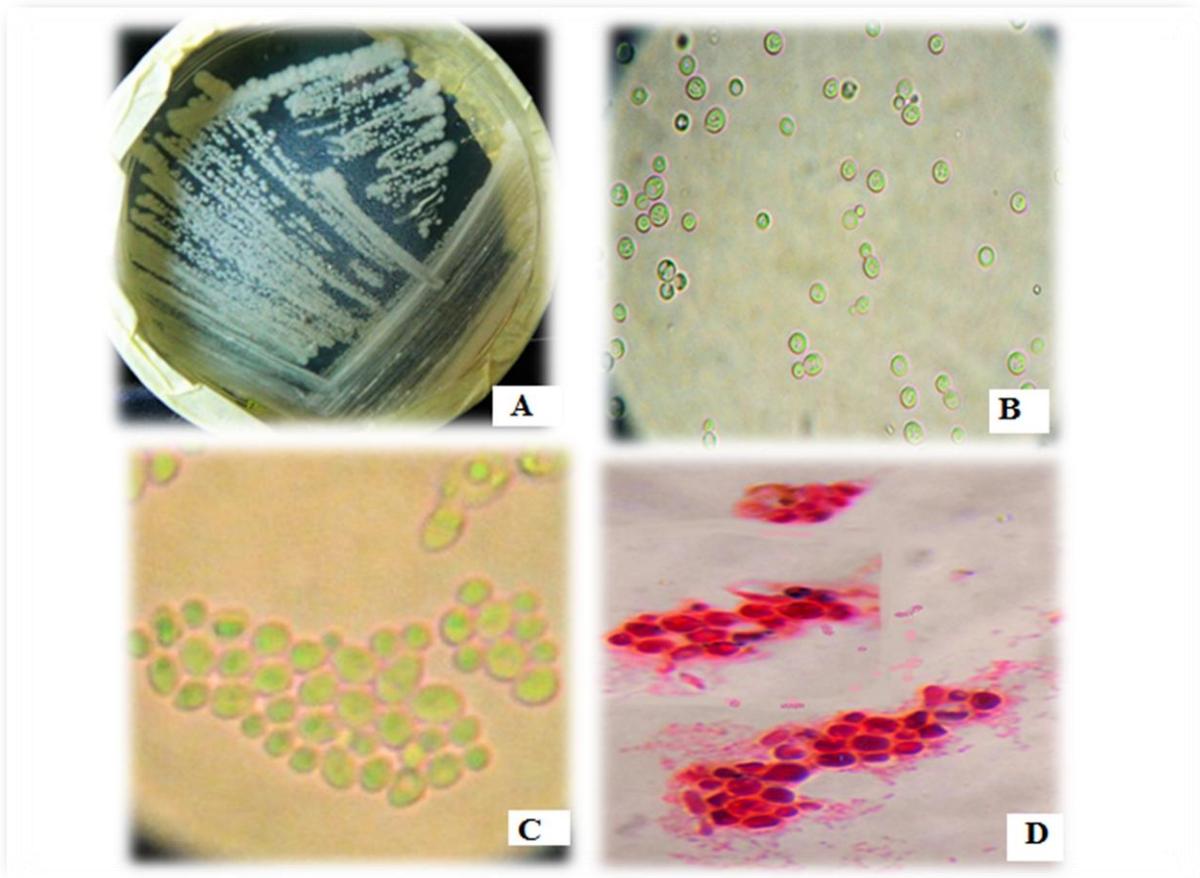


Figure 16 : Caractères morphologiques de la souche L'5 ; A : l'aspect macroscopique de la souche L'5, B : aspect microscopique de la souche L'5 (GX40), C : aptitude à la filamentation (GX40), D : accumulation des lipides (GX100).

D'après les résultats obtenus, les souches sélectionnées L9 et L'5 sont caractérisées par leurs forme ronde à ovale, dont, elles ne peuvent pas former des filaments de type mycélium (Figures 15.C et 16.C), de plus, elles ont une forte capacité de stockage lipidique accompagnée par une haute intensité ce qui les rend les souches les plus performantes (Figures 15.D et 16.D).

4.4.2- Caractéristiques biochimiques et physiologiques

Les deux souches oléagineuses, ont été caractérisées biochimiquement et physiologiquement par les méthodes classiques. Les résultats sont récapitulés après 3 jours à 4 semaines d'incubation.

- **Fermentation des sucres**

Le métabolisme fermentaire engendre la production de gaz qui peut être recueilli dans les cloches de Durham car il est libéré au fond des tubes. De ce fait, les résultats obtenus qui sont montrés dans le tableau 11 (voir partie 4.4) permettent de révéler que la souche L9, elle fermente que l' Amidon (Figure 17). De son tour, la souche L''5 a pu fermenter que le Glucose, le Maltose, et le Fructose. En revanche, elle ne présente aucune aptitude à fermenter le D-Xylose, Amidon, Lactose, Saccharose (Figures 18).

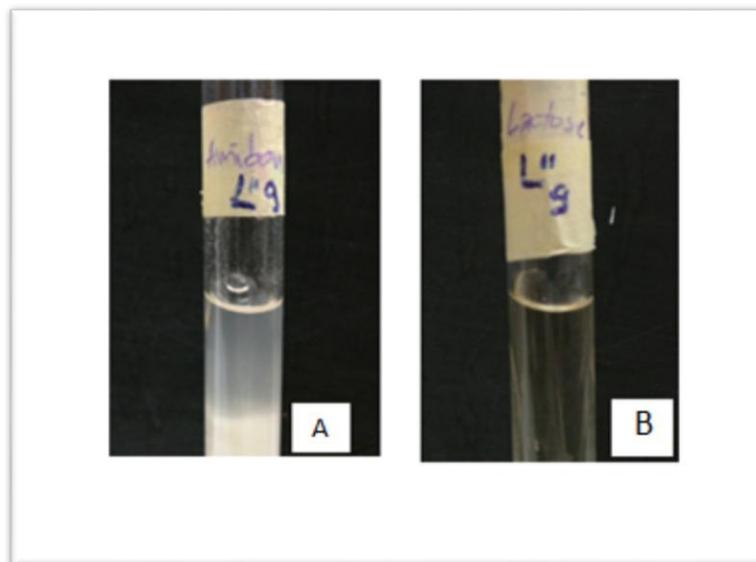


Figure 17 : Fermentation des sources carbonées de la souche L9 ; A : résultat positif, B : résultat négatif

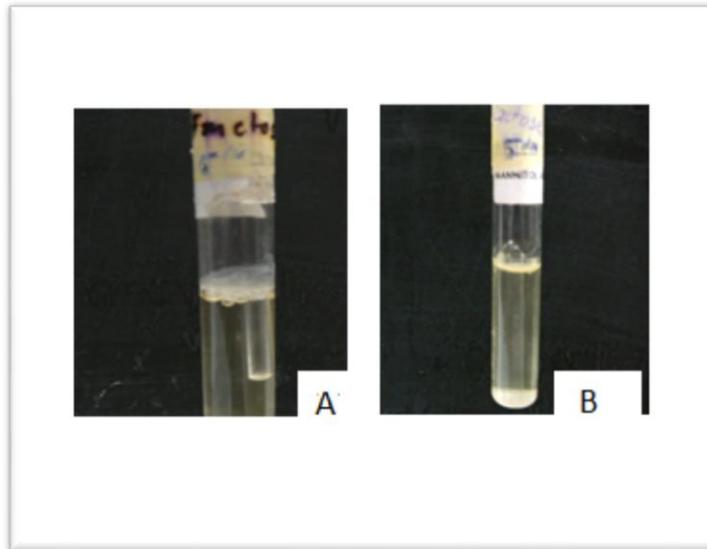


Figure 18 : Fermentation des sources carbonées de la souche L'5 souche ; **A** : résultat positif, **B** : résultat négatif.

- *Assimilation des sources carbonées*

La souche L9 présente une assimilation positive que pour le Glycérol, l'Amidon, le Glucose et le Maltose comme sources de carbone, dont le trouble qui due au développement de la souche pour chaque sucre assimilable a été remarqué (Figure19). Quant à la souche L'5, elle a pu assimiler le Glucose, le Saccharose, le D-Xylose, le Maltose, le Glycérol, l'Ethanol, l'Amidon et l'Acide acétique comme sources de carbone. Par contre, les substrats : Lactose, Galactose et Glycérol ne sont pas assimilables par cette souche car il n y a pas eu de croissance cellulaire (Figure 20).

