

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Hassiba Benbouali de Chlef

Faculté de Technologie

Département de Génie des Procédés



THÈSE

Présentée pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT EN SCIENCES

Spécialité : Génie des procédés

Par

Khadidja AYADI

Thème :

**Valorisation des margines d'une huilerie traditionnelle via
production de biomolécules: Cas de l'huilerie ENNAKHLA**

Soutenue le : 09 / 10 / 2023

devant le jury composé de :

FARES Chahinez

MEZIANE Malika

EI-MILOUDI Khaled

CHEHMA Abdelmadjid

MELIANI Amina

BEKADA Ahmed Mohamed Ali

Professeur Université de Chlef

Professeur Université de Chlef

Professeur Université de Chlef

Professeur Université d'Ouargla

Professeur Université de Mascara

Professeur Université de Tissemsilt

Présidente

Rapporteur

Co-Rapporteur

Examineur

Examinatrice

Examineur

2023/2024

Remerciements

Je remercie le bon Dieu de m'avoir donné le courage d'aller jusqu'au bout de ce travail.

La présente étude n'aurait pas eu avoir lieu sans la contribution de plusieurs personnes. Je tiens à exprimer ma profonde gratitude en remerciant tous ceux qui m'ont aidé pour mener à bien ce travail.

Je tiens tout d'abord à exprimer mes vifs remerciements à ma directrice de thèse Madame **MEZIANE Malika**, Professeur à la Faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université de Chlef et Directrice du Laboratoire Bioressources naturelles (LBRN). Elle a su me guider avec une constante bienveillance et m'a communiqué sa passion pour la recherche et m'a sans cesse, fait bénéficier de son soutien, de son expérience et de son aide aussi précieuse qu'efficace.

A Monsieur **EL-MILOUDI Khaled**, Professeur à la Faculté de Technologie de l'université de Chlef, si j'ai pu mener à bien ce travail, c'est à lui que je suis redevable.

A Monsieur **OUAGUED Abdellah**, Professeur à la faculté de Technologie de l'université de Chlef et Directeur de Laboratoire de recherche Eau et Environnement (LEE), pour m'avoir accueillie dans son laboratoire.

Je vous dois le meilleur accueil que vous m'avez réservé dans vos laboratoires (LBRN, LEE) et la mise à ma disposition tous les moyens pour me permettre de réaliser mes recherches dans les meilleures conditions. Vous m'avez tant aidé et supporté au moment où j'en avais le plus besoin. Aucun mot ne pourrait exprimer mes remerciements et ma vive gratitude, et que le présent travail soit un faible témoignage de ma très haute reconnaissance et mon profond respect. Merci pour tout.

A Mme **FARES Chahinez**, Professeur à la Faculté de Technologie, pour avoir accepté de présider ce jury de thèse.

A Monsieur **CHEHMA Abdelmadjid**, Professeur à l'université d'Ouargla, tous mes remerciements pour le temps qu'il a consacré à la lecture de ce travail et surtout pour la peine qu'il s'est donnée pour son déplacement.

Je tiens à remercier également Mme **MELIANI Amina**, Professeur à l'université de Mascara qui a accepté d'examiner ce travail, c'est un honneur pour moi de la voir siéger parmi les membres de jury.

A Monsieur **BEKADA Ahmed Mohamed Ali**, Professeur à l'université de Tissemsilt, qu'il trouve ici le témoignage de mes vifs remerciements pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant d'apporter son jugement sur ce travail.

Un grand merci à Messieurs **DJAFER Lahcène**, **ABDI Benabdellah**, **KOUIDRI Mohammed** et **FEROUNE Ibrahim**, **MAHMOUDI Hacène** et à Mme **ALI HAIMOUD Safia** pour leurs sympathies inépuisables et leurs sens de collaboration.

Mes vifs remerciements s'adressent aussi à Mme **APAYDIN VAROL Esin**, Professeur à l'université d'Eskisehir (Turquie), pour l'aide et l'amitié qu'il m'a apportée.

Un remerciement spécial et sincère à mes collègues **BOUZIANE Nouredine Mohammed**, **ROUAM Djawed**, **BEN SOUNA Souhila**, **FELLAH Mohammed**, **BOUNEDJAR Khadidja**, **TAHRAOUI DOUMA Djamila**, **AGROUCHE Sakina** et **MAMMERI Bakhtia** qui sans leurs collaboration et leurs aide, je n'aurais pu surmonter bon nombre de difficultés dans mon travail, ils ont su me prodiguer à tout instant, conseils et encouragements tant au niveau scientifique qu'amical.

Mes remerciements les plus sincères à tout le personnel de la Faculté de **Technologie** et de **SNV** et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Que tous ceux que je n'ai pas cités, qu'ils soient assurés de toute ma reconnaissance et mes remerciements.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à tous ceux qui m'ont soutenu durant toute la période de mes travaux de recherche, précisément :

*A qui j'ai vécu avec le plus heureux de mes jours, et j'ai connu avec eux le sens de la tendresse. Aux âmes de **mes grands-mères**, que Dieu ait pitié d'elles, et à **mon cher grand-père**, que Dieu le protège.*

*À **mes chers parents**, qui ont été la raison de mon existence dans la vie et qui m'ont éclairé sur le chemin et m'ont soutenu avec amour et encouragement, et ils m'ont conduit en sécurité, ce travail représente le fruit de votre soutien, vos sacrifices et vos encouragements et qui, sans elles je ne serai pas là. Où je suis aujourd'hui. Que Dieu vous protège et vous accorde une longue vie pleine de santé et de bonheur ;*

*Une spéciale dédicace à **mon cher mari** Khaled qui m'a poussé toujours pour avancer dans mes études ;*

*A **mes chers beaux-parents** qui ont porté avec moi les difficultés de la route ; que Dieu vous protège ;*

*A **mes chers enfants** ; ceux qui ont été patients avec moi au-dessus des barrages routiers et attendaient ce moment avec impatience. Dieu vous bénisse et dirige vos pas ;*

*A **mes chers sœurs et frères** pour leurs soutient et leurs encouragements durant toutes mes études ;*

*A toute **ma famille** paternelle (**AYADI**) et maternelle (**KARDI**) et matrimonial (**EL-MILOUDI**) ;*

*A ma chère directrice de thèse **MEZIANE Malika** qui est devenu membre de ma famille ;*

*A tous mes **enseignants** du primaire, secondaire, lycée et du supérieur.*

*A mes **amis**, mes **proches** et à tous ceux qui m'ont été d'un soutien moral ou matériel.*

A tous ceux que j'aime.



Khadidja

Liste des abréviations

ADH :	Hydrolyse de l'Arginine
AFNOR :	Association Française de Normalisation
ATCC:	American type culture collection
BCP :	Pourpre de BromoCrésol
BS :	Bouillon Sabouraud
CE :	Conductivité électrique
CF :	Coliformes fécaux
CT :	Coliformes totaux
DBO₅ :	Demande biologique en oxygène
DCO :	Demande chimique en oxygène
EMB :	Eosine Bleu de Méthylène
FMAT :	Flore mésophile aérobie totale
IOC :	Conseil International des pays producteurs de l'huile d'Olives
MES :	Matière en suspension
MES :	Mayeux, Elliker et Sandine
MMD10:	Milieu margines diluées 10 fois
MRS :	Man, Rogosa et Sharpe
MS :	Matière Sèche
MV :	Matière volatile
NTU :	Nephelometric Turbidity Unit (Unité de mesure de la turbidité)
OGA :	Oxytétracycline Glucose Agar
PCA :	Plate Count Agar
PSU :	Practical Salinity Unit (Unité de mesure de la salinité)
UFC :	Unité formatrice de colonies
VRBL :	Violet Red Bile Agar with Lactose (Lactose biliée ou cristal violet et ou rouge neutre)
YGP :	Extrait de levure, Bacto-Peptone, Glycerol

ملخص

الهدف المخصص لهذا العمل هو تثمين المرج من أجل إنتاج جزيئات حيوية، وهي الإيثانول وحمض اللاكتيك، عن طريق التخمير. ولهذا الغرض، هدفت هذه الدراسة أولاً إلى تحديد الخصائص الفيزيائية والكيميائية والميكروبيولوجية لهذه النفايات السائلة المستخرجة من معصرة زيت الزيتون النخلة-الشلف.

أظهرت نتائج التحاليل الفيزيائية والكيميائية أن هذا المرج يحتوي على درجة حموضة (5.88). وهي غنية بالمواد العضوية والتي يتم التعبير عنها بواسطة DBO_5 ($7g O_2/L$) و DCO ($601 g O_2/L$). تم العثور على 23 عزلة تنتمي إلى جنس *Saccharomyces* sp. تم اختيارها في البداية لإنتاج الغاز. بالإضافة إلى ذلك، من بين 42 عزلة من بكتيريا حمض اللاكتيك المعزولة في وسط MRS و M17 و MES، تم اختيار سلالة *L. rhamnosus* (Lb16) لإنتاجها العالي من حمض اللاكتيك (45 درجة مئوية).

أعطى إنتاج الإيثانول الحيوي في الوسط النباتي المخفف 10 مرات (MMD10) كمية 8 مل / لتر في الوضع المتقطع أو الدفعي مع الخلايا الحرة و 14.19 مل / لتر مع الخلايا المثبتة على البوزولان و 13.56 مل / لتر من الإيثانول على عظم البقر. ولوحظ أفضل معدل للوضع المستمر مع الخلايا المثبتة على البوزولان، وهو 32.92 مل / لتر.

بالنسبة لإنتاج حمض اللاكتيك، لوحظ أن أعلى نشاط تحميض للعزلة Lb16 مع حموضة تساوي 45 درجة مئوية. ولوحظ أفضل إنتاج لحمض اللاكتيك في حالة المرج المكمل بـ 25% مصّل اللبن في دفعة خلايا حرة، أي 10 جم/لتر، يليها 6.2 جم/لتر من حمض اللاكتيك المنتج بواسطة المرج على دفعات مع الخلايا المثبتة على عظم البقر.

الكلمات المفتاحية: المرج ، تثمين ، تثبيت الخلايا ، الدعامة ، الإيثانول الحيوي ، حمض اللبن.

Résumé

L'objectif assigné à ce travail est de valoriser les margines afin de produire des biomolécules à savoir l'éthanol et l'acide lactique par fermentation. Pour cela, cette étude avait pour but de déterminer en premier lieu les caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques de ce déchet liquide de l'huilerie d'ENNAKHLA-Chlef.

Les résultats des analyses physico-chimiques ont montré que cet effluent agroalimentaire est riche en matière organique ; exprimé par la DBO₅ (7 g O₂/L) et la DCO (601 g O₂/L) ; et a un pH acide (5,88).

Un total de 23 isolats appartenant au genre *Saccharomyces* sp. ont été retenus initialement pour la production du gaz. En outre, parmi les 42 isolats de bactéries lactiques isolés sur milieu MRS, M17 et MES, la souche *L. rhamnosus* (*Lb*₁₆) a été sélectionnée pour sa production élevée de l'acide lactique (45°D).

La production de bioéthanol en milieu margines diluées 10 fois (MMD10) a donné une quantité de 8 ml/L en mode discontinu ou batch à cellules libres et 14,19 ml/L à cellules immobilisées sur pouzzolane et 13,56 ml/L d'éthanol sur os bovin. Le meilleur taux a été observé pour le mode continu à cellules immobilisés sur pouzzolane à savoir 32,92 ml/L.

Pour la production de l'acide lactique, la plus importante activité acidifiante a été relevée pour l'isolat *Lb*₁₆ avec une acidité égale à 45°D.

La meilleure production de l'acide lactique a été notée dans le cas des margines supplémentées par 25 % de lactosérum en batch à cellules libres à savoir 10 g/L, suivi par 6,2 g/L de l'acide lactique produit par les margines en batch à cellules immobilisées sur os bovin.

Mots clés : Margines, valorisation, immobilisation cellulaire, support, bioéthanol, acide lactique.

Abstract

The objective assigned to this work is to valorize olive mill waste water (OMWW) in order to produce biomolecules, namely ethanol and lactic acid, by fermentation. For this, this study aimed to firstly determine the physicochemical and microbiological characteristics of this liquid waste from the ENNAKHLA-Chlef oil mill.

The results of physicochemical analyzes showed that this agri-food effluent is rich in organic matter; expressed by BOD₅ (7 g O₂/L) and COD (601 g O₂/L); and has an acidic pH (5.88).

A total of 23 isolates belonging to the genus *Saccharomyces* sp. were initially selected for gas production. In addition, among the 42 lactic acid bacteria isolates isolated on MRS, M17 and MES medium, the *L. rhamnosus* strain (Lb16) was selected for its high production of lactic acid (45°D).

The production of bioethanol in vegetable medium diluted 10 times (MMD10) gave a quantity of 8 ml/L in discontinuous or batch mode with free cells and 14.19 ml/L with cells immobilized on pozzolan and 13.56 ml/L of ethanol on bovine bone. The best rate was observed for the continuous mode with cells immobilized on pozzolan, namely 32.92 ml/L.

For the production of lactic acid, the greatest acidifying activity was noted for isolate Lb16 with acidity equal to 45°D.

The best production of lactic acid was noted in the case of OMW supplemented with 25% whey in a free cell batch, namely 10 g/L, followed by 6.2 g/L of lactic acid produced by the OMW in batches with cells immobilized on bovine bone.

Keywords: OMW, recovery, cell immobilization, support, bioethanol, lactic acid.