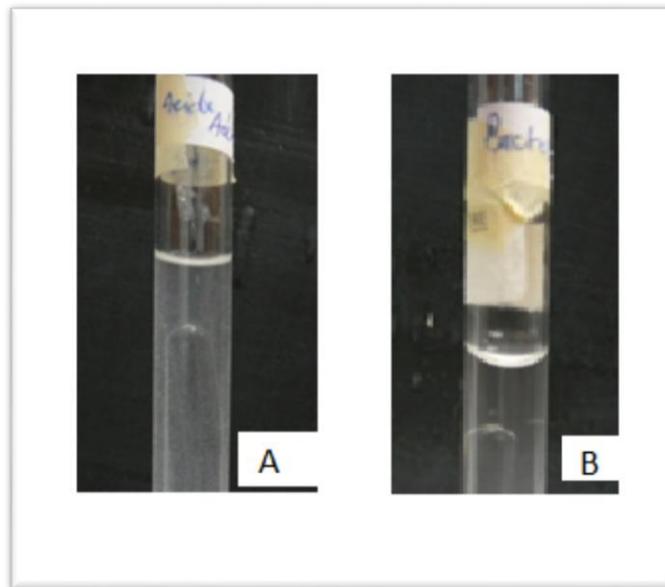


Figure 19 : Tests d'assimilations des sources carbonées de la souche L9 ; A : résultat positif, B : résultat négatif.

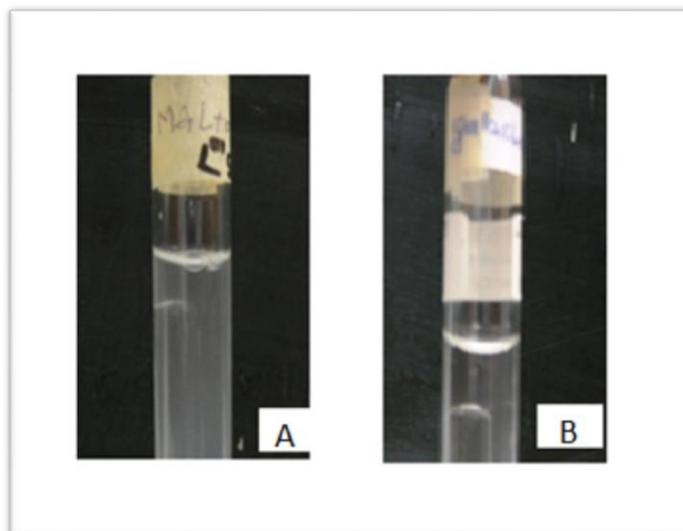


Figure 20 : Tests d'assimilations des sources carbonées de la souche L'5 ; A : résultat positif, B : résultat négatif.

- *Assimilation des sources azotées*

La souche L9 présente une assimilation positive pour l'ammonium ainsi que le nitrate de potassium (Figure 21), La souche L'5 peut assimiler seulement le sulfate d'ammonium (Figure 22). On enregistre une croissance, où ces éléments ont été utilisés comme sources d'azotes.



Figure 21 : Tests d'assimilations des sources azotées de la souche L9 ; A : résultats positif, B : résultat positif.

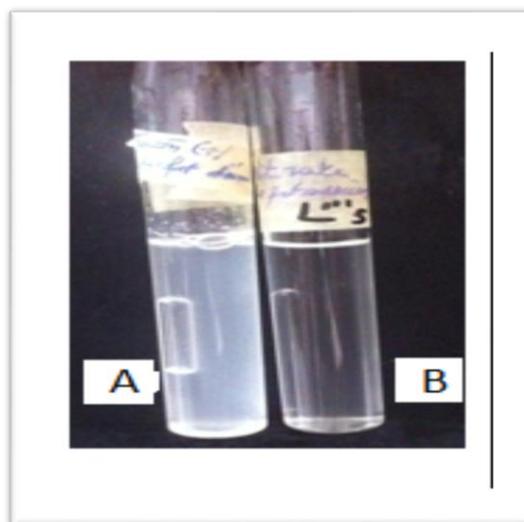


Figure 22 : Tests d'assimilations des sources azotées de la souche L'5 ; A : résultat positif ; B : résultats négatif.

- **Test de l'uréase**

L'apparition d'une teinte rouge après l'incubation de la souche L9 sur le milieu Christensen (Figure 23), se traduit par la décomposition de l'urée par cette souche en le transformant en ammoniac ou/et en carbonate d'ammonium, cet indicateur coloré est due à une alcalinisation du milieu. Tandis que la souche L''5, ne peut pas dégrader l'urée d'où le résultat est négatif, et aucune dégradation de couleur a été remarquée (Figure 24).

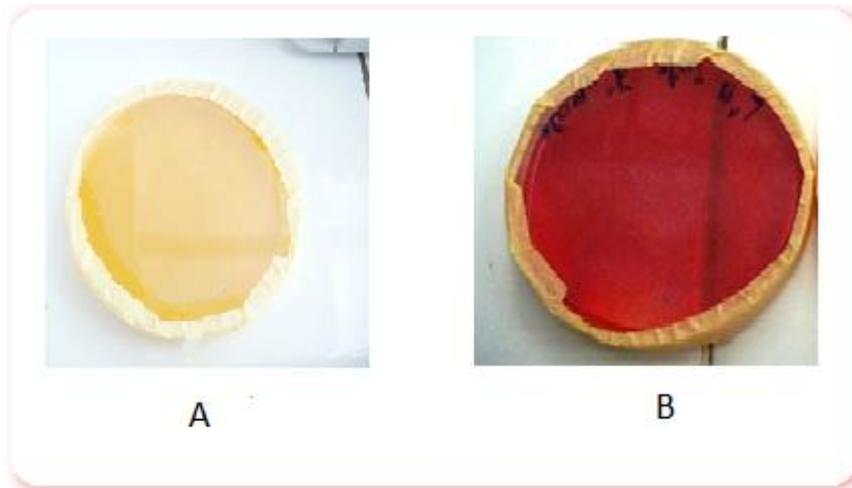


Figure 23 : Test de l'uréase de la souche L9 ; A : milieu sans ensemencement, B : milieu après l'ensemencement et incubation.

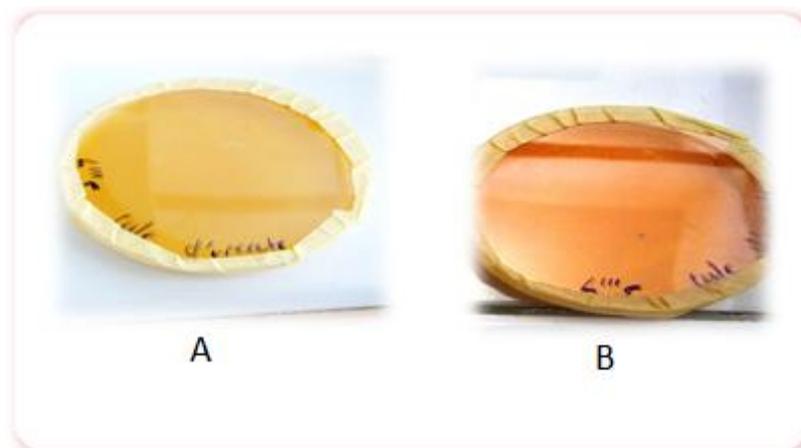


Figure 24 : Test de l'uréase de la souche L''5 ; A : milieu sans ensemencement, B : milieu après ensemencement et incubation.

- **Croissance à 37°C**

Les deux souches sélectionnées L9 et L''5 ont été cultivées sur milieu YPGA à une température de 37°C. Les résultats obtenus (Tableau 11, voir partie 4.4) montrent que les isolats ne peuvent pas se développer sous cette température.

- **Résistance au NaCl**

Dans ce test, les deux souches L9 et L''5 ne poussent pas sur des cultures avec 1% de la concentration d'NaCl. Les résultats sont clairement montrés dans la figure 25 d'où on ne remarque aucune croissance (trouble) dans les tubes.

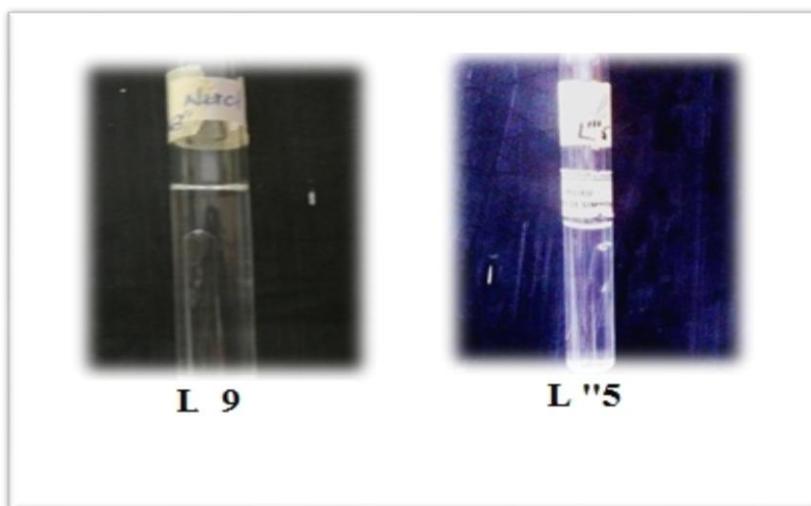


Figure 25 : Test de l'osmophilie des souches L9 et L''5.

De ce qui a précédé, l'identification présumptive des souches (L9 et L''5) par les tests phénotypiques, en s'appuyant sur les clés d'identification classiques (**Wickerham, 1951 ; Guiraud, 1998 ; Kurtzman, 2011**), a conduit aux genres présumés : *Cryptococcus sp.* (L9) et *Candida sp.* (L''5).

Discussion

5- Discussion

La réduction de l'utilisation des produits issus du pétrole dans le contexte économique et écologique actuel conduit à se tourner vers des matières premières durables et biosourcées. Les lipides sont des molécules clés pour la production de biodiesel et de produits issus de la chimie verte. Les levures sont parmi les microorganismes les plus utilisés pour la production de lipides en industries (**Angerbauer *et al.*, 2008 ; Pan *et al.*, 2009 ; Boulard, 2012 ; Enshaeieh *et al.*, 2013 ; Akpinar-Bayazit *et al.*, 2014 ; Polburee *et al.*, 2015**). De ce fait, le présent travail est amorcé par les points de recherche suivants : (i) Isolement des levures à partir des sols des différentes régions en Algérie, polluées en hydrocarbures et/ou riches en matières carbonées ; (ii) Sélection des souches levuriennes oléagineuses ; (iii) Recherche des isolats levuriens les plus performants à stocker des corps gras lipidiques ; (iv) Identification présomptive des isolats sélectionnés par les tests dichotomiques des levures.

Le choix du sol comme étant une source de levures, afin de réaliser l'isolement, a pour la raison qu'il est d'après Anderson et Martens (2013), l'habitat naturel pour des myriades de microorganismes et d'autres formes vivantes, formant des populations de différents genres. Par ailleurs, le nombre et l'activité de ces derniers changent d'une région à une autre, influencés par le contenu de : la matière organique et la texture du sol, le pH, l'humidité, la température, l'aération et d'autres facteurs environnementaux (**Subler et Kirsch, 1998**). Pour cela, cinq sols ont été choisis à savoir : les raffineries de Skikda et de Hassi- Messaoud (Sonatrach), ainsi que les régions : Biskra (El- Kantara), El-Oued (El-Djemaa), et Ouargla (Touggourt), d'où les échantillons des sols ont été pris à partir des palmeraies. Le changement des sites pour la prise d'échantillon va conduire sans doute à une variation levurienne.

Selon Boudraham (2011), les composants du pétrole brut constituent une grande source d'énergie qui permet d'alimenter non seulement les moteurs à combustion interne, mais aussi les microorganismes. Ces derniers ont développé des mécanismes d'utilisation de ces hydrocarbures comme source de carbone et d'énergie. Les microorganismes qui sont capables de décontaminer le site d'un déversement de pétrole sont essentiellement des bactéries et des champignons (y compris les levures). De son tour, Killian et Feher (1939), ont montré que les sols désertiques ne sont pas stériles et qu'ils sont peuplés d'une microflore très variée. Ces écosystèmes extrêmes par leur pluviosité très irrégulière, et par leur température extrêmement élevée qui mène à une faible quantité d'humus, peuvent renfermer une flore microbienne très variée qui s'est adaptée à ces conditions défavorables.

Les cinq sols choisis donc sont riches en hydrocarbures et /ou matières organiques mais ils ont une texture qui se diffère. Ceci peut influencer sur la concentration des microorganismes d'un site à un autre. Dans ce contexte, l'isolement des levures a permis de collecter au totale 38 isolats levuriens des sols « cités précédemment » à savoir : 20 souches à partir de la raffinerie de Skikda ; 7 souches à partir de la raffinerie de Hassi-Messaoud ; 5 souches à partir de la région El-Kantara à Biskra ; 4 souches à partir de la région El-Djemaa à El-Oued et 2 souches à partir de la région Touggourt à Ouargla.

La raffinerie de Skikda offre le plus grand effectif de levures. Les résultats montrent que le nombre des isolats récoltés est plus que le double de celui isolé à partir des autres régions. D'après Djema (2013), la ville de Skikda bénéficie d'un climat méditerranéen très favorable avec un sol de type solide, ce qui le rend le sol le plus abondant en microorganismes y compris les levures.

L'échantillon prélevé à partir de la raffinerie de Hassi-Messaoud est d'une texture sableuse, compacte et humide, malgré sa richesse en hydrocarbures où le carbone présente 83 à 87% en volume, ce sol a permis de répertorier seulement sept souches, ceci est peut être expliqué par sa neutralité en pH qui favorise la croissance des bactéries et par conséquent assure un déroulement efficace de la biodégradation des hydrocarbures (**Leahy et Colwell, 1990**). En effet, pour une croissance optimale, les levures préfèrent des milieux à pH acide (**Larpen et larpen-Gaurgaud, 1997 ; Phaff et al., 1978**).

L'isolement des levures à partir des échantillons des sols sahariens et subsahariens (Biskra, El-Oued et Ouargla) a été effectué sous les palmerais de ces oasis en raison de la présence de matières organiques. D'après Kabrah (2000), la source de carbone présente sous palmerais est plus faible que celui présent que les zones forestiers ; ceci est lié à la nature de la matière organique humidifiable. Pareillement, les résultats obtenus montrent un faible pourcentage de levures dans ces régions. D'ailleurs, Merabti (2006) a trouvé le même nombre d'isolats levuriens dans la région de Biskra (5 isolats). En addition, Il a été montré que cette région est caractérisée par un climat aride (une pluviosité annuelle de 120 à 150 mm et des températures élevées, pouvant atteindre les 50°C en saison estivale) (**Anonyme, 2003**). De plus, le pH du sol est relativement neutre (6.78) (**Merabti, 2006**), ce qui favorise une reproduction rapide des populations bactériennes au dépens de celle des levures (**Allen et al., 1987**). Malgré ces conditions extrêmes, quelques souches levuriennes arrivent à résister, ce qui explique le faible taux des levures obtenues.

Dans les régions d'El- Oued et Ouargla, six isolats levuriens ont été obtenues également à partir du sol des palmerais, ces régions sont connues par leurs sols sableux, et un climat aride de type saharien désertique (**Boudmehg, 2007**). Ce nombre est peut-être expliqué par les raisons de Phaff et Miller (1978), d'où ils ont montré que le peuplement faible des sols étudiés est lié à l'absence du dépôt des résidus d'animaux ou de variété de plantes qui mènent à une teneur insuffisante en matière organique (inférieure à 3%), mais également à la structure du sol (son contenu organique, sa porosité etc...), ce qui exerce un effet sur leur distribution.