Tables des matières

Remerciement	
Dédicaces	
Liste des abréviations	I
ملخص	II
Résumé.....	III
Abstract.....	IV
Tables des matières	V
Liste des tableaux	VII
Liste des figures	VIII
Introduction générale.....	1
Revue bibliographique	3
Chapitre I. Généralités sur les margines	4
I.1 Introduction.....	5
I.2 Répartition des producteurs de l'huile d'olives dans le monde	5
I.3 Principaux rejets générés par l'extraction de l'huile d'olive	6
I.4 Généralités sur les margines.....	6
I.5 Origine des margines	7
I.6 Caractéristiques des margines	9
I.6.1 Caractérisation physicochimique.....	9
I.6.2 Caractérisation microbiologique	9
I.6.3 Composition des margines	9
I.7 Impact des margines sur l'environnement.....	11
I.7.1 Impact des margines sur les cours d'eau	11
I.7.2 Impact des margines sur le sol.....	11
I.7.3 Impact des margines sur l'air et sur le paysage	12
I.8 Traitement des margines	12
I.8.1 Méthodes physiques	13
I.8.2 Méthodes chimiques et physico-chimiques	15
I.8.3 Traitements biotechnologiques des margines	16
I.9 Valorisation des margines	17
I.9.1 Récupération des polyphénols.....	17
I.9.2 Production de bio-fuel.....	19
I.9.3 Synthèse ou extraction de biomolécules.....	20
I.10 Procédés de fermentation et bioréacteurs	20
I.10.1 Fermentation	21
I.10.2 Fermenteurs ou bioréacteurs.....	22
I.10.3 Biofilm	24

I.10.4 Croissance bactérienne	25
Partie expérimentale	27
Chapitre II. Caractérisation des margines	28
II.1 Introduction	29
II.2 Matériel et méthodes.....	29
II.2.1 Zone d'étude	29
II.2.2 Echantillonnage des margines	30
II.2.3 Paramètres analytiques de base des margines	30
II.3 Résultats et discussion	39
II.3.1 Caractérisations organoleptique des margines	39
II.3.2 Caractérisations physicochimique.....	40
II.3.3 Caractérisation chimique.....	43
II.3.4 Caractérisation microbiologique	45
II.4 Conclusion	47
Chapitre III. Production de biomolécules par immobilisation cellulaire.....	48
III.1 Introduction	49
III.2 Matériels.....	50
III.2.1 Matériels utilisés (Réactifs, produits chimiques et matériels de laboratoire)	50
III.2.2 Souches utilisées.....	52
III.2.3 Supports.....	52
III.3 Méthodes	53
III.3.1 Echantillonnage	53
III.3.2 Préparation du milieu de fermentation	54
III.3.3 Stérilisation du matériel et milieux de culture utilisés dans les essais de fermentation	56
III.3.4 Isolement et identification de souches levuriennes et lactiques	56
III.3.5 Préparation des supports de garnissage.....	65
III.3.6 Conduites des différentes fermentations	69
III.3.7 Suivi de la production.....	77
III.4 Résultats et discussion	79
III.4.1 Composition physicochimique des margines	79
III.4.2 Production de l'éthanol.....	80
III.4.3 Etude cinétique	83
III.4.4 Production de l'acide lactique.....	93
III.4.5 Cinétique de croissance de la souche sélectionnée Lb ₁₆ en mode batch à cellules immobilisées	100
III.5 Conclusion.....	107
Conclusion générale	109
Références bibliographiques	113
Annexes.....	127
Production Scientifique	143

Liste des tableaux

Tableau I.1: Répartition des producteurs de l'huile d'olive dans le monde durant la période 2019-2020 (IOC, 2022).	5
Tableau I.2: Rendement des différentes méthodes d'extraction de l'huile d'olives (Di Giacomo <i>et al.</i> , 2022).	6
Tableau I.3: Composition physicochimique des margines (Khdair <i>et al.</i> , 2020).	10
Tableau I.4 : Quelques biomolécules issues des margines par fermentation.	20
Tableau II.1: Milieux de culture et réactifs chimiques utilisés en vue de l'analyse microbiologique des margines.	37
Tableau II.2 : Caractéristiques physicochimiques des margines (Ayadi <i>et al.</i> , 2022).	40
Tableau II.3: Composition chimique issue de la fluorescence des rayons X (FRX).	43
Tableau II.4: bandes de vibration des groupements fonctionnels en FTIR des margines brute.	44
Tableau II.5: Dénombrements microbiens des échantillons.	45
Tableau III.1: Produits, appareillage et petit matériel.	51
Tableau III.2: Porosité et densité des supports.	68
Tableau III.3: Déterminations de bioéthanol, pouvoir acidifiant et biomasse en mode statique avec cellules libres.	71
Tableau III.4: Déterminations de bioéthanol, pouvoir acidifiant et biomasse en mode statique avec cellules immobilisées sur supports pouzzolane et os bovin.	72
Tableau III.5: Caractéristiques physicochimiques moyennes du lactosérum.	93
Tableau III.7: Caractéristiques biochimiques, physiologiques des souches de <i>Lactobacilles</i> isolées.	96
Tableau III.7: Effet des milieux sur la croissance de la souche Lb ₁₆ , le pH et l'acidité des milieux sélectionnés.	98

Liste des figures

Figure I.1: Procédé traditionnel d'extraction de l'huile d'olive (Khdair, Khdair, <i>et al.</i> , 2019).	8
Figure I.2: Procédé en 2 phases d'extraction de l'huile d'olive (Khdair <i>et al.</i> , 2020).	8
Figure I.3: Procédé en 3 phases d'extraction de l'huile d'olive (Khdair <i>et al.</i> , 2020).	8
Figure I.4: Principales méthodes pour le traitement des margines (Khdair <i>et al.</i> , 2020).	13
Figure I.5: Bassin d'évaporation (Rajhi <i>et al.</i> , 2018).	14
Figure I.6: Principales voies de valorisation des margines (Khdair <i>et al.</i> , 2020).	17
Figure I.7: Structures chimiques de quelques composés phénoliques (Mattonai <i>et al.</i> , 2019).	18
Figure I.8: Neutralisation d'un radical libre par le phénol	18
Figure I.9: Effet mésomère donneur du phénol	18
Figure II.1: Localisation de l'huilerie d'ENNAKHLA (Google Maps 2023).	30
Figure II.2: Margines brutes.	39
Figure II.3: Spectre FTIR des margines butes	43
Figure III.1: Pouzzolane vue sous une loupe binoculaire.	52
Figure III.2: Os bovin après traitement.	53
Figure III.3: Margines d'olive après 3 heures de repos.	54
Figure III.4: Etapes de préparation du substrat à base des margines.	55
Figure III.5: Diagramme d'isolement des souches.	57
Figure III.6: Ensemencement des différentes dilutions sur gélose (Sabouraud et PDA).	57
Figure III.7: Transfert des souches dans des tubes de bouillon Sabouraud.	58
Figure III.8: Schéma représentant la mini préparation pour le test de la fermentation des sucres (Tsigkou <i>et al.</i> , 2019).	64
Figure III.9: Granulométrie des supports.	67
Figure III.10: Fixation cellulaire sur les supports (Os bovin et pouzzolane).	69
Figure III.11 : Fermentation statique des différents milieux par les levures isolées à cellules libres et immobilisées à 30±2 °C, <i>pH_i</i> de 5,6 et sous agitation de 100 trs/mn.	73
Figure III.12: Fermentation statique des différents milieux par les <i>lactobacillus</i> sp. isolées à cellules libres et immobilisées à 37±1 °C, <i>pH_i</i> de 5,6 et sous agitation de 100 trs/min.	73
Figure III.13 : Fermentation éthanolique en culture discontinue «batch» à cellules libres à 30±2 °C pour levures et 37±1 °C pour les souches lactiques, <i>pH_i</i> 5,6 avec une agitation de 140 trs/mn pour les deux souches	74
Figure III.14 : Fermentation lactique en culture discontinue «batch» à cellules libres à 37±1 °C <i>pH_i</i> 5,6 avec une agitation de 140 trs/min en comparaison avec MRS.	75
Figure III.15 : Fermentation éthanolique en culture discontinue «batch» à cellules immobilisées à 30±2 °C pour levures et 37±1 °C pour les souches lactiques, <i>pH_i</i> 5,6 avec une agitation de 140 trs/min pour les deux souches.	75
Figure III.16: Fermentation lactique en culture discontinue «batch» à cellules immobilisées à 37±1 °C <i>pH_i</i> 5,6 avec une agitation de 140 trs/min en comparaison avec MRS.	76
Figure III.17: Dispositif de fermentation en culture continue à cellules immobilisées sur supports pouzzolane et os bovin.	76
Figure III.18: Aspect de quelques colonies fongiques sur milieu Sabouraud.	81

Figure III.19: Quelques exemples de souches levuriennes vue microscopique (Gx100).....	82
Figure III.21 : Observation de fixation des levures sur l'os bovin (Sous loupe binoculaire).	83
Figure III.22: Evolution de la production du gaz par 23 isolats levuriens à 30±2 °C dans le bouillon Sabouraud.	84
Figure III.23: Evolution de la production du gaz par 23 isolats levuriens à 30±2 °C dans les margines.	85
Figure III.24 : Evolution de la biomasse, pH et production d'éthanol en fermentation batch à cellules libre dans BS à 30±2 °C, pH non contrôlé, 100 trs/min.....	87
Figure III.25: Evolution de la biomasse, pH et production d'éthanol en fermentation batch à cellules libre dans le milieu MMD10 à 30 ± 2 °C, pH non contrôlé, 100 trs/min.	87
Figure III.26: Evolution de la biomasse, pH et production d'éthanol en fermentation batch à cellules immobilisées sur pouzzolane à 30 ± 2 °C, pH non contrôlé, 100 trs/min dans BS et MMD10.....	90
Figure III.27: Evolution de la biomasse, pH et production d'éthanol en fermentation batch à cellules immobilisées sur os bovin à 30 ± 2 °C, pH non contrôlé, 100 trs/mn dans BS et MMD10	90
Figure III.28: Evolution de la biomasse, pH et production d'éthanol en fermentation continue à cellules immobilisées sur Pouzzolane dans Sabouraud à 30 ± 2 °C, pH non contrôlé dans BS et MMD10	91
Figure III.29: Aspect microscopique de quelques souches de <i>lactobacilles</i> isolées (coloration de Gram) (G× 100)	95
Figure III.30: Aspect microscopique de quelques souches de <i>lactococcus</i> isolées (coloration de Gram) (G× 100)	95
Figure III.31: Evolution du pH et de l'acidité pendant 24 heures à 37 ± 1 °C et à un pH _i 6,5 de trois isolats Lb ₂ , Lb ₅ et Lb ₁₆	97
Figure III.32: Effet des milieux MRS, MMD10 et MMD10 _{75%} /L _{25%} sur la croissance de Lb ₁₆ à 37 ± 1 °C et pH _i 6,5 sous agitation de 100 trs/min en mode batch discontinu à cellules libres.	99
Figure III.33: Effet du milieu sur la production de l'acide lactique et le pH par Lb ₁₆ à 37 ± 1 °C et à un pH _i 6,5 sous agitation de 100 trs/min dans les milieux MRS, MMD10 et MMD10 _{75%} /L _{25%} en mode batch discontinu à cellules libres.	100
Figure III.34: Résultats de l'immobilisation de l'isolat Lb ₁₆ sur la pouzzolane.....	101
Figure III.35: Effet de l'immobilisation de l'isolat Lb ₁₆ sur la pouzzolane à 37±1 °C et à un pH _i 6,5 sur la production de l'acide lactique et le pH dans les milieux MRS, MMD10 et MMD10 _{75%} /L _{25%} en mode batch discontinue.....	102
Figure III.36: Effet de l'immobilisation de l'isolat Lb ₁₆ sur l'os bovin à 37 ± 1 °C et à un pH _i 6,5 sur la production de l'acide lactique et le pH dans les milieux MRS, MMD10 et MMD10 _{75%} /L _{25%} en mode batch discontinue.....	102
Figure III.37: Effet de l'immobilisation de l'isolat Lb ₁₆ sur la pouzzolane à 37 ± 1 °C et à un pH _i 6,5 sur la production de l'acide lactique et le pH dans les milieux MRS, MMD10 et MMD10 _{75%} /L _{25%} en mode continue.....	104
Figure III.38: Effet de l'immobilisation de l'isolat Lb ₁₆ sur l'os bovin à 37 ± 1 °C et à un pH _i 6,5 sur la production de l'acide lactique et le pH dans les milieux MRS, MMD10 et MMD10 _{75%} /L _{25%} en mode continue.....	104

Introduction générale

Introduction générale

Actuellement, la préservation de l'environnement constitue l'un des sujets majeurs à étudier et à cerner de très près et ce à l'échelle du globe terrestre. A travers tous les pays, qu'il s'agisse de nations développées ou pays en voie de développement, les gouvernements ont pris conscience de la gravité du danger inhérent à la dégradation de l'écosystème en général et de l'environnement urbain en particulier (Gueboudji *et al.*, 2021).

L'intérêt accordé à la valorisation des déchets ainsi que les sous-produits agricoles et industriels est de plus en plus croissant. Ceci est lié à la fois à la crise d'énergie, à la diminution des ressources mondiales en matières premières et à la législation qui devient de plus en plus sévère concernant la protection de la nature et de l'environnement (Afilal *et al.*, 2019).

Les résidus représentent une source d'énergie importante et disponible à moindre coût avec des possibilités d'être renouvelés et stockés. Le projet qu'apportera cette valorisation est évident puisque les matières premières jusqu'à présent en grande partie inutilisées ou mal exploitées ou source de coût supplémentaire pour les collectivités (Calabrò *et al.*, 2018).

Parmi les déchets les moins valorisés en Algérie, les margines, sous-produit rejeté dans la nature qui met en péril l'équilibre écologique. Une attention particulière a été accordée aux fermentations visant la récupération de ce déchet agro-industriel et sa transformation en éthanol à forte plus-value afin d'alléger la facture nationale de son importation par notre pays. Aussi, ce domaine constitue une avenue de recherche intéressante dont la fermentation anaérobie en offre la possibilité (Afilal *et al.*, 2019).

De nombreux sous-produits de l'industrie alimentaire sont rejetés dans la nature et constituent de ce fait un facteur de pollution de par leur grande quantité. En Algérie, pour la production d'huile d'olive, l'industrie d'huilerie rejette quotidiennement des tonnes de margines, soit pour chaque kilogramme d'olive produit, un résidu de 1 à 1,5 L de margines est rejeté. En plus les margines sont considérées comme matière polluante en raison de sa grande acidité. Elles contiennent des polyphénols (qui causent la stérilité du sol). Elles sont riches en matières organiques et minérales ce qui ont une forte demande chimique d'oxygène. Par conséquent une odeur nauséabonde durant leur stockage.

L'objectif de cette thèse est la valorisation des margines via la production de l'éthanol et l'acide lactique par immobilisation cellulaire sur un support solide qui semble être une alternative adéquate et prometteuse. Ce travail vise à proposer un outil de valorisation des margines par un procédé qui réduit le caractère polluant de ce sous-produit (Frasconi *et al.*, 2016).

En vue de produire des biomolécules tels que l'éthanol et l'acide lactique, des études ont été menées en utilisant d'autres matières alimentaires telles que le lactosérum, la mélasse, les rejets de figues sèches et les rejets d'amidonnerie, dans des bioréacteurs à cellules immobilisées sur des

supports. Les résultats obtenus, nous ont encouragé à croire qu'il y a une possibilité d'utiliser les margines et d'améliorer la productivité et le rendement en biomolécules.

Pour cela, cette thèse est structurée en trois chapitres :

Le premier chapitre est consacrée à une étude bibliographique portant sur les margines en se focalisant sur la répartition des producteurs de l'huile d'olives dans le monde, principaux rejets générés par l'extraction de l'huile d'olive. Cette partie permettra de mettre en lumière l'origine des margines, sa composition et ses caractéristiques, leur impact sur l'environnement, ainsi que leur traitement et leur valorisation. Une description de différents procédés de fermentation et bioréacteurs utilisés seront exposés.

Nous nous attacherons ensuite dans *le second chapitre* à la caractérisation des margines et à décrire les différentes propriétés des margines rejetées par l'huilerie d'ENNAKHLA (Chlef, Algérie). Nous décrirons les techniques et méthodologies utilisées pour l'analyse des margines en terme caractérisation physicochimiques et microbiologiques ainsi que la zone d'étude, l'échantillonnage des margines. Les paramètres analytiques de base des margines sera présentée en fin de ce chapitre (Résultats et discussion).

Le troisième chapitre sera dédié à la production de biomolécules par immobilisation cellulaire à savoir le bioéthanol et l'acide lactique. Il est divisé en deux parties :

- **Partie 1** est consacrée à la production de bioéthanol par les levures isolées à partir des margines traitées par fermentation alcooliques, étude des performances des levures isolées (*saccharomyces cerevisiae*) à partir de plusieurs niches écologiques, suivi de la cinétique de la production de l'éthanol en batch à cellules libres et immobilisées et en continu à cellules immobilisées sur deux supports : organique (os bovin) et inorganique (pouzzolane) ;
- **Partie 2** présente les résultats de l'étude des possibilités de production de l'acide lactique par les bactéries lactiques (*Lactobacillus* sp) isolées à partir des margines issus de l'huilerie par immobilisation cellulaire sur deux supports (os bovin et pouzzolane).

Enfin, une conclusion générale sera présentée. Elle résumera les principaux résultats obtenus lors de ce travail de thèse et donnera différentes perspectives pour les études futures.

Revue bibliographique

Chapitre I. Généralités sur **les margines**

Chapitre I. Généralités sur les margines

I.1 Introduction

Les margines issues de la production de l'huile d'olives sont l'un des effluents agro-industriels les plus importants dans les pays méditerranéens. Le déversement de cet effluent dans la nature est préjudiciable pour le sol, les plantes et les eaux souterraines à cause de son pouvoir polluant. Dans ce chapitre, nous allons passer en revue les méthodes connues pour le traitement et la valorisation des margines.