Par la suite, les isolats levuriens obtenus, ont été criblés pour déterminer leur capacité à accumuler des lipides qui indique leur type oléagineux. La sélection des souches oléagineuses est réalisée suivant la méthode de coloration en noir de soudan B. C'est un colorant synthétique provenant des hydrocarbures extrait du goudron de houille et dérivant du benzène. Il est insolubles dans l'eau, mais très solubles les corps gras (**Lecomte, 2003**). Par conséquent, 30 isolats ont été identifiés en tant que producteurs de lipides, dont huit d'entre eux ont été retenus. Ces dernières présentaient un contenu significativement plus élevé de lipides remarqué par le nombre des corps gras comptés avec des différentes intensités de coloration (faible, haute, moyenne), tandis que, huit isolats, qui ne présentaient aucun corps gras à l'intérieur des cellules, ont été classés comme non oléagineux. En fait, de nombreux chercheurs (**Beopoulos, 2009 ; Pan et al., 2009 ; Mirbaghri et al., 2012 ; Virginia et al., 2014 ; Sitepu et al., 2014 ; Wang et al., 2015 ; Polburee et al., 2015 ; Cavonius et al., 2015; Capus et al., 2016**), ont trouvé que dans des conditions de carence en azote, les cellules ne peuvent plus se proliférer, car cet élément est essentiel à la biosynthèse des protéines et des acides nucléiques. Pourtant, le carbone continue à être assimilé par les cellules ; dont, elles convertissent le substrat incorporé (carboné) en acides gras et en triglycérols, qui vont immédiatement être stockés dans les corps lipidiques. Cela permet à cette catégorie des levures (oléagineuses) de survivre pendant de longues périodes de famine dans les niches pauvres en éléments nutritifs secs. En outre, les lipides de stockage, étant hydrophobe, seraient vraisemblablement plus résistants à conditions desséchantes que les glucides de stockages (**Poli et al., 2014 ; Bolpuree et al., 2015**).

Généralement, d'après Johnson et Echaarri-Erasun (2011) et Ochoa (2012), la majorité des souches oléagineuses habitent dans des sols contenant des sources de carbones complexes, pauvres en sources d'azote, et/ou sous des conditions climatiques défavorables. Ceci confirme les résultats obtenus du rapport : nombre de isolats oléagineux vis-à-vis la zone d'échantillonnage. En effet, selon Haddad (2015), à partir de la formule brute d'hydrocarbure C_nH_m , le pétrole, est considéré comme étant un milieu riche en matières organiques, pauvre en

matières azotées. De plus, les sols sous palmes se caractérisent par une baisse de la teneur en azote, qui serait liée à celle du taux de la matière organique, vu qu'elle est la principale forme de réserve. En addition, il a été remarqué que la valeur de C/N dans les zones sous palmes arrive à 10 % (**Kabrah, 2000**). Choses qui expliquent la présence des levures oléagineuses dans nos sites d'isolement

La différence de l'intensité de coloration, remarquée sous microscope a été justifiée par Zhang *et al.* en 2009. Ces chercheurs ont trouvé que l'intensité de coloration n'est pas nécessairement en corrélation avec les concentrations de graisse mesurées. Au lieu de cela, l'intensité de la coloration est corrélée plus étroitement avec les types de graisse biochimiquement vérifiés. A partir de là, deux souches oléagineuses performantes L9 et L''5, isolées à partir de la raffinerie de Skikda (Sonatrach) et la région d'El-Kantara à Biskra, respectivement, ont été choisies en raison de leur fort potentiel d'accumuler les lipides révélés à partir des analyses quantitatives des corps lipidiques observés, et ont subis une identification présomptive afin de connaître leurs genres.

La détermination des genres des isolats sélectionnés exige des tests morphologiques, biochimiques et physiologiques. L'analyse des résultats obtenus, montre que les souches levuriennes L9 et L''5 semblent s'apparenter aux genres *Cryptococcus sp.*, et *Candida sp.*, respectivement. Par conséquents, ces résultats peuvent être comparés avec ceux déjà obtenus par Pirapan *et al.* (2015), où parmi leurs espèces isolées à partir des dattes et les fleurs de palmier femelles, ils ont trouvé les genres *Cryptococcus* et *Candida*, avec un grand pourcentage de stockage des lipides. Ce qui confirme le type oléagineux de nos isolats. Ainsi, Louadj (2014), a révélé que les levures : *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Torulopsis*, *Trichosporon* sont abondantes dans les sols forestiers.

Actuellement, l'isolement des levures oléagineuses à partir des sols pollués en hydrocarbures où les conditions sont défavorables pour la croissance des levures a été peu traité par les chercheurs, ceci peut être considéré comme un avantage dans cette étude.

Le choix des sites d'isolement mentionnés au début nous a mené à collecter de nombreux isolats entre autres ceux qui correspondent aux genres : *Cryptococcus sp.*, et *Candida sp.*, qui sont d'ailleurs selon la littérature: des souches modèles pour la production du biodiesel, et par la suite, isolées pour la première fois de la raffinerie de Skikda Sonatrach (*Cryptococcus sp.*) et la région du Biskra à El-Kantara (*Candida sp.*) dans la recherche Algérienne.

Conclusion et perspectives

6- Conclusion et Perspectives

Les exigences environnementales conduisent aux chercheurs à trouver des solutions performantes et économiques viables de remplacement du carbone fossile par le carbone renouvelable (Boulard, 2012). Dans ce contexte, a fin de chercher des souches levuriennes capables d'accumuler les lipides à l'intérieure de leurs cellules, trente-huit souches de levures ont été isolées à partir des sols des régions suivantes : les raffineries de Skikda, et Hassi-Messaoud (Sonatrach) ; plus les sols des palmerais de Biskra (El- Kantara) ; El-Oued (EL-Djema) ; Ouargla (Touggourt). **Il est important à signaler que l'isolement des levures oléagineuses à partir de ces régions algériennes constitue une première pour ce travail.**

L'étude macroscopique et microscopique des isolats levuriens obtenus, a permis d'une part, de confirmer la pureté des isolats, et d'autre part, de révéler les caractères morphologiques et culturels des isolats.

Pour mettre en évidence les polymères lipidiques intracellulaires localisés au niveau du cytoplasme des levures. Les isolats purs ont subis une coloration en noir de soudan B. Ce dernier a permis d'abord, de sélectionner les levures oléagineuses et de quantifier les granules de PHB, par la suite. Ce test à mener de collectionner trente isolats levuriens de type oléagineux, dont le sol le plus riche en ces derniers est celui de la raffinerie de Skikda (Sonatrach) avec 15 isolats oléagineux. Huit isolats (L3, L8, L9, L10, L18, L19, L''5, L''4), ont été classés comme étant les plus performants, ils représentaient le nombre le plus élevé des corps gras intercellulaires par rapports aux autres isolats, soit disant plus que 5 corps gras ont été observés sous microscope.

Deux souches oléagineuses performantes ont été sélectionnées pour la suite d'étude : L9 et L''5, isolées des régions de Skikda et Biskra, respectivement, d'où les conditions nutritionnelles de ces dernières sont défavorables pour la croissance des levures (pollution, sécheresse...etc.). **Cette constatation révèle le degré d'adaptation de ces souches dans des conditions défavorables (extrêmes), permettant de conclure qu'elles peuvent être utilisées dans des applications biotechnologiques diverses.**

Les deux souches sélectionnées ont subis une identification présomptive, qui a mené en finalité à déterminer les genres suivants : *Cryptococcus sp.* (L9) et *Candida sp.* (L''5), isolées de Skikda et Biskra, respectivement.

Selon la littérature, les deux souches : *Cryptococcus sp.*, *Candida sp.*, sont des levures oléagineuses, elles ont été isolées pour la plupart des temps à partir du sol des forestiers, et les fleurs de palmier. **Ces résultats sont considérés intéressants, vu l'utilisation des levures oléagineuses dans la production de biodiesel.**

Au terme de cette étude, nous fixons certains points comme perspectives :

- Identification des espèces des isolats obtenus par la biologie moléculaire ;
- Détermination des conditions de croissances et de production (des lipides) favorables en milieu liquide, des souches oléagineuses sélectionnées
- Valorisation des lipides comme produits industrielles.