I.2 Répartition des producteurs de l'huile d'olives dans le monde

D'après le conseil international des pays producteurs de l'huile d'olives, la production mondiale a fluctué entre 2,5 à 3,3 million de tonnes durant la période 2019-2020 d'après le tableau I. 1 (IOC, 2022).

Tableau I.1: Répartition des producteurs de l'huile d'olive dans le monde durant la période 2019-2020 (IOC, 2022).

Pays	Production en 1000 tonnes		
	2018/2019	2019/2020	%
Espagne	1790	1230	39,1
Italie	174	340	10,8
Grèce	185	300	9,5
Portugal	100	125	4,0
Reste de l'Union Européenne	15	16	0,5
Tunisie	140	300	9,5
Turquie	194	225	7,2
Maroc	200	145	4,6
Algérie	97	82	2,6
Egypte	7	28	0,9
Argentine	28	26	0,8
Jordanie	21	26	0,8
Palestine	15	23	0,7
Territoires occupés en Palestine	16	19	0,6
Liban	24	19	0,6
Reste de l'IOC	35	39	1,2
Syrie	100	120	3,8
Australie	19	21	0,7
Chili	19	20	0,6
USA	16	16	0,5
Reste non IOC	24	24	0,8
Monde	3219	3144	100,0

Il ressort que la contribution des pays méditerranéens dans la production mondiale de l'huile d'olive s'élève à 88%. La part des pays du Maghreb représente 16% alors que la production algérienne ne dépasse pas 2,6 %. Ainsi, l'Algérie se situe au neuvième rang mondial et au huitième rang au niveau du bassin méditerranéen (IOC, 2022).

I.3 Principaux rejets générés par l'extraction de l'huile d'olive

L'huile d'olive est extraite par des moyens mécaniques. Trois méthodes sont utilisées à savoir: la presse traditionnelle, la centrifugation triphasée et la décantation biphasée (Albuquerque *et al.*, 2004; Morillo *et al.*, 2009).

La production de l'huile d'olives génère deux sous-produits : les grignons qui se composent principalement de pulpes et de noyaux d'olives et les margines qui se composent essentiellement d'eau issue du fruit lui-même et de l'eau utilisée pour le lavage et la transformation des olives (Brunetti *et al.*, 2005; Morillo *et al.*, 2009). L'extraction par décantation biphasée consomme de petites quantités d'eau, et de ce fait, de plus petites quantités d'effluents sont générées. Par contre, l'extraction par centrifugation triphasée génère une quantité de déchets au moins quatre fois plus importants que l'huile obtenue comme montré sur le tableau I.2 (Petrakis, 2006).

Tableau I.2: Rendement des différentes méthodes d'extraction de l'huile d'olives (Di Giacomo *et al.*, 2022).

Méthodes	Huile d'olives	Margines	Grignons
	Tonne/Tonne d'olives	m3/Tonne d'olives	Tonne/Tonne d'olives
Presse traditionnelle	0,2	0,5-0,6	0,4
Centrifugation triphasée	0,2	0,85-1,2	0,4-0,5
Décantation biphasée	0,2	--	0,8-0,95

I.4 Généralités sur les margines

Les margines sont issues de l'eau de végétation stockées dans les tissus mous des fruits d'olives en plus de l'eau utilisée dans les différentes étapes de la production de l'huile d'olive. Elles sont constituées principalement d'eau et d'autres matières de différentes natures organiques et inorganiques. Cet effluent pourrait être valorisé par le recyclage de la matière organique ainsi que les éléments nutritifs au profit des systèmes de cultures. De plus, l'irrigation en utilisant des effluents d'origine agro-alimentaire entre autres, est devenue une

pratique courante dans les régions arides et semi-arides. Des études récentes se sont penchées sur les effets des margines non traitées sur les caractéristiques du sol et les activités microbiennes par l'application des margines dans l'irrigation (Mekki *et al.*, 2013).

I.5 Origine des margines

Les processus employés dans l'extraction de l'huile d'olive comprennent le lavage des olives, le broyage des fruits, le malaxage et la séparation et enfin l'extraction de l'huile (Zbakh *et al.*, 2012). L'efficacité de l'extraction de l'huile est fonction du temps de mélange et du maintien de la température optimale. L'extraction à des températures élevées altère la qualité de l'huile et ne peut permettre l'étiquetage "pressée à froid" apprécié par certains marchés (Figure I. 1) (Azbar *et al.*, 2004).

La quantité d'eau utilisée dépend des méthodes de presse et des pratiques opérationnelles. La décantation biphasée peut séparer la phase huileuse de la pâte d'olives sans exiger l'addition de montants considérables d'eau et pratiquement sans produire de margines. Cette méthode génère deux produits seulement: de l'huile d'olives et la pulpe d'olives très humide avec une teneur en eau entre 65% et 70% en poids (Zbakh *et al.*, 2012).

La centrifugation triphasée est la méthode la plus utilisée due à la possibilité de l'automatisation élevée et de ce fait une réduction du travail manuel. Trois produits résultent de ce système : en plus de l'huile d'olive, la pulpe (grignons) et l'eau usée (marges). Cependant, ce processus exige l'utilisation de l'eau chaude pour la dilution de la pâte d'olive. Ceci génère un volume considérable d'effluents en plus il réduit la teneur en antioxydants dans l'huile (Khdair, Khdair, *et al.*, 2019).

Par conséquent, opter pour le procédé biphasé non seulement il permettra de conserver la qualité de l'huile mais aussi de réduire la consommation d'eau tout au long du processus. Ceci aurait un impact positif significatif surtout pour les pays maghrébins qui connaissent une pénurie d'eau (Khdair, Abu-Rumman, *et al.*, 2019; Khdair *et al.*, 2020). De plus, l'utilisation de quantités moindres d'eau se traduit par la génération de quantités inférieures de margines.

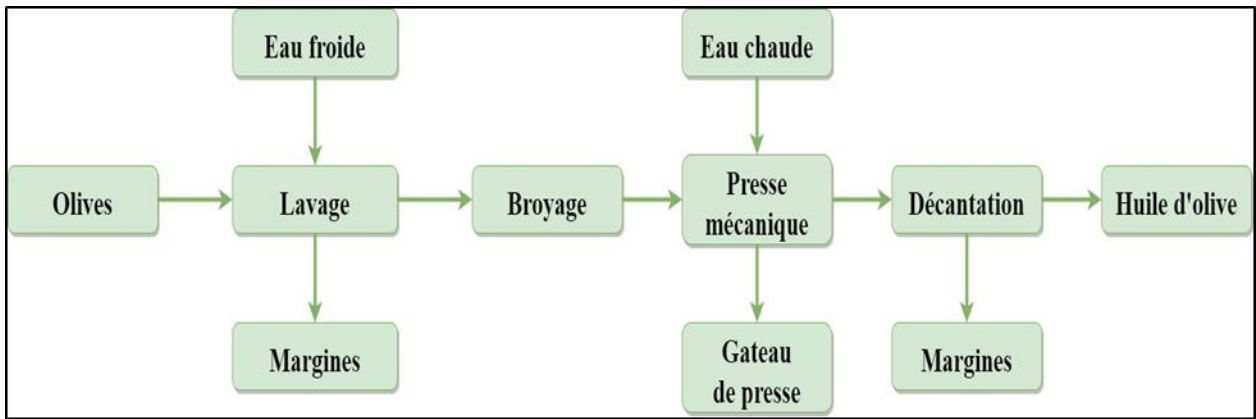


Figure I.1: Procédé traditionnel d'extraction de l'huile d'olive (Khdaïr, Khdaïr, *et al.*, 2019).

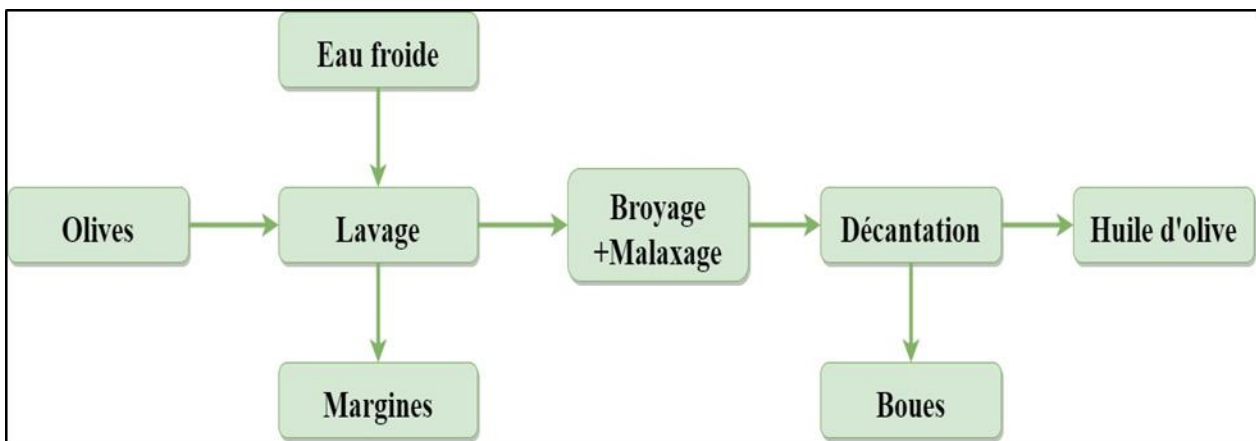


Figure I.2: Procédé en 2 phases d'extraction de l'huile d'olive (Khdaïr *et al.*, 2020).

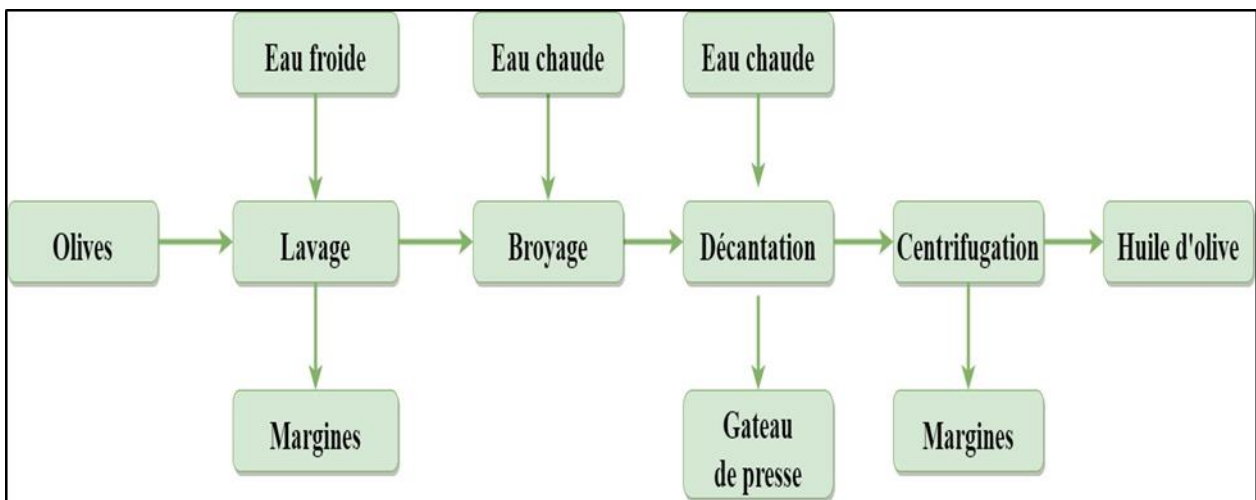


Figure I.3: Procédé en 3 phases d'extraction de l'huile d'olive (Khdaïr *et al.*, 2020).

I.6 Caractéristiques des margines

I.6.1 Caractérisation physicochimique

Les margines ont une couleur rouge-noir en raison de l'existence d'une forte concentration en composés phénoliques, une forte odeur désagréable, une forte concentration d'huiles et de graisses et une charge organique extrêmement élevée exprimée par la DCO et la DBO₅ jusqu'à 220 et 110 g/L, respectivement (Elkacmi *et al.*, 2019). Cette charge est supérieure à celle des eaux usées domestiques typiques (Albuquerque *et al.*, 2007). Les margines sont acides avec un pH de 4 à 6. Le pH acide des margines est principalement causé par la présence des acides organiques et dépend du degré de maturation des fruits et des conditions d'entreposage après la récolte. La conductivité électrique (CE) comprise entre 5 et 12 dS.m⁻¹, est le résultat de la présence de sels minéraux (Albuquerque *et al.*, 2007).

I.6.2 Caractérisation microbiologique

Les microorganismes présents dans les margines proviennent essentiellement du sol et de l'eau douce utilisée lors de la transformation des olives. La diversité de la flore microbienne dépend aussi de la variété des olives (Esmail *et al.*, 2014).

Les bactéries fécales sont rarement identifiées dans les margines, de ce fait, cet effluent ne pose par un problème hygiénique particulier (Sciancalepore *et al.*, 1996). Généralement, la flore bactérienne est constituée de Firmicutes, Actinobacteries, Alphaproteobacteries, Betaproteobacteries, Gammaproteobacteries et Bacteroidetes (Tsiamis *et al.*, 2012).

Les analyses microbiologiques montrent que les levures et les champignons sont capables de s'y développer mieux que les bactéries (Ntougias *et al.*, 2013). Ces microorganismes sont beaucoup plus résistants que les bactéries aux conditions de salinité élevée et le pH acide caractéristiques de cet effluent ainsi que les substances phénoliques. Parmi les levures, on trouve *Trichosporium cutaneium*, *Cryptococcus albidius* ainsi que les genres *Rhodotorula* sp., *Candida* sp. et *Saccharomyces* sp.. La flore fongique se compose essentiellement d'*Aspergillus flavius*, *Aspergillus candidus*, *Penicillium negricans*, et *Alternaria* sp.

I.6.3 Composition des margines

La caractérisation physico-chimique dans le but d'identifier les éléments les plus significatifs constitue une étape déterminante pour décider du meilleur moyen de traitement ou de valorisation de cet effluent. La composition des margines est largement affectée par le

système d'extraction, l'emplacement de l'installation et la saison ainsi que la variété des olives (Tableau I.3).

Tableau I.3: Composition physicochimique des margines (Khdair *et al.*, 2020).

Caractéristiques	Valeurs	Caractéristiques	Valeurs	Caractéristiques	Valeurs
Ph	4-6	COT (g.kg⁻¹)	34-40	Mg (g.kg⁻¹)	0,04-0,22
MS (%)	6-7	NT (g.kg⁻¹)	0,60-2,10	Fe (mg.kg⁻¹)	18-120
Eau (%)	83	C/N	52-54	Cu (mg.kg⁻¹)	1,5-6
DBO (g.L⁻¹)	35-110	P (g.kg⁻¹)	0,15-0,30	Mn (mg.kg⁻¹)	1-12
DCO (g.L⁻¹)	40-220	K (g.kg⁻¹)	2-9	Zn (mg.kg⁻¹)	2,4-12
CE (dS.m⁻¹)	5-12	Na (g.kg⁻¹)	0,1-0,4	Phénols (%)	1-11
MO (g.kg⁻¹)	46-62	Ca (g.kg⁻¹)	0,2-0,6		

MS : Matières sèches, DBO : Demande biologique en oxygène, DCO : Demande chimique en oxygène, CE : Conductivité électrique, MO : Matière organique, COT : Composés organique total, NT : Azote total.

Les caractéristiques physicochimiques des margines exigent leur traitement dans des installations spécifiques avant leur rejet direct dans les sols ou dans les cours d'eau. La toxicité envers les microorganismes est essentiellement due à la teneur en phénols totaux et le caractère acide. Néanmoins, la charge minérale encourage leur utilisation comme éléments de fertilisation (El Yamani *et al.*, 2020). Les principaux composants des margines sont :

- Les composés azotés (protéines) ;
- Les vitamines ;
- Les acides organiques ;
- L'huile (acide oléique) ;
- Les composés phénoliques.

L'application des margines dans l'irrigation des oliveraies est pratiquée surtout dans les régions semi-arides avec des sols sablonneux. L'apport en potassium, phosphore et carbone organique a un effet positif. Par contre, l'accumulation de substances phénoliques, de sel et l'augmentation de l'hydrophobicité du sol aurait un effet négatif. Pour cela, il est recommandé d'appliquer une quantité bien étudiée pour garder un équilibre favorable.

Généralement, il serait utile d'épandre une quantité de 30 à 80 m³ de margines par hectare et par an de façon alternative avec le contrôle périodique de l'hydrophobicité du sol (Kurtz *et al.*, 2021).

I.7 Impact des margines sur l'environnement

En raison de ses caractéristiques, les margines sont considérées comme un effluent industriel. Plusieurs études ont montré les effets néfastes du déversement des margines dans la nature notamment les eaux de surface et souterraines (Kapellakis *et al.*, 2015).

I.7.1 Impact des margines sur les cours d'eau

Les margines sont généralement rejetées dans les eaux naturelles ou stockées dans des bassins d'évaporation mal conçus. Cet effluent subit une fermentation naturelle et dégage des odeurs nauséabondes dues au dioxyde de soufre et le sulfure d'hydrogène. Le rejet des margines entraîne des conséquences sérieuses sur les plans d'eau naturels (Souilem *et al.*, 2017). Cet impact est principalement lié à la cadence saisonnière des rejets, de leurs compositions et à la concentration des différents constituants. L'effet le plus visible est la coloration des cours d'eau dû à l'oxydation de la matière organique ainsi qu'à la polymérisation des phénols donnant une couleur foncée (Souilem *et al.*, 2017).

L'infiltration de ces rejets vers les lacs ou la mer a un effet grave sur les écosystèmes aquatiques en raison du potentiel d'eutrophisation. La teneur en nutriments favorise la croissance de microorganismes surtout les algues, réduisant ainsi l'oxygène dissous dans l'eau aux dépens d'autres organismes vivants. Aussi, des agents pathogènes se multiplient et infectent les cours d'eau pouvant nuire à la vie aquatique et conséquemment aux êtres humains. Il a été estimé qu'un mètre cube de margines a un impact environnemental équivalent à 100 à 200 m³ d'eaux usées domestiques (Khdair *et al.*, 2020).

I.7.2 Impact des margines sur le sol

Les margines contiennent une grande quantité de substances organiques phénoliques qui peuvent avoir un impact négatif lorsqu'ils sont appliqués sur le sol. Néanmoins, les nutriments minéraux peuvent être valorisés en engrais pour le maintien de la fertilité des vergers d'oliviers. Avec un choix correct de sols, généralement calcaires et des cultures tolérantes à la phyto-toxicité des polyphénols, c'est un engrais alternatif intéressant comme une issue au problème d'élimination des margines. Par conséquent, les margines peuvent être utilisées comme amendement biologique dans l'agriculture avec des conditions contrôlées pour minimiser les effets négatifs à court terme sur la qualité du sol. Après une période d'attente appropriée allant jusqu'à 6 mois, les effets négatifs peuvent être considérés comme négligeables (Di Bene *et al.*, 2013).

I.7.3 Impact des margines sur l'air et sur le paysage

Les processus de fermentation et l'émission de nombreux gaz tels que le méthane et le dioxyde de carbone résultent du rejet de l'eau des plantes dans des bassins d'évaporation à ciel ouvert, sur le sol ou dans des eaux naturelles (Rigane *et al.*, 2011). Il génère des odeurs désagréables avec des conséquences négatives pour l'activité économique dans les zones touristiques et archéologiques.

I.8 Traitement des margines

Les margines doivent être traitées avant leur rejet dans l'environnement. Le traitement des margines est une option pour limiter la nocivité de cet effluent. Néanmoins, il est difficile de concevoir un système de traitement intégré vu la forte charge organique difficile à dégrader, le fonctionnement saisonnier des huileries ainsi que leur dispersion géographique et le coût élevé, en particulier pour les petites entreprises (Sounni *et al.*, 2018).

De nombreuses approches ont été testées pour le traitement des margines par des méthodes physiques telles que l'évaporation (Figure I.4), la filtration et l'ultrafiltration/osmose inverse (Sayadi *et al.*, 2000) ainsi que des méthodes chimiques dans lesquelles on distingue l'oxydation électrolytique, l'oxydation Fenton et la neutralisation à la chaux. Les méthodes physico-chimiques sont utilisées à savoir la flottation, l'adsorption, la sédimentation, la décantation, l'infiltration membranaire, la coagulation-floculation et l'électrocoagulation. Les approches biologiques sont plus intéressantes telles que la dégradation anaérobie ou aérobie, la bio-filtration, les boues activées, le compostage, le lagunage ou l'irrigation directe sur les sols (Sayadi *et al.*, 2000).

Les méthodes biologiques sont durables mais peu appropriés en raison de la phase de latence nécessaire au développement des microorganismes. Malheureusement, l'élimination totale des polluants ne peut être effectuée en appliquant une seule méthode. La combinaison des méthodes suscitées serait donc plus efficace et plus rentable (Esmail *et al.*, 2014).

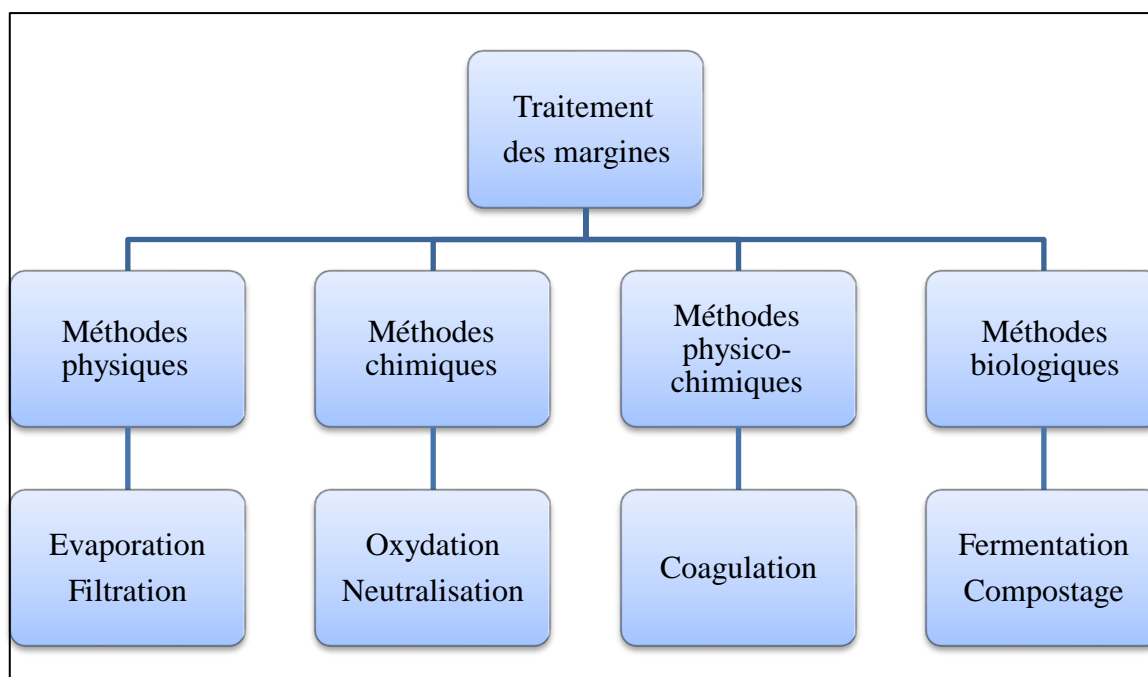


Figure I.4: Principales méthodes pour le traitement des margines (Khdaïr *et al.*, 2020).

Ciblant la réduction de la nocivité des margines, les méthodes actuelles utilisées pour le traitement des margines sont énumérés ci-après.

I.8.1 Méthodes physiques

L'objectif de ces méthodes est la réduction de la toxicité des margines par l'élimination des matières solides en suspension. Néanmoins, aucune technique ne permet de résoudre ce problème de façon écologiquement satisfaisante.

I.8.1.1 Évaporation

C'est la technique la plus économique et la plus répandue. Elle consiste à stocker les margines dans des bassins d'évaporation en profitant des conditions climatiques qui règnent surtout dans les pays méditerranéens (Figure I.5). Néanmoins, le processus est très lent et exige de grandes surfaces sans compter les odeurs désagréables dégagées lors de la décomposition de la matière organique (Rajhi *et al.*, 2018).

Les transformations biochimiques qui se déroulent naturellement dans les bassins d'évaporation favorisent la dégradation des composés phénoliques ainsi que les acides gras de longues chaînes carbonées. Ces transformations altèrent aussi la composition de la biomasse. La compétition entre les bactéries aérobies et anaérobies sur les ressources entraîne la disparition des bactéries mésophiles aérobies totales. L'utilisation des matières résiduelles

comme apport pour l'eau d'irrigation suscite le développement d'une activité bactérienne bénéfique et entraîne une augmentation de la fertilité du sol (Rajhi *et al.*, 2018).



Figure I.5: Bassin d'évaporation (Rajhi *et al.*, 2018).

I.8.1.2 Filtration et ultrafiltration

La filtration par des procédés membranaires est un axe de recherche très actif due à son importance dans le domaine du traitement des eaux. En plus, l'utilisation des membranes est favorisée par le coût de plus en plus décroissant aussi bien des installations que du fonctionnement. Pour le traitement préliminaire, la microfiltration et l'ultrafiltration sont appropriées tandis que la nano-filtration et l'osmose inverse sont réservées pour le traitement final (Coskun *et al.*, 2010). Typiquement, les membranes d'osmose inverse sont employées pour la production de l'eau douce à partir de l'eau de mer mais dans un domaine d'application plus large. Des travaux ont été rapportés sur l'efficacité des membranes combinant différentes techniques pour la récupération des polyphénols, la réduction très conséquente de la DCO et l'élimination des polluants de taille nanométrique (Zirehpour *et al.*, 2015; El Moudden *et al.*, 2019).

I.8.1.3 Autres méthodes physiques

La sonolyse est l'usage des ultrasons pour le traitement des eaux usées en occurrence les margines. L'applicabilité de cette technique a été testée (Al-Bsoul *et al.*, 2020) où l'élimination de 59% de la DCO a été obtenue. La combinaison des ultrasons avec l'UV et en

présence de nanoparticules de TiO₂ (sono-photocatalyse) s'avère efficace pour ce type de traitement (Al-Bsoul *et al.*, 2020).

I.8.2 Méthodes chimiques et physico-chimiques

Les réactions d'oxydation des margines suscitent une attention particulière en raison de leur efficacité, facilité de mise en action, temps de réaction court, faible production de boues, sécurité et compatibilité environnementale. Le but final de ce type de traitement est de réduire la charge polluante, y compris la DCO, les polyphénols, les solides en suspension, la turbidité et la coloration (Elkacmi *et al.*, 2019). Le principe général de la réaction d'oxydation est la génération d'espèces chimiques oxydantes de type radicaux libres tels que le radical hydroxyle (OH[•]), l'ion super-oxyde (O₂^{•-}), l'anion ozonide (O₃^{•-}), le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂[•]). Les polluants organiques sont oxydés par ces radicaux libres produisant des intermédiaires biodégradables, puis en phase finale, ils sont transformés en eau, en dioxyde de carbone et en sels inorganiques. L'oxydation Fenton est un moyen simple de produire des radicaux hydroxyles (OH[•]) dans un temps de réaction court. Elle nécessite des produits chimiques peu coûteux et un équipement simple pour l'exécution et le contrôle. Un mélange d'eau hydrogénée H₂O₂ et des sels Fe²⁺ est ajouté directement aux margines selon la réaction générale :



Il serait intéressant d'utiliser d'autres effluents industriels comme source d'ions ferreux. L'oxydation Fenton des margines durant 60 min, conduit à l'élimination totale à 100% des polyphénols et une minéralisation de 25% utilisant un mélange de 100 mg/L d'eau oxygénée et 1 g/L de catalyseur riche en Fe²⁺ issu de l'industrie de l'aluminium «RED MUD» (Domingues *et al.*, 2019).

Les méthodes physico-chimiques sont relativement de faible coût. Cependant, elles ne permettent pas d'éliminer complètement la charge polluante. L'un de ces méthodes est l'électrocoagulation. Ce procédé a lieu lorsqu'un courant continu est appliqué à des électrodes métalliques (anode et cathode) immergées dans l'eau usée à traiter. Il y a deux réactions électrochimiques principales qui ont lieu dans le processus: les cations (Fe²⁺ ou Al³⁺) sont libérés dans la solution à l'anode et l'eau se réduit en hydrogène gazeux (bulle) et OH⁻ sur la cathode (Barrera-Díaz *et al.*, 2018). L'électrocoagulation a été évaluée pour le prétraitement des margines et la production de bio-fuel. Des travaux ont été réalisés en utilisant un courant jusqu'à 2 Ampères et des électrodes en Al ou Fe conduisant à la production de méthane, d'hydrogène et d'éthanol à partir des margines (Ntaikou *et al.*, 2020).

I.8.3 Traitements biotechnologiques des margines

La dégradation de la matière organique par des microorganismes constitue la meilleure approche respectueuse de l'environnement pour le traitement des margines (Sierra *et al.*, 2007; Dakhli *et al.*, 2021; Vaz *et al.*, 2022).

I.8.3.1 Fermentation

La fermentation anaérobie pour le traitement à grande échelle ainsi que pour la production d'énergie renouvelable constitue un processus prometteur et une méthode de choix pour surmonter les problèmes de gestion des effluents agro-industriels.

Les méthodes aérobies ont une capacité d'élimination plus élevée que les méthodes anaérobies. Les microorganismes utilisés sont de type naturel tel que champignons, protozoaires, bactéries et autres microbes. Toutefois, cette approche requiert une aération en continu ce qui rend le procédé coûteux (Vlyssides *et al.*, 2004; Altieri *et al.*, 2011). L'oxygène est fourni soit par agitation de la solution, soit par apport d'air comprimé. Cependant, l'efficacité de ces méthodes est limitée par les substances toxiques difficilement biodégradables comme les polyphénols (Altieri *et al.*, 2011). En termes d'économie et de faisabilité, ces méthodes de traitement ne sont pas encore disponibles pour une exploitation industrielle.

I.8.3.2 Compostage et Co-compostage des margines

Le compostage est un processus biologique naturel où divers microorganismes décomposent la matière organique en substances plus simples dans des conditions aérobies contrôlées. Il évolue en trois phases consécutives: une phase initiale d'activation, une phase thermophile identifiée par une augmentation soudaine de la température et enfin une phase mésophile où la matière organique se refroidit pour revenir à la température environnante (Chowdhury *et al.*, 2013). Ce système permet de recycler les margines et la récupération de matières comme additifs organiques de haute qualité à utiliser dans l'agriculture pour remplacer l'amendement en fumier animal ou en engrais chimiques sur les cultures intensives (Roig *et al.*, 2006).

Le co-compostage des margines avec d'autres effluents d'origine agro-alimentaires s'avère un moyen efficace pour la production d'amendement organique pour les sols (Bougarne *et al.*, 2019). La surveillance des paramètres physico-chimiques au cours de ce processus permet un meilleur contrôle de la biodégradation de la matière organique et la bioconversion en matières riches en nutriments (N, P, K) et sans effet phyto-toxique.