Références bibliographiques

- **Achour, A.F. (2003).** Etude bioécologique de : apate monochrome Fab (coleoptera, bostrychidea) dans la région de l'oued-rightouggourt. Thèse de magister SC. Gro. Inst. Nat. Agro, El-Harrach.
- **Achoura, A et Belhamra, M. (2010).** Aperçu sur la faune arthropodologique des palmeraies d'El- Kantara. Courrier du Savoir. pp.93-101.
- **Akpinar-Bayazit, A. (2014).** Fungal lipids: the biochemistry of lipids accumulation. International Journal of Chemical Engineering and Applications, Vol. 5, No. 5.
- **Allen, N. H et Ahearn, D. G. (1987).** Ecology of Aquatic Yeasts In: Rose A.H., Harisson J.S. (eds), The yeasts, V1, Biology of yeast. 2nd Edition. p: 123-174. Academic Press. London.
- **Alvarez, H. M et Steinbüchel, A. (2002).** Triacylglycerols in prokaryotic microorganisms, Applied Microbiology and Biotechnology 60:367–376.
- **Alvarez, H. M., Pucci, O.H., Steinbüchel, A. (1997).** Lipid storage compounds in marine bacteria. Applied Microbiology and Biotechnology 47: 132–139.
- **Amaretti A., Raimondi S., Leonardi A., Rossi, M. (2012).** *Candida Freyschussii*: an Oleaginous Yeast Producing Lipids from Glycerol. Chemical Engineering Transactions, 27, 139-144.
- **Anderson, T.H., Martens, R. (2013).** Soil Biology and Biochemistry, 57 : 487-495.
- **Angerbauer, C. Siebenhofer, M. Mittelbach, M. Gue-bitz, G.M. (2008) .** Conversion of sewage sludge into lipids by *Lipomyces starkeyi* for biodiesel production, Bioresour. Technol. 99: 3051–3056.
- **Anonyme, (1990).** Nouvelle situation de la zone d'El Outaya, Analyse et données statistiques. DAD d'El Outaya, 30p.
- **Anonyme, (2003).** Météo France. Statistiques. Biskra (Algérie)
- **Arabolaza, A., Rodriguez, E., Altabe, S., Alvarez, H., Gramajo, H. (2008).** Multiple pathways for triacylglycerol biosynthesis in *Streptomyces coelicolor*. American society for microbiology. 74 : 2573-2582.

- **Arous, F., Triantaphyllidou, I. E., Mechichi, T., Azabou, S., Nasri, M., Aggelis, G. (2015).** Lipid accumulation in the new oleaginous yeast *Debaryomyces et chellsii* correlates with *ascosporogenesis*. *Biomass and Bioenergy*. 80: 307-315.
- **Babau, M. (2015).** Croissance et accumulation lipidique de *Rhodotorula glutinis* (*Rhodosporidium toruloides*) sur glucose, xylose et glycérol : vers la valorisation des coproduits agricoles et industriels pour la production de lipides à usages énergétiques. THÈSE. L'institut National des Sciences appliquées de Toulouse.
- **Bagnat, M., Karanen, S., Shevchenko, A., Simons, K. (2000).** Lipids rafts function in biosynthetic delivery of proteins to the cell surface in yeast. *Proc Natl acad U S A*, 97:3254-3259.
- **Beopoulos, A. (2009).** Ingénierie génétique de la levure oléagineuse *Yarrowia Lipolytica* pour la production de lipides. THÈSE. L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (Agro Paris Tech).
- **Boudmehg, A.(2007).** Isolement, à partir de sols sahariens, de bactéries actinomycétales productrices des molécules antifongiques, identification moléculaire des souches actives. Thèse. Université des Frères Mentouri Constantine.
- **Boudraham, A. (2011).** Etude de la diversité bactérienne d'un sol pollué aux hydrocarbures
- **Boulton, C. A., and Ratledge, C. (1984).** The physiology of hydrocarbon utilizing microorganisms. *Topics in Fermentation and Enzyme Technology* (9).
- **Bourgeois, c. M., Larpent, J. P., (1996).** Microbiologie alimentaire. Tome II aliment fermenté et fermentations alimentaires. Ed. Technique et Documentation IAVOISIER, APRIA, Paris: 100-450.
- **Bourgeois, C., M., Leveau, J., Y. (1980),** Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires, Volume 3 : Le contrôle microbiologique, Collection Sciences et techniques agro-alimentaires, 331p
- **Brown, M.R., Dunstan, G.A., Norwood, S.J., Miller, K.A. (1996).** Effects of harvested stage et light on the biochemical composition of the diatom *Thalassiosira pseudonana*. *Journal of Phycology* 32:64-73
- **Capus, A. Monnerat, M. Ribeiro, C.L. De Souza, W. Martins, J.L. Sant'Anna, C. (2016).** Application of high-content image analysis for quantitatively estimation lipid accumulation in oleaginous yeasts with potential for use in biodiesel production. *Bioresource technology*. 309-317.

- **Cavonius, L., Fink, H., Kiskis, J., Albers, E., Undeland, I., Enejder, A. (2015).** Imaging of lipids in microalgae with coherent anti-stokes Raman scattering microscopy. *Plant Physiol.* 167, 603–616.
- **Cescut, J. (2009).** Accumulation d'acylglycérols par des espèces levuriennes à usage carburant aéronautique : physiologie et performances de procédés. THÈSE. L'institut National des Sciences appliquées de Toulouse.
- **Chatzifragkou, A., Zikou, E., Koutinas, A.A., Papanikolaou, S. (2013).** Evaluating glucose and xylose as co-substrates for lipid accumulation and γ -linolenic acid biosynthesis of *Thamnidium elegans*. *J Appl Microbiol.* 114,1020-32.
- **Chisti, Y. (2007)** Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.*, 25, 294–306.
- **Cortin, A. (1969).** Réaménagement de mise en valeur d'Oued-Righ. Etude SOGETHA et SOGREAH, 201p.
- **Djema, F. (2013).** Problématique du développement urbaine vis avis des risques technologiques majeurs – cas de la ville de Skikda-. Mémoire. Université Badji Mokhtar - Annaba.
- **Djerbaoui, A. (2011).** Utilisation de souches bactérienne autochtones dans la production de biosurfactant et la bioremediation des sols de Hassi-Messaoud contaminés par les hydrocarbures. Mémoire de magister. Université de Kasdi Merbah –Ouargla.
- **Drucken, Z. (2008).**Triacylglycerol synthesis in the oleaginous yeasts *yarrowia lipolytica*. *bioresource technology*.309-319.
- **Enshaeieh, M., Abdoli, A., Nahvi, I., Madani, M. (2013).** Selection and optimization of single cell oil production from *Rhodotorula110* using environmental waste as substrate. *Cell and MolecularResearch*.4 (2), 68-75.
- **Evans, C. T., Scragg, A. H., and Ratledge, C. (1983).** A Comparative-study of citrate efflux from mitochondria of oleaginous and non-oleaginous yeasts. *European Journal Of Biochemistry* 130(1):195-204.
- **Granger, L. M. (1992).** Caractérisation cinétique et stœchiométrique de la synthèse d'acides gras chez *Rhodotorula glutinis*. Génie Biochimique et Alimentaire. Toulouse, INSA: 247.
- **Guergouri, I. (2010).**Caractérisation des bactéries isolées de sols contaminés par les hydrocarbures (zone de Skikda) et productrices des biosurfactants. Mémoire de magister. Université des Frères Mentouri Constantine.
- **Guiraud, J, P. (1998).** microbiologie alimentaire. techniques d'analyse microbiologiques. Ed. DUNOD. Paris : 163 -505.