L'application de ce type de compost aurait un effet très positif sur la germination des plantes et la fertilisation des sols.

I.9 Valorisation des margines

Hormis le sérieux problème environnemental, les margines représentent une ressource précieuse de composés utiles à des fins de récupération et de valorisation. De nombreuses voies très intéressantes mais peu répandues de valorisation des déchets des huileries ont été développées.

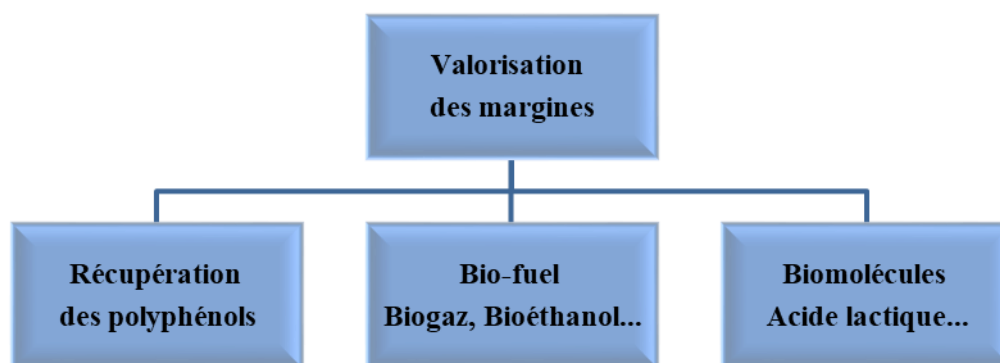


Figure I.6: Principales voies de valorisation des margines (Khdaïr *et al.*, 2020).

I.9.1 Récupération des polyphénols

Les polyphénols sont des substances largement présentes dans le règne végétal, avec plus de 8000 molécules actuellement connues. Ils peuvent être classés d'après leur structure chimique qui porte un ou plusieurs fonctions hydroxyle, allant de composés simples, telles que les acides phénoliques, à des composés polymérisés, tels que les tanins (Rocha *et al.*, 2022). Plus de 50 composés phénoliques différents ont été identifiés dans les margines, notamment l'hydroxytyrosol, le tyrosol et d'autres composés phénoliques, tels que les acides caféique et férulique, qui sont associés à des propriétés anti-oxydantes, anti-inflammatoires et antimicrobiennes (Carrara *et al.*, 2021). La structure de quelques composés phénoliques est représentée par la figure I.7.

Cependant, la présence des composés phénoliques dans les margines dépend à la fois qualitativement et quantitativement selon la variété des olives, les conditions climatiques, les pratiques culturales, le temps de stockage des olives et le processus d'extraction de l'huile d'olive (Frasconi *et al.*, 2019). La teneur élevée en composés phénoliques à forte activité anti-oxydante (principalement l'hydroxytyrosol) fait des margines une source intéressante pour ces composés bioactifs potentiellement prisés sur le marché des compléments alimentaires, dans

les formulations d'aliments et de boissons ainsi que dans les produits cosmétiques (Bellumori *et al.*, 2018).

L'activité biologique des margines et de leurs principaux composés bioactifs, est notamment due à leur activité anti-oxydante, elle-même liée à leur capacité à stabiliser les radicaux libres. L'activité anti-oxydante des fonctions hydroxyles des composés phénoliques participent par leurs propriétés de donneurs d'électrons. Ceci permettra de neutraliser les espèces oxygénées réactives formant ainsi des radicaux plus stables *via* l'effet mésomère. La réaction de neutralisation d'un radical libre par le phénol est schématisée par la Figure I.8 :

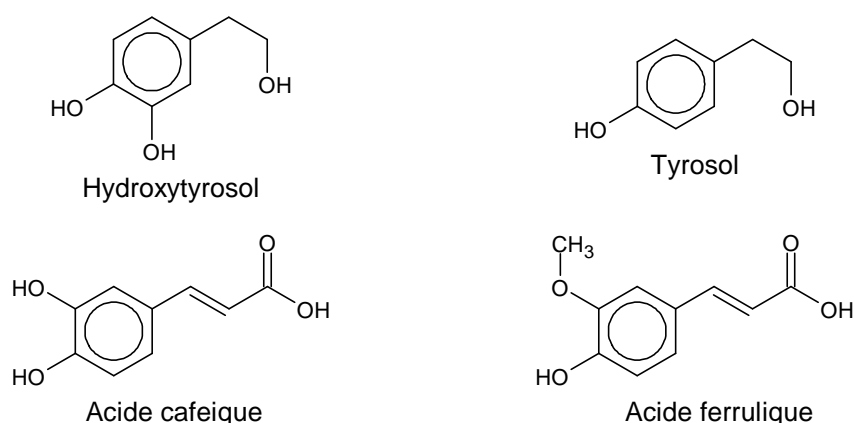


Figure I.7: Structures chimiques de quelques composés phénoliques (Mattonai *et al.*, 2019).

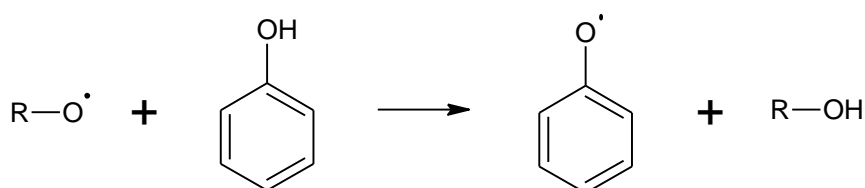


Figure I.8: Neutralisation d'un radical libre par le phénol

La Figure I. schématise l'effet mésomère du phénol conduisant à la stabilisation du radical libre :

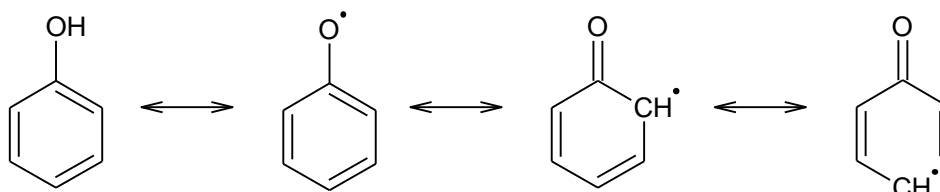


Figure I.9: Effet mésomère donneur du phénol

I.9.2 Production de bio-fuel

En raison de leur composition en matière organique, les margines sont considérés comme une ressource prometteuse d'énergie renouvelable après traitement par fermentation anaérobie (Gonçalves *et al.*, 2010). Ce traitement est la conversion biologique de substrats organiques en CH₄, CO₂, H₂S et H₂O à différentes températures par l'action de consortiums microbiens méthanogènes.

Le biogaz est formé par des bactéries lors de la dégradation anaérobie de la matière organique. C'est un processus très complexe et nécessite certaines conditions environnementales ainsi que différentes populations bactériennes. Le processus de dégradation dépend également de la température et du temps pour une conversion complète (Sampaio *et al.*, 2011).

Une étude a été réalisée par Tamborrino *et al.* sur une usine de fermentation anaérobie à grande échelle (Tamborrino *et al.*, 2021). Ses résultats montrent la possibilité d'alimenter une installation exclusivement avec les effluents de l'huile d'olives et la performance de l'usine étudiée peut être considérés comme comparables à d'autres plantes usines alimentées avec de la biomasse composées d'autres types de plantes ou de matrices organiques. Les résultats montrent une production spécifique de biogaz très appréciable avec un taux élevé en méthane. Le biogaz produit était de l'ordre de 0,70 m³/kg avec un pourcentage de méthane d'environ 60%.

Le bio-hydrogène pourrait aussi être obtenu par fermentation des margines. Dans une contribution de Papazi *et al.*, il a été montré que des micro-organismes (micro algues et microflore) activaient la biodégradation des margines et produisaient de l'hydrogène (Papazi *et al.*, 2019).

Dans un système d'incubation fermé, l'ajustement approprié du pH conduit à l'établissement de conditions anoxiques par la consommation de la totalité de l'oxygène au cours du premier stade de l'incubation. Par la suite, la biodégradation s'arrête et l'activation des hydrogénases commence, conduisant à la production de bio-hydrogène avec un rendement élevé et continu. Le rapport coût/profit semble prometteur et suggère l'utilisation de cette approche dans le future.

Le bioéthanol est une source d'énergie propre et renouvelable. Sarris *et al.* ont démontré la faisabilité de produire du bioéthanol au cours d'un processus de biodégradation qui réduit considérablement la charge polluante des margines par fermentation aérobie de levure (Sarris *et al.*, 2016).

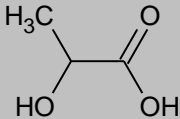
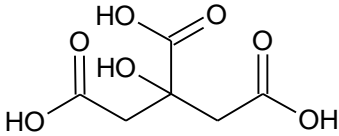
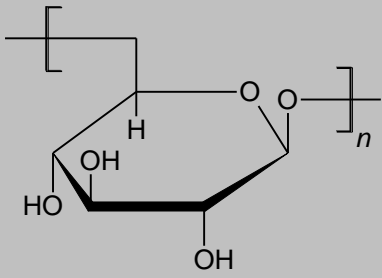
Des souches sélectionnées des espèces suivantes: *Candida tropicalis*, *Pichia kudriavzevii*, *Pichia manshurica*, *Kluyveromyces marxianus* et *Ogataea zsoitii*, étaient capables de produire de l'éthanol à des températures allant jusqu'à (≥ 42 °C).

I.9.3 Synthèse ou extraction de biomolécules

Plusieurs biomolécules ont été synthétisé et extraites à partir des margines par fermentation avec des microorganismes spécifiques. Le

Tableau I. suivant résume quelques principaux résultats relevés de la littérature.

Tableau I.4 : Quelques biomolécules issues des margines par fermentation.

Biomolécule	Microorganismes
 <p>Acide lactique</p>	<p><i>Lactiplantibacillus plantarum</i>, <i>Levilactobacillus brevis</i> et <i>Candida famata</i> (Atfaoui <i>et al.</i>, 2021)</p>
 <p>Acide citrique</p>	<p><i>Yarrowia lipolytica</i> (Sarris <i>et al.</i>, 2019)</p>
 <p>β-glucans</p>	<p><i>Botryosphaeria rhodina</i> (Crognale <i>et al.</i>, 2003) <i>Basidiomycetes</i> (Zerva <i>et al.</i>, 2017)</p>

I.10 Procédés de fermentation et bioréacteurs

Durant ces dernières décennies, les techniques biologiques sont de plus en plus utilisées, ces techniques sont devenues incontournables en matière de production des agents conservateurs et antibactériens dans l'alimentation humaine et animale. En effet, l'utilisation de micro-organismes présente une excellente capacité de production des substances antimicrobiennes notamment les acides organiques et les bactériocines avec cependant une étape de purification coûteuse (Nadour *et al.*, 2015).

I.10.1 Fermentation

Le mot fermentation présente deux significations différentes pour les biochimistes et les microbiologistes industriels. En biochimie, les fermentations sont des voies cataboliques anaérobies au cours desquelles des composés organiques servent à la fois de donneurs et d'accepteurs d'électrons, la synthèse d'ATP étant réalisée par phosphorylation au niveau du substrat (Assemany *et al.*, 2019).

En microbiologie industrielle, le terme de fermentation désigne l'opération unitaire qui permet de produire de la biomasse ou des produits de bioconversion par la culture de micro-organismes (MEDOUNI-HAROUNE *et al.*, 2018).

La fermentation est un processus produisant de l'énergie par oxydation de composés organiques, principalement des glucides, où un donneur d'électron, NADH cède ses électrons à un accepteur endogène, le pyruvate. Dans la respiration, les électrons sont donnés à un accepteur exogène, l'oxygène pour la respiration aérobie et le nitrate ou le sulfate pour la respiration anaérobie. La fermentation ne nécessitant pas l'absence totale d'oxygène, certaines levures comme *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) et certaines bactéries comme *Lactobacillus plantarum* (*Lb. plantarum*) utilisent la fermentation en présence d'oxygène pour dégrader les sucres (Campanari *et al.*, 2014).

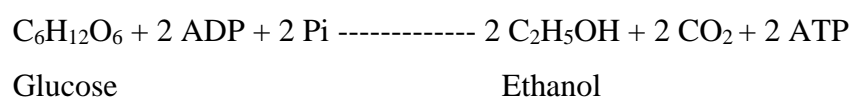
Les sucres tels que le glucose, le fructose, le lactose ou le saccharose sont les substrats les plus utilisés pour la fermentation, engendrant la production d'énergie et de métabolites comme l'acide lactique et l'éthanol avec un dégagement de gaz (CO₂) dans certains cas (Lanza *et al.*, 2020).

Cependant d'autres métabolites, moins communs comme l'acide butyrique et le butanol sont produits au cours de la fermentation (Romo-Buchelly *et al.*, 2019).

I.10.1.1 Types de fermentation

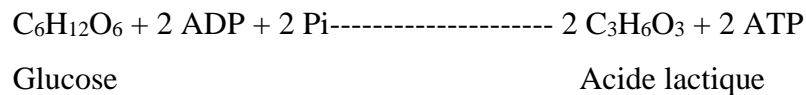
Il existe plusieurs voies de fermentations, dont la fermentation alcoolique, la fermentation lactique, la fermentation butyrique et la fermentation propénoïque. Les fermentations alcoolique et lactique sont les plus connues et les plus couramment utilisées par les microorganismes. La fermentation alcoolique, principalement réalisée par les levures telle que *S. cerevisiae*, produit de l'éthanol et du CO₂. Elle est souvent utilisée pour la production de boissons alcooliques (Dourou *et al.*, 2016).

La réaction bilan de la fermentation alcoolique est :



La fermentation lactique est réalisée par les bactéries lactiques pour produire principalement de l'acide lactique et d'autres métabolites tels que l'éthanol et le CO₂ (Lin *et al.*, 2020).

La réaction bilan de la fermentation lactique est :



I.10.2 Fermenteurs ou bioréacteurs

Le bioréacteur (ou fermenteur) est une enceinte permettant d'assurer une croissance des micro-organismes et une production optimale dans un environnement dont les paramètres physiques et chimiques de la fermentation sont contrôlés (Sounni *et al.*, 2018).

I.10.2.1 Description du bioréacteur

Le bioréacteur ou fermenteur est généralement constitué d'une cuve fermée, étanche à l'air et de préférence isolée thermiquement de l'extérieur dans laquelle différents microorganismes se côtoient pour dégrader chimiquement et biologiquement les déchets et effluents organiques et produire des métabolites (acides organiques, substances volatiles, biogaz) (Tallou *et al.*, 2020).

I.10.2.2 Procédés de cultures

La fermentation peut se faire selon trois modes principaux : en lot (batch), en continu ou en lot réalimenté (fed-batch) avec ou sans recirculation. Le choix du mode est guidé en partie par le type de produit recherché. La croissance exponentielle d'une culture peut être prolongée par l'addition continue de milieu frais au réacteur et il est possible d'ajuster le taux de dilution à un rythme qui maintient la concentration de produit au maximum (Calabrò *et al.*, 2018).

Les bioréacteurs peuvent être classés selon :

Le mode d'alimentation : batch, continu ou semi-continu ;

Le type de substrats : solide, semi-solide ou liquide ;

Le nombre d'étages : mono-, bi- ou poly-étage.

➤ Réacteurs en « batch »

La réaction est conduite de façon discontinue. Ce mode de réaction est préconisé dans le cas de faibles volumes. Le système est clos durant le temps de réaction. Une pointe d'addition peut être ajoutée au système en cas de régulation de pH, mais aucun substrat ou enzyme n'est ajouté au système. Le volume réactionnel est le même et l'agitation peut être conduite de façon homogène tout le temps de la réaction (Turco *et al.*, 2020).

➤ **Réacteurs en « fed batch »**

La réaction dans ce cas est conduite différemment. La réaction commence avec un petit volume de substrat. La quantité du matériel biologique présente est en plus forte concentration que lors d'un système en batch et la réaction démarre plus vite. La matrice à transformer est ensuite introduite en continu dans le réacteur. Le volume total est en augmentation constante. Cette technique est utilisée dans le cas de fermentation microbienne (Piperidou *et al.*, 2000).

➤ **Réacteurs continus**

Dans ce type de réacteur, la cuve est alimentée et soutirée en continu. Pour réaliser la transformation, l'enceinte de la cuve est différente des deux autres précédemment citées puisque une évacuation sélective est réalisée de façon à ce qu'uniquement le produit sorte de l'enceinte (Piperidou *et al.*, 2000).

Un des problèmes majeur de ce type de procédé est l'encrassement par les différentes substances colmatantes résultant de l'opération de transformation (en effet, ce type de système nécessite un milieu réactionnel peu colmatant, sinon la mise en place de systèmes de pré-filtration (tamis, filtre...)).

Afin d'augmenter l'activité spécifique de la biomasse, la formation d'un biofilm à l'intérieur du réacteur est apparue comme une solution intéressante. Le biofilm constitue un ensemble de microorganismes inclus dans une matrice poreuse de polymères biologiques. Il est fixé ou non à un support (Hodaifa *et al.*, 2020).

Parmi les réacteurs à biomasse fixée, les réacteurs à lit fixe sont des réacteurs les plus utilisés, ils se composent d'un milieu réactionnel rempli d'un solide sur lequel vont se fixer les bactéries. Le garnissage est un support inerte de nature variée (roche, verre, plastique) et de forme diverse (sphères, cubes, grillage, lamelles). Ces réacteurs fonctionnent avec un flux ascendant ou descendant. Les principaux avantages de ce type de procédés sont leur facilité de fabrication et l'absence de mélange mécanique. Ils présentent également une robustesse et une bonne stabilité vis à vis des chocs organiques, ainsi qu'un recouvrement rapide d'activité après une longue période d'arrêt (Değermenci *et al.*, 2016).

Cependant, il a été prouvé qu'une grande partie de la biomasse retenue dans le réacteur n'est pas attachée et reste dans les interstices du support. Ceci engendre le colmatage de certaines zones du réacteur et réduit ses performances jusqu'à un dysfonctionnement complet. L'application d'un flux descendant a permis de réduire le problème majeur du colmatage (Carlini *et al.*, 2014).

➤ **Systèmes immobilisés**

Le terme d'immobilisation a été défini comme 'le confinement ou localisation physique de cellules intacts dans une certaine région de l'espace tout en préservant certaines activités catalytiques souhaitées'. L'immobilisation permet de disposer d'une population microbienne dense, active et facilement utilisable (Conidi *et al.*, 2014).

Les intérêts de développer de tels systèmes sont multiples. Parmi eux, il est à noter notamment une réponse aux problématiques industrielles habituelles que sont entre autres les gains de productivité, la facilité d'opération, le recyclage de la biomasse. Un autre avantage recherché est aussi la possibilité de contrôler directement les réactions mises en jeu.

I.10.3 Biofilm

Les bactéries vivent le plus souvent attachées à des supports et leur mode vie est sessile (par opposition au mode de vie planctonique ou vie à l'état libre observée dans des milieux liquides) (Gunay *et al.*, 2015).

Le biofilm est un ensemble de microorganismes immobilisés sur une surface substrat, typiquement enrobé dans une matrice polymérique organique d'origine bactérienne (Gunay *et al.*, 2015). Les bactéries vivant dans le biofilm ont des propriétés sensiblement différentes des bactéries libres de la même espèce (Scoma *et al.*, 2011).

I.10.3.1 Formation du biofilm

La formation du biofilm est un phénomène complexe se déroulant en plusieurs étapes.

a) Phase de latence

Cette période correspond au temps nécessaire pour la formation de la première couche de cellules fixées. C'est la succession de deux étapes :

- Conditionnement organique de la surface du solide.
- Adhésion des cellules sur le support.

b) La croissance du biofilm

Les cellules se développent en micro-colonies et se développent rapidement à la surface du support. La phase de croissance est rapide; elle suit une phase exponentielle avec une consommation du substrat qui augmente jusqu'à une épaisseur critique du biofilm (épaisseur active) au-delà de laquelle le taux de consommation du substrat n'évolue plus (Gunay *et al.*, 2015). Ce phénomène est attribué aux limitations de diffusion du substrat à l'intérieur de la biomasse fixée. La durée de la phase de

croissance dépend de la quantité de substrat disponible dans le milieu, c'est-à-dire de la charge nominale du réacteur.

c) Phase d'équilibre

Le biofilm atteint son épaisseur maximum avec une stabilisation de la biomasse fixée lorsque la production de biomasse est compensée par le détachement du biofilm à la surface du fluide. Cette couche biologique est donc un système dynamique en équilibre entre la production des nouvelles cellules, liée à la croissance, et le détachement (Volpe *et al.*, 2018).

d) Détachement

Le détachement est le résultat de plusieurs phénomènes :

- La consommation des bactéries de la surface du biofilm par les protozoaires.
- La mort cellulaire.
- L'érosion (la perte permanente de petites particules de la surface du biofilm, essentiellement provoquée par les forces de cisaillement).
- L'abrasion (analogue à l'érosion, mais provoquée par les collisions de particules).

I.10.4 Croissance bactérienne

La croissance bactérienne est le déroulement à intervalle de temps régulier de la masse cellulaire et du nombre de cellules d'une culture bactérienne donnée. La croissance est souvent limitée par la disponibilité des nutriments et beaucoup d'autres facteurs de l'environnement (Martínez-Gallardo *et al.*, 2021).

I.10.4.1 Détermination des besoins nutritifs

La croissance des bactéries dépend des conditions nutritionnelles et environnementales qu'elles rencontrent. En effet, les micro-organismes ne peuvent se développer de façon optimale que dans une gamme limitée de facteurs physico-chimiques (tels que la température, le pH, la salinité, etc.) et nécessitent un apport en carbone, azote et phosphate, requis pour la synthèse des constituants cellulaires (protéines, acides nucléiques, etc.) (Martínez-Gallardo *et al.*, 2021).

I.10.4.2 Cinétiques de la croissance bactérienne

La croissance d'une bactérie s'étudie en milieu liquide non renouvelé. Il existe 07 phases dont l'ensemble constitue la courbe de croissance (Hodaifa *et al.*, 2020).

1. la phase stationnaire initiale ou phase de latence : elle est caractérisée par une vitesse de multiplication nulle. Cette phase correspond à une période d'adaptation de l'inoculum à son

nouvel environnement de croissance. La durée de cette période dépend de la nature du milieu d'accueil, de l'état physiologique des cellules inoculées et éventuellement de la taille de l'inoculum.

2. la phase d'accélération : ou la phase d'augmentation de la vitesse de croissance qui passe plus ou moins rapidement de zéro à sa valeur maximale.

3. la phase de croissance à vitesse constante maximale ou phase de croissance exponentielle : elle se présente sous la forme d'une portion linéaire lorsque l'on représente l'évolution du logarithme de la concentration bactérienne ou de la biomasse en fonction du temps. Les cellules se trouvent dans leur état physiologique maximal. La vitesse de reproduction atteint son maximum et reste constant pendant toute cette phase.

4. la phase de ralentissement : dans cette phase, on remarque un épuisement du milieu de culture suite à la disparition d'un ou plusieurs composants nécessaires à la croissance bactérienne tels que (C, N, P...). Le taux de croissance va diminuer progressivement pour s'annuler à la fin.

5. la phase stationnaire maximale ou plus simplement phase stationnaire qui correspond à un arrêt de la croissance, la culture atteint alors sa densité maximale. Le ralentissement puis l'arrêt de la croissance sont dus à l'épuisement d'une substance nutritive ou à toutes autres modifications des propriétés du milieu de culture le rendant impropre à la croissance des microorganismes. Les bactéries qui se multiplient compensent celles qui meurent.

6. la phase de la décroissance.

7. la phase de déclin : Toutes les ressources nutritives sont épuisées. Il y a accumulation de métabolites toxiques, induisant diminution d'organismes viables (mort des bactéries et lyse cellulaire).

Partie expérimentale

Chapitre II. Caractérisation

des margines

Chapitre II. Caractérisation des margines d'olives

II.1 Introduction

Les margines proviennent de l'eau de végétation des olives, de l'eau ajoutée lors du procédé d'extraction et de l'eau de lavage (Gueham, 2019). Les margines sont souvent rejetées dans les eaux des oueds, elles représentent ainsi une source de pollution importante.

Ce chapitre cible la caractérisation des margines issues de l'huilerie traditionnelle d'ENNAKHLA (Chlef, Algérie). Dans cette étude, la caractérisation physicochimique et aussi bien microbiologique des margines brutes sont présentées. Ces caractéristiques vont jouer un rôle important dans le processus de valorisation des margines tout en prenant en considération leur richesse en apport nutritionnel pour la croissance et le développement des microorganismes.

II.2 Matériel et méthodes

II.2.1 Zone d'étude

La production de l'huile d'olives est l'une des objectifs de la culture de l'olivier. L'huile d'olives au niveau de l'huilerie de Medjadja est extraite principalement à partir des olives de la variété «Sigoise» et d'autres types cultivés dans la wilaya de Chlef.

Les prélèvements des margines ont été effectués au niveau de l'unité de trituration d'ENNAKHLA qui se situent dans la localité de Medjadja sise dans le nord de l'Algérie ($36^{\circ}15'36''N1^{\circ}24'50''E$). La commune de Labiadh Medjadja est située à 10 km au Nord-Est du Chef-lieu de la wilaya. La région se distingue par son riche patrimoine culturel. Le village de Medjadja à vocation agricole est fondé dans les années 1970. Le vieux village est situé à 4 km au nord au cœur du massif à 400 mètres d'altitude. Elle est limitée par la commune de Zeboudja au nord, la commune d'Oum Drou au Sud, à l'Est par la commune de Beni Rached et à l'ouest par la commune d'Ouled Fares et la commune de Chlef.

L'huilerie d'ENNAKHLA est limitée par des terrains agricoles vers le Nord et vers l'Ouest, un groupe d'habitants vers l'Est et le Sud. Elle est spécialisée dans la production de l'huile d'olive avec un système à trois phases, et ayant un mode d'extraction conforme aux exigences des normes biologiques. Le processus d'extraction débute par l'effeuillage, le lavage, le broyage et le malaxage, le pressurage, la décantation et le stockage. Pour préserver sa bonne saveur et toutes ses qualités nutritives, l'huilerie d'ENNAKHLA stocke ses huiles à l'abri de l'air et de la lumière dans des citernes en inox et à température contrôlée.



Figure II.1: Localisation de l'huilerie d'ENNAKHLA (Google Maps 2023).

II.2.2 Echantillonnage des margines

Tous les échantillons des margines ont été collectés entre novembre et janvier 2016, 2017 et 2018 pendant la période de récolte des olives. Les margines faisant l'objet de cette étude ont été prélevées à partir des bassins de stockage. Ces échantillons ont été placés dans des bouteilles stérilisées et rincés plusieurs fois avec les margines à analyser puis fermés hermétiquement sans laisser de bulles d'air. Les bouteilles sont conservés à 4 °C et à l'abri de la lumière afin d'éviter leur fermentation jusqu'à ce qu'ils soient utilisés pour la caractérisation physico-chimique. Cependant, l'analyse microbiologique a été réalisée juste après le prélèvement.

II.2.3 Paramètres analytiques de base des margines

L'analyse physicochimique et microbiologique des échantillons des margines a été réalisée au niveau du Laboratoire de Bioressources Naturelles (LBRN) à l'Université Hassiba Ben Bouali de Chlef.

La caractérisation de manière globale et pertinente du niveau de pollution présent dans les effluents réside à des déterminations des volumes rejetés et la quantité de matière contenant principalement du carbone, de l'azote et du phosphore. Cela n'exclut pas qu'une attention particulière soit portée ponctuellement sur d'autres éléments.

II.2.3.1 Paramètres organoleptiques

- **Couleur** : liée au déversement de composés chimiques solubles présentant une coloration marquée (Rodier *et al.*, 2009). Elle est normalement grisâtre, la couleur noire indique une décomposition partielle des autres teintes qui sont d'origine industrielle. La coloration d'une eau est due tant à des substances minérales et organiques dissoutes qu'à des particules en suspension.
- **Odeur** : une eau destinée à l'irrigation doit être propre. En effet, toute odeur est un signe de pollution ou de la présence de matières organiques en décomposition (Rodier *et al.*, 2009). Les margines ont une odeur fade et désagréable, une odeur nauséabonde indique une eau qui commence à fermenter par stagnation soit dans les bacs de stockage.
- **Saveur** : est liée surtout aux MES (argiles, algues...etc.) sauf dans les eaux très douces et acides notamment l'acide humique (Vossen, 2007).

II.2.3.2 Analyse physicochimique des margines

Selon les normes de l'Association Française de Normalisation (AFNOR), la caractérisation physico-chimique est portée sur les paramètres suivants: *pH*, acidité, conductivité électrique (CE), turbidité, salinité, matière sèche (MS), matière en suspension (MES), demande chimique en oxygène (DCO), demande biologique en oxygène (DBO₅), composés phénoliques, matière grasse, orthophosphates, chlorures, nitrites, nitrates, calcium et magnésium, ions ammoniums et sulfates. Chaque résultat obtenu représente une moyenne de trois essais d'analyses.

a. Détermination du potentiel hydrogène (*pH*)

Le *pH* est généralement considéré comme une mesure de valeurs, indiquant l'acidité ou l'alcalinité des solutions aqueuses. Sa valeur est liée à la concentration en ions hydronium. Les solutions dont le *pH* est inférieur à 7 sont dites acides (concentration élevée en ions hydronium); Les solutions dont le *pH* est supérieur à 7 sont dites basiques (faible concentration en ions hydronium).

b. Détermination de l'acidité

L'indice d'acide est défini comme le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium nécessaire pour neutraliser les acides gras libres présents dans un gramme des margines. C'est une mesure relative du rancissement car les acides gras libres se forment

normalement pendant la décomposition des glycérides d'huile. La valeur est également exprimée en pourcentage de matières grasses acides libres, calculés en terme acide oléique.

c. Détermination de la conductivité électrique (CE)

C'est un indicateur de minéralisation de l'eau. Une eau riche en solutés à une conductivité élevée. La conductivité électrique des eaux apporte de précieux renseignements sur leur richesse en électrolytes dissous, sa mesure donne une indication rapide (Thompson *et al.*, 1999).

d. Détermination de la turbidité

Les deux propriétés optiques les plus importantes des eaux naturelles sont la couleur et la turbidité. Cette dernière est une notion plus subjective que la notion de couleur; elle est définie comme l'inverse de la limpidité ou de la transparence. Une eau turbide est plus ou moins trouble. Cette turbidité est liée à des particules en suspension dans l'eau qui diffusent la lumière. Leur origine peut être extrêmement variable tels que l'érosion des roches et l'entraînement des matières minérale ou organique. Plus les particules sont nombreuses, plus le degré de turbidité augmente. La forme, la taille et la composition des particules influent sur le degré de turbidité (Vuppala *et al.*, 2021).