- **Habison, A., Kubicek, C.P., and Röhr, M. (1979).** Phosphofructokinase as a regulatory enzyme in citric acid producing *Aspergillus niger*. *FEMS Microbiology Letters* 5(1): 39-42.
- **Haddad,N., Boudjada, Y. D. (2015).**Isolement et caractérisation des bactéries hydrocarbonoclastes à partir de sols pollués dans la région de Hassi Messaoud. Mémoire. Université des Frères Mentouri Constantine.
- **Hadef, H., Soukehal, B. (2004).**Rapport de l'urbanisation et les risques naturels et industriels en Algérie : inquiétudes actuelles et futures. Université de Jijel.
- **Hall, M. J., Ratledge, C. et al. (1977).** Lipid-Accumulation In An Oleaginous Yeast (*Candida 107*) Growing On Glucose In Single-Stage Continuous Culture. *Applied And Environmental Microbiology* 33(3):577–584.
- **Hamid adil, A., Wynn James, P., Yonghua, L., Ratledge, C. (2001).** Biochemical events leading to the diversion of carbon into storage lipids in the oleaginous fungi *Mucor circinelloides* and *Mortierella alpine*. *Researchgate*. 147: 2857-64.
- **Hammer E., Krowas D., Schafer A., Specht M., Franche W. and Schauer F. (1998).** Isolation and characterisation of a Dibenzofuran-Degrading Yeast: Identification of Oxidation and Ring Cleavage Products. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, p: 2215-2219.
- **Hansson, L., Dostalek, M. (1986).** Effect of Culture Conditions on Fatty-Acid Composition in Lipids Produced By the Yeast *Cryptococcus-Albidus* Var *Albidus*. *Journal Of The American Oil Chemists Society* 63(9):1179- 1184.
- **Harrigon W.F., Mc lace M, E. (1976).** Laboratory methods in food and dairy microbiology. *Sci. Food Agric.* London. Academic Press. 32, p: 1145-1150.
- **Harvey, R. A., Ferrier, D. R. (2011).** *Biochemistry*, Lippincott Williams & Wilkins.
- **Hassan, M., Blanc, P. J., Granger, L. M., Pareilleux, A., Goma, G. (1996).** Influence of nitrogen and iron limitations on lipid production by *Cryptococcus curvatus* grown in batch and fed-batch. *Process Biochemistry* 31(4):355.
- **Joffin, J. N., Leyral, G. (2006).** *Microbiologie technique*, Tome1 : Dictionnaire des techniques, 4ème édition. Edition CRDP d'aquitaine.
- **Johnson E,A., Echavarri-Erasun, C., (2011).** Yeast biotechnology. In: Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T (eds), *The Yeast: a taxonomic study*, 5th edn. Elsevier, Amsterdam, pp. 20-44.

- **Johnson, V., Singh, M., Saini, V. S., Sista, V. R., Yadav, N. K. (1992).** Effect of pH on lipid accumulation by an oleaginous yeast : *Rhodotorula glutinis* IIP-30. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 8(4):382-384.
- **Killian, C., Feher, D. (1939).** Recherche sur la microbiologie des sols désertiques. Livre.127p.
- **Kubicek, C. P., Röhr, M. (1980).** Regulation of citrate synthase from the citric acid accumulating fungus, *Aspergillus niger*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 615(2):449-457.
- **Kurtzman, C., Fell, J. W., Boekhout, T., Robert, V. (2011).** Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts In: kurtzman cp, fell jw, boekhout t (eds), the yeasts, a taxonomic study, 5th edn. elsevier, amsterdam, pp. 87e110.
- **Leahy, J. G., Colwell, R. R. (1990).** Microbial Degradation of hydrocarbons in the Environment *Microbiol*, vol, 54, p. 305-315.
- **Lecomte, M. (2003).** Noir Soudan B- noir Soudan III. Fiche technique. Cercle des mycologues du Luxembourg Belge ASBL. (M.L.B).
- **Leveau, J. Y., Bouix, M., (1979).** Biology and actives of yeast. Academic press-New York.
- **Li, Q., Du, W., Liu, D. (2008).** Perspective of microbial oils for biodiesel production. *Applied Microbiology and Biotechnology* 80: 749-756.
- **Li, Y. H., Zhao, Z. B., Bai, F. W. (2007).** High density cultivation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* Y4 in fed-batch culture. *Enzyme Microb. Technol.* 41(3) :312-317.
- **Li, Y., Zhao, Z., Bai, F. (2007).** High- density cultivation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* Y4 in fed-batch culture. *Enzyme and Microbial Technology*.41:312-317.g
- **Li-Xia, p., Dreng-Freng, Y., Li, S., Wei, L., Gui-guang, C., Zhi-qun, L.(2008).** Isolation of the oleaginous yeasts from the sol and studies of their lipido-producing capacities. *Biotechnol.*47(2): 215-220.
- **Louadj, Z Ryadh. (2014),** identification des moisissures isolées du sol de zarifet. Mémoire. Université ABOU BAKR BELKAID – Tlemcen.
- **Marjan, E., Azadeh, A., Iraj, N., Mahbooleh, M. (2013).** Selection and optimization of single cell oil production from *Rhodotorula* 110 usi,g environmental waste as substrate. *Journal of cell and molecular research.* 4(2): 68-75.

- **Melickova, K., Roux, E., Athenstaedt, K., Andrea, S., Daum, G., Chardot, T., Nicaud, J. M. (2004).** Lipid accumulation, Lipid body formation and acylcoenzyme A oxidases of the yeast *Yarrowia lipolytica*. Applied and environmental microbiology 70: 3918-3924.
- **Merabti, R. (2006).** Isolement et caractérisation de souches levuriennes amylolytiques à partir de sol saharien algérien. Mémoire. Université des Frères Mentouri Constantine.
- **Mirabagheri, M., Nahvi, I., Emtiazi, G., Mafakher, L., Darvishi, F.(2012).** Taxonomic characterization and potential biotechnological applications of *Yarrowia lipolytica* isolated from meat and meat products. Jundishapur journal of microbiology. 5(1): 346-351.
- **Mullner, H., Daum, G. (2004).** Dynamics of neutral lipid storage in yeast. Acta Biochimica Polonica .The Journal of the Polish Biochemical Society. 51: 323-347.
- **Munn, A., Riezman, H. (1994).** Endocytosis required for the growth of vacuolar H (+)-ATPase- defective yeast identification of six new END genes. J cell boil. 127: 373-86.
- **Najjar, A. (2010).** Étude quantitative de la sécrétion de lipase, de la lipolyse et du stockage de lipides chez *Yarrowia lipolytica* lors de sa croissance en présence d'huile d'olive. Thèse. université de la méditerranée (aix-marseille ii).
- **Ochoa-estopier, A. (2012).** Analyse systématique des bascules métaboliques chez les levures d'intérêt industriel. Application aux bascules du métabolisme lipidique chez *Yarrowia lipolytica*. Thèse de doctorat en ingénierie microbienne et enzymatique.
- **Ochoa-Estopier, A., Guillevet, S. E., (2014).** D-état culture for studying the metabolism to lipid accumulation and citric acid production in *Yarrowia lipolytica*. J. Biotechnol. 170, 35-41.
- **Pan Li, X.(2009).** Isolation of the oleaginous yeasts from the soil and studies of their lipid-producing capacities. Biotechnol. 47(2): 215-220.
- **Pandolfi, D. (2006).** Caractérisation morphologique de la biomasse des boues actives par analyse d'image. THÈSE. Institut national polytechnique de lorraine.
- **Papanikolaou S., Aggelis G. (2011).** Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production, Eur. J. Lipid Sci. Technol., 113, 1031-1051.
- **Papanikolaou, S. (1998).** Etude du comportement physiologique d'une souche de *Yarrowia lipolytica* en croissance sur des co-produits industriels : production orientée des lipides cellulaires. THÈSE. l'Institut National Polytechnique de Lorraine.
- **Papanikolaou, S., Aggelis, G. (2009).** Biotechnological valorization of biodiesel derived glycerol waste through production of single cell oil and citric acid by *Yarrowia lipolytica*. Lipid Technol.