e. Détermination de la salinité

Elle est définie comme la somme des matières minérales en solution contenues dans une eau, après conversion des carbonates en oxydes, après oxydation de toutes les matières organiques et après remplacement des iodures et bromures par une quantité équivalente de chlorure. La salinité est inférieure au résidu sec filtrable et elle est exprimée généralement en (Practical Salinity Unit «PSU»). Elle est liée à la conductivité de l'eau, à sa masse volumique et à la teneur équivalente en chlorures (Rodier *et al.*, 2009).

f. Détermination de la matière sèche (MS)

Elle est constituée par l'ensemble des substances organiques et inorganiques, en solution ou en suspension, contenues dans les margines. La MS est déterminée par évaporation d'un échantillon de 20 ml dans une capsule en porcelaine à 105 °C pendant 24 heures. Elle est exprimée en g/L par rapport au poids frais (Esmail *et al.*, 2014).

g. Détermination de la matière en suspension (MES)

Ce paramètre (exprimé en mg/L) correspondant à la matière insoluble particulaire, c'est-à-dire à la totalité des particules solides véhiculées par les eaux résiduaires représentant le poids, le volume et la nature des particules (Koller, 2009).

h. Détermination de la demande chimique en oxygène (DCO)

Elle représente la quantité totale de pollution oxydable et correspond à la quantité d'oxygène qu'il faut fournir grâce à des réactifs chimiques puissants, pour oxyder les matières contenues dans l'effluent. Il s'agit de l'un des paramètres spécifiques que l'on utilise pour déterminer la concentration des polluants principaux. C'est une mesure globale des matières organiques et de certains sels minéraux oxydables (pollution organique totale), à la différence de la DBO₅, qui ne prend en compte que les matières organiques biodégradables. Cette analyse rapide sert essentiellement à la surveillance des eaux usées et des rejets industriels. Pour l'analyse d'un prélèvement donné, sa valeur est toujours supérieure à celle de la DBO₅, car elle mesure une plus grande quantité d'oxygène (La DCO représente l'ensemble des matières oxydables et la DBO₅ représente la part des matières organiques biodégradables. La différence entre la DCO et la DBO₅ représente la charge en matières organiques peu ou pas biodégradable (Rodier et *al.*, 2009).

i. Détermination de la demande biologique en oxygène (DBO₅)

Elle représente la quantité de pollution biodégradable. Cette méthode d'analyse de la pollution correspond à la quantité d'oxygène nécessaire, pendant 5 jours, aux micro organismes pour oxyder une partie des matières carbonées contenus dans l'eau. Elle fournit une des indications importantes permettant de juger de la qualité d'une eau et de son degré de pollution organique. Par contre, c'est un test reconnu trop peu précis pour qualifier les eaux naturelles mais très utilisé pour surveiller l'efficacité des stations d'épuration (Koller, 2009).

La DBO₅ décrit également une demande en oxygène d'un effluent, mais il ne s'agit que des besoins des micro-organismes présents dans l'effluent, qui vont consommer l'oxygène pour leurs réactions métaboliques. Par définition, la DBO₅ est incluse dans la DCO (et son taux devrait nécessairement lui être inférieur). Elle est représentative de la capacité d'un milieu à s'auto-épurer. Ces deux paramètres (DCO et DBO₅) sont des indicateurs du taux de pollution d'un milieu (Rodier et *al.*, 2009).

Rapport DCO/DBO₅: Ce rapport évalue la biodégradabilité d'une eau usée, c'est à dire la faculté de transformation de la matière organique en matière minérale, admissible par le milieu naturel. Pour un effluent à dominante domestique, ce rapport est généralement compris entre 2 et 3. Pour les effluents d'industries agroalimentaires, il est inférieur, de l'ordre de 1,5 à 2, ce qui traduit une meilleure biodégradabilité. Enfin, lorsqu'il est supérieur à 3 cela traduit l'apport d'un effluent industriel plus ou moins difficilement biodégradable (Rodier *et al.*, 2009).

j. Dosage du carbone organique total

Le carbone organique total dans les solides peut être déterminé par titrage. Pour ce faire, une solution de bichromate de potassium est ajoutée à un échantillon en présence d'acide sulfurique. Après la réaction, le dosage de la quantité de bichromate qui n'a pas réagi avec l'échantillon permet d'établir la concentration du carbone organique total.

k. Détermination des polyphénols totaux

Les composés phénoliques contenus dans les margines sont extraits selon la méthode décrite par De Marco (Amaral *et al.*, 2008). Les margines doivent subir un prétraitement par l'hexane pour éliminer les lipides. Il s'agit d'une extraction liquide-liquide à l'acétate d'éthyle, celui-ci est souvent utilisé pour ce type d'extraction. En effet, (Tundis *et al.*, 2020) et (Nawal Mekersi *et al.*, 2021) ont démontré que l'acétate d'éthyle est plus efficace que les autres solvants d'extraction avec un taux d'extraction élevé.

l. Détermination de la matière grasse

Huiles, graisses, hydrocarbures : ces composés ont essentiellement pour conséquence une diminution des transferts d'oxygène atmosphérique avec une incidence notable sur la qualité biologique de l'eau superficielle définie en réalité par la quantité d'oxygène qu'elle contient (Khatib *et al.*, 2009).

A 100 ml de margines, 75 ml de chloroforme et 100 ml de méthanol sont ajoutés. Après agitation suivie d'une décantation, le mélange est divisé en deux phases. La phase supérieure constituée de margines et de méthanol est éliminée, alors que la phase inférieure contenant le chloroforme et les lipides soluble est évaporée dans un rotavapeur. Le chloroforme s'évapore et les lipides sont récupérés. Le volume de lipides obtenu est évalué en pourcentage par rapport au volume des margines utilisé (V/V) (Rodier *et al.*, 2009).

m. Détermination des orthophosphates (PO_4^{3-})

Les orthophosphates sont dosés selon la méthode de Murphy et Riley (Hanafi *et al.*, 2009). La détermination de leur concentration est basée sur la formation d'un complexe antimoine-phosphate-molybdate. Ce complexe est réduit par l'acide ascorbique en composé fortement coloré en bleu. La densité optique est lue à une longueur d'onde de 882 nm. Une courbe d'étalonnage est réalisée à partir d'une solution de phosphate de potassium monobasique (KH_2PO_4) à des concentrations comprises entre 5 et 10 mg/L de PO_4^{3-} (El Yamani *et al.*, 2020).

n. Détermination de l'azote totale (NT)

Afin de déterminer la teneur en azote total des échantillons, nous avons opté pour la méthode " Kjeldahl" du nom de son auteur qui date de 1883. Elle est basé sur une minéralisation de l'azote organique en ammonium par l'acide sulfurique concentré (H_2SO_4). L'addition d'un catalyseur métallique, le sulfate de cuivre, accélère la réaction.

L'ammonium est ensuite dosé par distillation en milieu alcalin suivi d'une titration acide-base. Cette méthode donne la somme de l'azote organique et ammoniacal, elle ne prend pas en compte les formes nitriques (Lenore *et al.*, 2000).

q. Détermination des ions ammoniums (NH_4^+)

L'ammonium (NH_4^+) est la forme d'azote la plus toxique. Sa présence dans l'eau est liée soit aux rejets urbains et industriels dans les oueds qui donnent des concentrations élevées soit par réduction des formes azotées (nitrates et nitrites) (Rodier *et al.*, 2009).

Les ions ammoniums sont dosés par la méthode d'indophénol. En milieu alcalin et en présence de nitroprussiate de sodium comme catalyseur, ils réagissent avec le phénol et l'hypochlorite de sodium, et forment le bleu d'indophénol susceptible d'un dosage colorimétrique. La lecture de la densité optique au spectrophotomètre se fait à une longueur d'onde de 630 nm. La concentration des ions ammoniums est déduite à partir d'une gamme étalon d'une solution de Chlorure d'ammonium (NH_4Cl) à des concentrations comprises entre 1 et 10 mg/L d'ammonium (NH_4^+) (Rodier *et al.*, 2009).

r. Détermination des chlorures (Cl^-)

Les chlorures sont dosés par la méthode de Mohr, en milieu neutre par une solution titrée de nitrate d'argent (AgNO_3) et en présence de chromate de potassium (K_2CrO_4). La fin

de la réaction est indiquée par l'apparition de la teinte rouge caractéristique du chromate d'argent (Ouabou *et al.*, 2014).

s. Détermination des nitrites (NO_2^-)

C'est une forme intermédiaire qui résulte de l'oxydation des matières organiques azotées. Ils ne se maintiennent que dans les milieux peu oxygénés, car ils sont instables et ayant une tendance à s'oxyder en nitrates (Yahia *et al.*, 2019).

t. Détermination des nitrates (NO_3^-)

Les sels minéraux de l'acide nitrique et les nitrates sont des éléments minéraux nutritifs tant pour les organismes autotrophes terrestres qu'aquatiques. Leur teneur est variable suivant la saison et l'origine des eaux. Ils sont dangereux si la concentration atteint 90 ppm (partie par million) (Aguilar, 2010; Yahia *et al.*, 2019).

u. Détermination du calcium (Ca^{2+}) et du magnésium (Mg^{2+})

Le calcium et le magnésium présents dans les margines sont complexés par l'éthylène diamine tétra-acétate disodique (EDTA) en milieu tamponné. Le noir erichrome T (NET), qui donne une couleur rouge foncée ou violette en présence des ions Mg^{2+} et Ca^{2+} , est utilisé comme indicateur coloré pour la détermination de la dureté totale. Les ions Ca^{2+} sont dosés par l'EDTA en milieu alcalin ($\text{pH}=12$) et en présence d'indicateur coloré. Les ions Mg^{2+} sont précipités puis déterminés par différence entre la dureté totale et le calcium. Les deux sont exprimés en g/L (Rodier *et al.*, 2009).

v. Détermination des sulfates

Les sulfates sont précipités en milieu chlorhydrique à l'état de sulfate de fer. Le précipité ainsi obtenu est stabilisé à l'aide d'une solution de Tween 20. Les suspensions homogènes sont mesurées au spectrophotomètre (Rodier *et al.*, 2009).

II.2.3.3 Analyse microbiologique des margines

L'analyse microbiologique des échantillons a été réalisée dès réception afin d'éviter toute modification éventuelle de la concentration microbienne initiale. Ces analyses ont porté sur le dénombrement de la flore mésophile aérobie totale (FMAT); les coliformes totaux et fécaux (CT et CF) ; les streptocoques fécaux ; les staphylocoques ; les levures et moisissures et les bactéries lactiques.

Tableau II.1: Milieux de culture et réactifs chimiques utilisés en vue de l'analyse microbiologique des margines.

Milieux de culture	Réactifs chimiques
M17 (gélose et bouillon)	Alcool
MRS (gélose et bouillon)	Eau oxygénée (H ₂ O ₂)
OGA (gélose et bouillon)	Fuchsine
MES (gélose et bouillon)	Bleu de méthylène
Sabouraud Mayeux	Lugol
PCA	NaOH
VRBL	Violet de gentiane
Rothe doublement concentré	Acide chlorhydrique pur (HCl)
EMB	Acide sulfurique
Milieu Chapman	Chlorure de sodium (NaCl)
Milieu Litsky	Bromocrésol pourpre (BCP)
Milieu Sabouraud chloramphénicol Agar	
YPG	

Les analyses microbiologiques des margines ont été effectuées en utilisant les milieux de culture et les réactifs chimiques cités dans le Tableau II.1. Après homogénéisation des échantillons des margines, une série de dilutions en cascade dans de l'eau physiologique (NaCl à 0,9%) stérile sera réalisée depuis la dilution 10⁻¹ jusqu'à la dilution 10⁻⁶. Les dilutions seront obtenues dans des tubes à essais à partir de 1 ml de solution et 9 ml d'eau physiologique stérile. 1 ml de chaque dilution est déposé dans trois boîtes de Pétri contenant 20 ml de milieu gélosé (autoclavé à 121 °C pendant 15 min, sous un 1 bar de pression, et refroidi à 45 °C). Les boîtes sont ensuite homogénéisées par agitation manuelle et incubées en étuve à 37 °C. Seules les boîtes dont le nombre de colonies est compris entre 30 et 300 sont retenues pour le dénombrement. Les essais sont répétés trois fois.

a. Dénombrement de la flore mésophile aérobie totale (FMAT)

La flore Mésophile Aérobie Totale (FMAT) renseignant sur la charge bactérienne globale, a été estimée sur milieu PCA (Plate Count Agar) incubé à 37 °C pendant 48 heures et exprimée en unités formant colonies (UFC) (El Hassani *et al.*, 2009).

b. Dénombrement des coliformes fécaux et totaux

Les coliformes fécaux et totaux du tube digestif de l'homme et des animaux sont des indicateurs de qualité hygiénique (contamination fécale). Le dénombrement a été effectué sur milieu EMB (éosine méthylène bleu, Labbox). Après 48 heures d'incubation à 37 °C pour les coliformes totaux et 44,5 °C pour les coliformes fécaux (El Yamani *et al.*, 2020).

c. Dénombrement des staphylocoques

Les staphylocoques sont classés dans le groupe des pathogènes. Leur dénombrement est obligatoire pour s'assurer de l'innocuité des échantillons des margines. Les staphylocoques ont été dénombrés sur le milieu Chapman (condalab). Les boîtes ont été incubées à 37 °C pendant 48 heures (El Yamani *et al.*, 2020).

d. Dénombrement des streptocoques fécaux

Les streptocoques fécaux sont également des témoins d'une contamination d'origine fécale, leur dénombrement a été effectué sur milieu Litsky. Les boîtes ont été incubées à 37 °C pendant 48 heures (Esmail *et al.*, 2014).

e. Dénombrement des levures et moisissures

L'évaluation de l'abondance des levures et moisissures se fait sur milieu Sabouraud chloramphénicol Agar (led techno), après incubation (48 heures à 30 °C) pour les levures et 5 à 7 jours pour les moisissures. Le milieu de culture utilisé est l'YPG (Jeulin), auquel est ajouté le chloramphénicol (25 µg/ml) et l'ampicilline (50 µg/ml) comme antibiotiques afin d'inhiber toute croissance bactérienne.

f. Dénombrement des bactéries lactiques

Le milieu le plus connu pour le comptage des bactéries lactiques est le MRS (Man Rogosa Sharpe, Difco, Detroit, États-Unis). Les colonies sont dénombrées après 24 heures d'incubation à 30 °C. 1 ml de l'échantillon est pipeté aseptiquement dans 9 ml d'eau physiologie et des dilutions décimales ont été réalisées (10^{-1} à 10^{-6}).

L'isolement sélectif des bactéries lactiques a été effectué sur milieu MRS à pH 5,4 et MRS additionné au CaCO₃ a raison de 5 g/L pour l'isolement des Lactobacilles, sur M17, pour l'isolement des coques lactiques et sur MES additionné de la vancomycine (30 µg/ml) Pour l'isolement des leuconostocs.

L'ensemencement se fait en profondeur, on utilise trois séries de boîtes pour chaque dilution. La méthode consiste à verser un volume de 1 ml de la dilution 10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-6} , dans chaque boîte, à couler le milieu en surfusion et à homogénéiser en effectuant des mouvements en 8. Après solidification des milieux, 3 boîtes de Pétri de chaque série sont incubées à 30 °C pendant 48 heures et pour les leuconostocs est incubé à 45 °C. La cycloheximide à raison de 45 mg/L a été ajoutée aux milieux MRS et M17 pour éliminer les levures.

La purification consiste à effectuer des repiquages successifs sur bouillon suivi de l'ensemencement sur milieu gélosé par la méthode des stries jusqu'à l'obtention des colonies bien distinctes.