- **Pirapen, P., Wichien, Y., Noppon, L., Takao, O., Kazuhito, F., Savitree, L. (2015).** Characterization of oleaginous yeasts accumulating high levels of lipid when cultivated in glycerol and their potential for lipid production from biodiesel derived crude glycerol. *Fungal biology*. 119: (1194-1204).
- **Pirozzi, D., Ausiello, A., Abu Yousuf., Zuccaro, G., Toscano, G. (2014).** Exploitation of Oleaginous Yeasts for the Production of Microbial Oils from Agricultural Biomass. *Chemical engineering transaction*. 37 : 2283-9216.
- **Polburee, P., Yongmanitchal, W., Lertwattanasakul, N., Ohashi, T., Fujiyama, K., Limtong, S. (2015).** Characterization of oleaginous yeasts accumulating high levels of lipid when cultivated in glycerol and their potential for lipid production from biodiesel-derived crude glycerol. *British mycological society*. 1194-1204.
- **Poli, J.S., Lützhøft, H.-C.H., Karakashev, D.B., Valente, P., Angelidaki, I. (2014).** An environmentally friendly fluorescent method for quantification of lipid contents in yeast. *Bioresour. Technol.* 151, 388–391.
- **Portelli, B. (2011).** Biologie systémique et intégrative pour l'amélioration de l'accumulation et de la sélectivité des acides gras accumulés dans les espèces levuriennes. THÈSE. L'institut National des Sciences appliquées de Toulouse.
- **Prescott., Harly. et Kelin. (2007).** *Microbiologie*. 2th Ed. Boeck-wesmael. Bruxelles.
- **Pruvost, J., Van vooren, G., Cogne, G., Legrand, J. (2009).** Investigation of biomass and lipids production with *Neochloris oleoabundans* in photobioreactor. *Bioresource technology*, 100:5988-5995.
- **Pruvost, J., Van vooren, G., legouic, B., Couzinet-Mossion, A., Legrand, J. (2011).** Systematic investigation of biomass and lipids productivity by microalgae in photobioreactors for biodiesel application. *Bioresource technology*. 102: 150-158.
- **Ratledge, C. (2002).** Regulation of lipid accumulation in oleaginous micro-organisms. *Biochemical Society Transactions* 30:1047-1050.
- **Ratledge, C., Boulton, C. A. (1984).** The physiology of hydrocarbon utilizing microorganisms. *Topics in Fermentation and Enzyme Technology* (9).
- **Ratledge, C., Cohen, Z. (2008).** Microbial and algal lipids: Do they have a future for biodiesel or as commodity oils. *Lipid Technol.* 6:1047-1050.
- **Ravikumar, K., Dakshayini, J., Girisha, S.T. (2012).** Biodiesel production from oleaginous fungi. *international journal of life sciences*. Volume 6, Issue 1.
- **Sakuradani, E., Shimizu, S. (2009).** Single cell oil production by *Mortierella alpina*. *J. Biotechnol.*

- **Sebaa, R. (2014).** Inventaire des orthoptères dans deux stations (Touggourt et Témacine). Mémoire. Université Kasdi Merbah, Ouargla.
- **Sheehan, J., Dunahay, T., Benemann, J., Roessler, P. (1998).** A look back at the U.S. Department of Energy's aquatic species program - biodiesel from algae. NREL/TP-580-24190. U.S. Department of Energy's Office of Fuels Development.
- **Shi, S., Valle-Rodriguez, J.O., et al., (2011).** Prospects for microbial biodiesel production, *Biotechnol. Jour.*, 6,277-285.
- **Sitepu I,R., Garay L,A., Sestric, R., Levin, D., Block D,E., German J, B., Boundy-Mills K,L. (2014).** Oleaginous yeasts for biodiesel: current and future trends in biology and production. *Biotechnology Advances* 32: 1336-1360.
- **Steen, E.J., Kang, Y., Bokinsky, G., Hu, Z., Schirmer, A., McClure, A., Del Cardayre, S.B., Keasling, J.D.(2010).** Microbial production of fatty-acid-derived fuels and chemicals from plant biomass. *Nature* 463: 559–562.
- **Subler, S., Kirsh, K.S. (1998).** Spring dynamic of soil carbon, nitrogen and microbial activity in earthworm middens in no-till cornfield. *Bio. Fert. Soils.* 26 :243-249.
- **Suutari, M., Linkkonen, K., and Laakso, S. (1990).** Temperature adaptation in yeast: the role of fatty acids. *Journal General Microbiology* 136:1469–1474.
- **Takagi, M., Karseno, Yoshida, T. (2006).** Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae *Dunaliella* cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering* (101)3:223-226.
- **Ulacio D., Perez C and Pineda Y.J. (1997).** Mycoflora in tobacco plant roots (*Nicotiana tabacum*) in Portuguesa state, Venezuela. *Bioagro.*, 9 (1), p: 3-11.
- **Van Vooren, G., Le grand, F., Legrand, J., Cuine, S., Peltier, G., Pruvost, J. (2012).** Investigation of fatty acids accumulation in *Nannochloropsis oculata* for biodiesel application. *Bioresource Technology* 124:421-432
- **Vergeade., Guiraud., Larpent,J. P., Galzy,P. (1976).** étude de la flore de levure du saint-nectaire. *le lait*, 56 (555-556), 275.
- **Virginia, P., Adalgisa, M., Catrina, R., Silvana, V. (2014).** Oleaginous yeasts from Uruguay and Antarctica as renewable raw material for biodiesel production. *American journal of bioscience.* 2(6): 251-257.
- **Voelker, T., A. J. Kinney. (2001).** Variations in the Biosynthesis of Seed-Storage Lipids. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.*52: 335-361.

- **Wang, Y., Gong, Z., Yang, X., Shen, H., Wang, Q., Wong, J., Zhao, Z. (2015).** microbial lipid production from pectin-derived carbohydrate by oleaginous yeasts. *Process biochemistry*. 50: 1097-1102.
- **Wickerham, L.J. (1951).** Taxonomy of yeast. Technical Bulletin No. 1029, United States. Departement of Agriculture, Washington, D.C.
- **Wynn, J. Ratledge, C., (2002).** The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganism. *Advances in applied microbiology* 51.
- **Yokoshi, T., Honda, D., Higashihara, T., and Nakatara, T. (1998).** Optimization of docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium limacinum* SR21. *Applied Microbiology and Biotechnology* 49:72-76.
- **Zhang, L., Meng, X., Yang, J., Xu, X. (2009).** Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renew. Energ.* 34, 1–5.

Les sites web :

- http://plage desinvolte.pagespersoorange.fr/d_agora/d_biochimie/lipides.pdf.
- <http://www.alamy.com/stock-photo/el-oued-algeria.html>.
- <http://www.andi.dz/PDF/monographies/Oued.pdf2013>.
- <http://www.sonatrach.com>.
- www.algerie-monde.com.
- www.lemidi-dz.com.
- www.alamy.com.

Annexes





Annexes

(Annexe 1)

Milieu d'enrichissement pour les levures

Extrait de levure.....	1g
Pepton	10g
Glycérol.....	40g
Sol.....	5%
Eau distillée.....	1000ml

Tous les ingrédients du milieu sont dissous dans l'eau distillée par agitation, ensuite la quantité nécessaire du sol est ajoutée.

La stérilisation du milieu se fait à 120°C pendant 15 min.

Conservation du milieu à température ambiante.

(Annexe 2)

Yeast Peptone Glucose Agar « YPGA » (Guiraud, 1998).

Extrait de levure.....	10g
Peptone.....	10g
Glucose.....	20g
Agar.....	17g
Eau distillée.....	1000ml

Tous les ingrédients du milieu sont dissous dans l'eau distillée par agitation.

La stérilisation du milieu se fait à 120°C pendant 15 min.

Conservation du milieu à température ambiante

(Annexe 3)***Potato Dextrose Agar « PDA » (Guiraud, 1998).***

Extrait de pomme de terre200g/l.
Glucose20g.
Agar.....20g.
Eau distillée..... 1000ml.

Préparation de l'extrait de pomme de terre

Les pommes de terre non pelées et veilles, sont lavées et coupées en petits dés fins, ensuite mises dans un litre d'eau distillée et portées à ébullition pendant 1 h. Elles sont enfin écrasées, filtrées.

Compléter à un litre d'eau distillée.

(Annexe 4)**Préparation du milieu**

L'Agar et le Glucose sont dissous à chaud dans l'extrait. Compléter à un litre d'eau distillée, ajuster le pH à 5 et stériliser à 110°C, pendant 30 min.

(Annexe 5)**Milieu eau de levure**

Extrait de levure.....5g.
Eau distillée..... 1000 ml.
Ajuster à pH= 7
Stériliser 20mn à 120°C

(Annexe 6)**Milieu *Yeast Nitrogene Base* « YNB »**

Ce milieu de composition complexe est disponible dans le commerce (Difco), sous forme déshydratée. 6,7g/l de ce composant déshydraté est stérilisé par filtration. Il est ensuite réparti aseptiquement en tubes à essais (9ml). Ce milieu est souvent préparé à concentration $\times 10$, ce qui facilite sa stérilisation. Il est alors réparti dans des tubes contenant 8ml d'eau stérile (1ml/tube). Les solutions de produits carbonés (0,5% pour chaque source) sont ajoutées aseptiquement (1ml/tube) (Wikerham, 1951).

(Annexe 7)**Milieu *Yeast Carbone Base* « YCB »**

Ce milieu de composition complexe est disponible dans le commerce (Difco), sous forme déshydratée. 11,7g/l de ce composant déshydraté est stérilisé par filtration. Il est ensuite réparti aseptiquement en tubes à essais (9ml). Ce milieu est souvent préparé à concentration $\times 10$, ce qui facilite sa stérilisation. Il est alors réparti dans des tubes contenant 8ml d'eau stérile (1ml/tube). Les solutions de produits carbonés sont ajoutées aseptiquement (1ml/tube). (Wikerham, 1951).

(Annexe 8)**Milieu de Christensen**

Peptone.....	1g
Glucose.....	1g
Chlorure de sodium.....	5g
Phosphate monopotassique.....	2g
Urée.....	20g
Rouge phénol.....	12mg
Agar.....	20g
Eau distillée.....	1000ml

Les six premiers ingrédients sont dissous dans 100 ml d'eau distillée, ensuite le liquide obtenu a été stérilisé par filtration en utilisant des filtres stériles dont les pores de ces derniers ont un diamètre de 0.45mm. Pour l'Agar, il a été dissocié dans les 900ml d'eau distillée et subit une stérilisation à 120C° pendant 15 minutes, puis rajouté à la première préparation (Guiraud, 1998).

(Annexe 9)

Milieu gélosé à la tributyrine

Tributyrine.....	1%
Peptone.....	1%
Extrait de levure.....	1,2%
Agar	1%
Eau distillée.....	1000 ml

(Annexe 10)

Préparation d'eau physiologique

Chlorure de sodium.....	9g
Eau distillée.....	1000ml

Stérilisation à l'autoclave pendant 15 minutes à 120 C°.

(Annexe 11)

Noir de soudan (Guiraud, 1998)

Noir de soudan B	1g.
Éthanol à 70°	100 ml.

(Annexe 12)

Fuchsine (Guiraud, 1998)

Fuchsine basique	1g
Phénol.....	5g
Alcool éthylique a 90°	10ml
Eau distillée.....	1000ml

Résumés

Abstract

The main objective of this study is the isolation of oleaginous yeast capable of accumulating lipids inside their cells. Thirty-eight yeast strains were isolated from soil of different regions in Algeria, namely: refinery of Skikda and Hassi-Messaoud (Sonatrach). palm regions: Biskra (El kantara), El- Oued (El-Djemaa) and Ouargla (Touggourt), where the environmental conditions in these regions, and their concentration in organic matter differ from one sample to another.

After purification, the recovered isolated have been subjected to oleaginous yeasts selection test using Black Sudan stain test, to determine their accumulated lipids content. This test has raised thirty oleaginous strains, or 79% of isolated yeasts, including eight (L3, L8, L9, L10, L18, L19, L''4, L''5), have been shown the highest number of lipids bodies stored in the cells. Therefore, two oleaginous strains (L9, L''5) were selected for presumptive identification (morphological, biochemical and physiological tests) to finally get to determine the following types: *Cryptococcus sp.*, *Candida sp.*, isolated. Region Skikda (L9) and Biskra (L''5), respectively. The results of this work are promising. In fact, the oleaginous cells high-level lipids accumulation nature, offers possibilities of industrial applications as oil resources. In addition, the use of oleaginous yeast for degradation of fatty acids, can solve environmental problems, and enhance its development process.

Key words: Isolation, Identification, oleaginous yeasts, lipid fats, *Candida sp.*, *Cryptococcus sp.*

ملخص:

الهدف من هذه الدراسة هو عزل الخمائر الزيتية عالية الأداء القادرة على تجميع الدهون في خلاياها. لهذا السبب، تم عزل ثمانية وثلاثين سلالة من الخميرة من تربة مناطق مختلفة في الجزائر، وهي: مصافي سكيكدة وحاسي مسعود (سوناطراك)، أشجار النخيل ب: بسكرة (القنطرة)، وادي (الجمعة)، ورقلة (تقرت)، حيث تختلف الظروف البيئية في هذه المناطق من عينة إلى أخرى، وكذلك تركيزها في المواد العضوية.

بعد التنقية، خضعت العزلات التي تم الحصول عليها لاختبار اختيار الخميرة الزيتية بواسطة ملون أسود السوداني، وذلك من أجل تحديد كمية الدهون المتراكمة. سمح هذا الاختبار بجمع 30 سلالة زيتية، أي 79٪ من مجموع الخمائر المعزولة؛ حيث: ثمانية منها وهي L3 ، L8 ، L9 ، L10 ، L18 ، L19 ، L5 ، L4 ثبت أن بها أكبر عدد من الأجسام الدهنية المخزنة في الخلايا. نتيجة لذلك، تم اختيار سلالتين أوليتين L9 ، L5 لتحديدهما أوليًا (عن طريق الاختبارات المورفولوجية والبيوكيميائية والفسيلوجية) للوصول أخيرًا إلى الأنواع التالية: *Cryptococcus sp* ، *Candida sp*، المعزولة من مناطق بسكرة (L9) وسكيكدة (L5) ، على التوالي. نتائج هذا العمل محفزة، في الواقع، تفتح خاصية تراكم الدهون في الخلايا غير العضوية إمكانيات للتطبيقات الصناعية باعتبارها موارد طبيعية للزيوت. بالإضافة إلى ذلك، يمكن أن يؤدي استخدام الخمائر الزيتية لتحليل الأحماض الدهنية إلى حل المشكلات البيئية وتشكيل عملية جيدة لتقييمه.

الكلمات الرئيسية: عزل، تحديد، خمائر زيتية، أجسام دهنية ليبيدية، *Candida sp* ، *Cryptococcus sp*.

ISOLEMENT ET CARACTÉRISATION DES LEVURES OLÉAGINEUSES, À PARTIR DE DIFFÉRENTS SOLS EN ALGÉRIE.

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Biotechnologie des mycètes : Fermentation et production des substances fongiques

L'objectif ciblé de cette étude est l'isolement des levures oléagineuses performantes capables d'accumuler des lipides à l'intérieur de leurs cellules. Pour cela, trente-huit souches levuriennes ont été isolées à partir des sols de différentes régions en Algérie à savoir : les raffineries de Skikda et de Hassi-Messaoud (Sonatrach), les palmerais des régions : Biskra (El-Kantara), El-Oued (EL-Djemaa) et Ouargla (Touggourt), d'où les conditions environnementales dans ces régions se diffèrent d'un échantillon à un autre, ainsi que leur concentration en matières organiques. Après la purification, les isolats obtenus ont subi un test de sélection de levures oléagineuses par la coloration en noir de soudan B, afin de déterminer leur teneur de lipides accumulés. Ce test a permis de collecter trente souches oléagineuses soit disant 79% de la population levurienne isolée ; parmi lesquelles huit (**L3, L8, L9, L10, L18, L19, L'5, L'4**), ont été montrées le nombre le plus élevé des corps lipidiques stockés dans les cellules. De ce fait, deux souches oléagineuses (**L9, L'5**) ont été sélectionnées pour une identification présomptive (par des tests morphologiques, biochimiques et physiologiques) pour arriver finalement à déterminer les genres suivants : *Cryptococcus sp.*, *Candida sp.*, isolées des régions de Skikda (**L9**) et Biskra (**L'5**), respectivement. Les résultats de ce travail sont motivants. En fait, le caractère d'accumulation lipidique dans les cellules oléagineuses ouvre des possibilités d'applications industrielles comme étant des ressources naturelles des huiles. De plus, l'utilisation des levures oléagineuses pour la dégradation des acides gras, peut résoudre des problèmes environnementaux, et constituer un bon processus de sa valorisation.

Mots clés : Isolement, Identification, Levures oléagineuses, Corps gras lipidiques, *Candida sp.*, *Cryptococcus sp.*

Laboratoire de recherche : Laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie et de l'activité Microbienne (LaMyBAM). Département de Microbiologie. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Université Frère Mentouri Constantine.

Jury d'évaluation :

Président du jury : *CHENTLI* A. (Dr- UFM Constantine),
Rapporteur : *BATAICHE* I. (Dr - UFM Constantine),
Examineur : *CHERFIA* R. (MAA - UFM Constantine).

Date de soutenance : 23/06/2016