II.3 Résultats et discussion

Les résultats globaux des mesures montrent que les margines est un rejet très pollué sous forme de liquide résiduel. Sa composition dépend du type d'olives, du degré de leur maturation (en fonction de la période de récolte), du système de culture, des pratiques de salage pour la conservation des olives, des conditions climatiques et du procédé utilisé pour l'extraction de l'huile d'olive (Sounni *et al.*, 2018).

II.3.1 Caractérisations organoleptique des margines

La caractérisation organoleptique a montré que les échantillons des margines étaient généralement un effluent brun foncé à noir intense avec un aspect trouble, une texture lisse et un goût frais d'huile d'olive (Figure II. 3). Son odeur est rance gênante.



Figure II.2: Margines brutes.

II.3.2 Caractérisations physicochimique

La caractérisation physicochimique des margines non traités est mentionnée sur le Tableau II.2.

Tableau II.2 : Caractéristiques physicochimiques des margines (Ayadi *et al.*, 2022).

Caractéristiques	Valeurs	Données bibliographiques
pH	4,88±0,01	4,42-5,43
Acidité (%)	0,65±0,001	0,20-1,76
Conductivité électrique (mS/cm)	34,00±0,01	1,8-34
Turbidité (NTU)	138,90±0,01	436-8727
Salinité (mg/L)	1,50±0,0001	5,43-26700
Matière sèche (g/L)	22,60±0,001	26,67-240
Matière en suspension (g/L)	0,39±0,001	0,51-76,77
DCO (g/L)	183,00±0,00	7,41-374
DBO ₅ (g/L)	7,00±0,00	1,25-67
DCO/DBO ₅	26,00±0,00	
Carbone organique total (g/L)	2,314±0,001	
Contenu phénolique total (g/L)	1,72±0,0001	0,73-24
Huiles et graisse résiduelles (mg/L)	0,16±0,0002	0,46-2,50
Orthophosphates (mg/L)	1,31±0,0002	30-4120
Azote total (g/L)	3,710±0,001	
Chlorures (g/L)	3,90±0,0001	0,16-25,48
Nitrites (mg/L)	2,08±0,0001	7,60-43,15
Nitrates (mg/L)	1,95±0,0002	43,67-1056,80
Calcium (mg/L)	7,04±0,0001	166-1907,8
Magnésium (mg/L)	19,82±0,003	410-1462,5
Ammonium (mg/L)	1,55±0,0001	64,29-118
Sulfate (mg/L)	1,49±0,0001	171-1153

Le pH mesuré de 4,88 dans cette étude se situe dans la limite de la plage de 4,42 à 5,43 rapportée dans la littérature (Amaral *et al.*, 2008; Bouharat *et al.*, 2018). L'augmentation de l'acidité des margines est due à plusieurs facteurs comme la durée du séjour dans les bassins

de stockage (El Yamani *et al.*, 2017). Cela peut s'expliquer par des réactions d'auto-oxydation et de polymérisation qui transforment les alcools phénoliques en acides phénoliques.

Ces réactions se manifestent par un changement de la coloration initiale des margines en noir foncé (Minussi *et al.*, 2007; Ebich *et al.*, 2016). En effet, les margines de cette étude se caractérisent par une coloration très sombre.

La conductivité électrique est étroitement liée à la concentration des substances ioniques dissoutes (solides dissous totaux) et à leur nature. Le résultat obtenu dans cette étude (34 mS/cm) est comparable à ceux retrouvés dans la littérature (Tableau II.2). En effet, les valeurs de conductivité varient de 1,8 à 34 mS/cm dans les margines (Thompson *et al.*, 1999; Moussaoui *et al.*, 2010; El Yamani *et al.*, 2017; Romo-Buchelly *et al.*, 2019). La salinité étant liée à la conductivité électrique, cette valeur donne une idée générale de la forte teneur en sel présente dans ces effluents du fait des pratiques de salage pour la conservation des olives avant broyage et aussi de la présence naturelle de minéraux dans les olives (Di Gioia *et al.*, 2002).

Les margines étudiées sont peu chargées de matières en suspension (MES). Les valeurs enregistrées de turbidité et de matières sèches (MS) sont de 138,9 NTU et 0,385 g/L, respectivement (Tableau II.2). Ils sont proches de ceux obtenus par Minussi *et al.* (Minussi *et al.*, 2007). Les faibles valeurs de turbidité et de MS s'expliquent par l'origine de l'échantillonnage des margines. En effet, ces derniers sont prélevés dans des cuves de stockage d'une durée moyenne de quelques jours et la matière en suspension diminue sous l'effet de la décantation.

Les margines sont très riches en matière organique exprimée en termes de demandes chimiques et biologiques en oxygène. Les valeurs de la DCO et de la DBO₅ sont respectivement de 183 et 7 g/L. Ces valeurs sont comparables à celles rapportées par El Yamani *et al.* (El Yamani *et al.*, 2020). Cependant, le très faible rapport DCO/DBO₅ indique une mauvaise biodégradabilité de ces margines. Lorsqu'elles sont rejetées sans traitement approprié, les margines provoquent une pollution organique de l'eau et du sol et l'asphyxie des micro-organismes. La plupart des auteurs attribuent cette toxicité élevée à la présence de composés phénoliques (El Yamani *et al.*, 2020; Pourkhanali *et al.*, 2020).

La teneur en composés phénoliques dans les margines est comprise entre 3 g/L et peut atteindre jusqu'à 9 g/L (Ouabou *et al.*, 2014). Dans cette étude les margines représentent une valeur inférieure à celles rapportées par la majorité des auteurs dont la valeur escomptée est aux alentours de 1,72 g/L. Ceci est dû à la nature des margines car les composés phénoliques

ont subi des dégradations au cours de leur stockage et par conséquent une diminution de leur teneur. Outre la variété, la maturation des fruits et les conditions climatiques dont dépend la composition phénolique des margines, celle-ci dépend également des procédés technologiques utilisés pour séparer la phase aqueuse (margines) de la phase huileuse de référence (Bouknana *et al.*, 2014).

Le Tableau II.2 montre que la valeur moyenne des ions de chlorure est de 3,9 g/L. La forte teneur en chlorure est due à la pratique de salage (ajout de sel en grande quantité) pour conserver les olives avant le processus d'extraction. Ceci est similaire à la valeur mesurée par Esmail ainsi que Mebirouk (Mebirouk *et al.*, 2007; Esmail *et al.*, 2014).

La teneur en graisse résiduelle dans les margines est de 0,16 g/L (Tableau II.2). Cette teneur dépend du système d'extraction d'huile d'olive. Le processus de centrifugation atteint des taux faibles par rapport au processus traditionnel. Les teneurs en matières grasses obtenues dans ce travail ont un aspect visqueux lié à la présence de la fraction huileuse comparable à celle mesurée par Esmail *et al.* (Esmail *et al.*, 2014). Cette matière grasse forme une couche lipidique à la surface des margines au niveau des bassins, ce qui pourrait limiter l'évaporation naturelle.

Les résultats de ce travail indiquent que les échantillons des margines sont riches en sel minéraux, La présence de sels minéraux et de matières organiques dans les margines favorise la prolifération des micro-organismes qui peuvent être utilisés pour produire des biomolécules par fermentation (Ayadi *et al.*, 2022).

Selon Haddad *et al.*, les margines se caractérisent généralement par (Haddad *et al.*, 2017) :

- Couleur brune à brune rougeâtre, d'aspect trouble ;
- Forte acidité ;
- Forte charge saline ;
- Concentration en matières sèches relativement importante ;
- Fortes teneurs en eau et de matières organiques (une fraction insoluble (sous forme de colloïdes ou bien en suspension) et une fraction soluble dans la phase aqueuse formée de sucres, de lipides, d'acides organiques et de composés phénoliques) ;
- DCO généralement très élevée ;
- DBO₅ relativement faible par rapport à celle de la DCO ;

Les substances phénoliques sont partiellement toxiques et inhibent le développement des microorganismes aussi bien en présence ou en absence d'oxygène (Mekki *et al.*, 2013).

D'autre part, la présence de matières organiques tels que les sucres ainsi que les sels minéraux peuvent favoriser la croissance de ces microorganismes.

II.3.3 Caractérisation chimique

La caractérisation chimique des margines brutes séchées d'après la technique d'analyse FRX est mentionnée sur le Tableau II.3.

Tableau II.3: Composition chimique issue de la fluorescence des rayons X (FRX).

Composants	Resultats (masse %)	Sensibilités
Na ₂ O	4,2	0,13
MgO	6,8	0,09
Al ₂ O ₃	1,3	0,06
SiO ₂	6,2	0,04
P ₂ O ₅	13,3	0,03
SO ₃	2,9	0,02
Cl	2,7	0,04
K ₂ O	38,3	0,04
CaO	8,8	0,03
Fe ₂ O ₃	0,2	0,02
Perte au feu	14,9	

Le spectre FTIR est montré sur la Figure II.3 alors que l'attribution des différents pics de vibration est présentée sur le Tableau II.4.

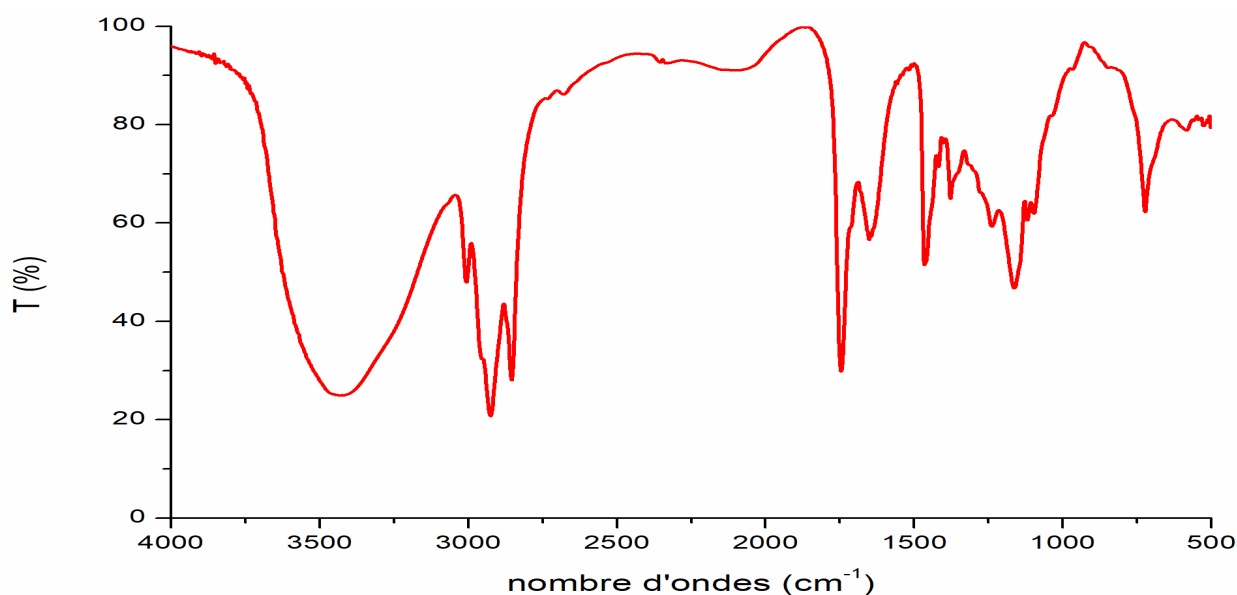


Figure II.3: Spectre FTIR des margines brutes

Tableau II.4: bandes de vibration des groupements fonctionnels en FTIR des margines brute.

Nombre d'ondes (cm ⁻¹)	Attribution	Groupements fonctionnel	Littérature (cm ⁻¹)
3429	OH	Eau, alcools, phénols	3610-3670 3200-3400
3006	C=CH ₂ , C=CH	Vinyle	3080 3020
2925	C-H	Alkyle, méthylène	2925
2854	C-H	Alkyle, méthylène	2850
1745	C=O	Acides carboxyliques dérivés, esters et lactones, anhydrides	1735 1760
1651	C-C	C-C acyclique, alcènes monosub-alcènes 1,1-disub.	1645 1655
1465	C-H	Alkyle, méthylène	1470
1163	C-O	Esters	1100-1300
722	C-X	Chloroalcanes	540-760

Le FTIR nous a permis de caractériser qualitativement la matière organique présente dans les margines. D'après le spectre, une large bande apparaît à 3429 cm⁻¹ attribuée certainement à la vibration d'élongation de la liaison OH, issue des molécules d'eau le principal constituant des margines. Aussi, la liaison OH pourrait être issue d'autres molécules telles que les phénols et les acides carboxyliques. Le pic à 2 854–2 925 cm⁻¹ étant observées dans les margines correspond aux fractions aliphatiques définies comme des lipides à longue chaîne. Le sommet environ 1 745 cm⁻¹ pourraient être attribués au carboxyle des groupes d'acides gras. L'apparition de pics à 1 465–1 651 cm⁻¹ soutient la présence de structures aromatiques à double liaison. Le pic qui apparaît à 1163 cm⁻¹ correspond à la liaison C-O au groupement esters. Le dernier pic à 722 cm⁻¹ est attribué à la vibration de déformation de la liaison =C-H des noyaux aromatiques polyphénoliques.

Ces résultats rejoignent les travaux de Barje *et al.* (Barje *et al.*, 2012) dont les bandes d'absorbance des spectres IR des margines issues des huileries de la zone Marrakech ont été attribuées à la présence des groupes phénol, alcool et carboxyle à 3400 cm⁻¹, groupes d'acides gras, cires et divers aliphatiques à 2840 cm⁻¹, et groupes d'acides gras et alcanes de 1716 à 1740 cm⁻¹. Par contre les groupes aliphatiques C–H absorbent à 1450–1460 cm⁻¹ et les

groupes C–H, la déformation des fonctions d’OH, carboxyles et C–O de l’éther des cycles aromatiques absorbent à 900–1300 cm^{-1} .

II.3.4 Caractérisation microbiologique

La présente caractérisation s’est consacrée au dénombrement de la charge microbienne des margines pour établir le lien entre la présence et l’absence des microorganismes et l’effet de leurs composés phénoliques. Bien que les margines ne soient pas adéquat à l’évolution des micro-organismes, certaines bactéries, levures et champignons sont résistants aux conditions acides.

La numération totale de la flore mésophile aérobie est d’environ $0,55 \times 10^4$ UFC/ml. La valeur obtenue est légèrement inférieure à celles rapportées dans la littérature (Mebirouk *et al.*, 2006; Boran *et al.*, 2011). Elle dépend du procédé d’extraction, des conditions opératoires retenues, de la région, des conditions de stockage des margines et aussi des caractéristiques physico-chimiques (pH, composés phénoliques, sels minéraux, acides gras...).

La caractérisation des margines est indiqué sur le Tableau II.5. Les valeurs standard de comptage sur plaque pour certains échantillons sont liées aux conditions environnementales de cet effluent liquide.

Tableau II.5: Dénombrements microbiens des échantillons.

Microbiote	Dénombrement	Données bibliographiques
	en 10^4 UFC/ml	en 10^4 UFC/ml
Flore mésophile aérobie totale	0,55	0,85-4100
		21-25
Coliformes totaux	-	-
Coliformes fécaux	-	-
Streptocoques fécaux	-	-
Levures et moisissures	1,4	0,74-325
		$8,1 \times 10^3$
		16,85-18,09
Champignons	10,8	0,72
Bactéries lactiques	4,2	4-4,70
		0,11-20,4

Les levures, les moisissures et les champignons sont capables de se développer plus que les bactéries dans les margines (Mouncif *et al.*, 1993; Esmail *et al.*, 2014). Le pouvoir de tolérance des deux groupes est un trait génétique. Il pourrait être utilisé pour des activités de traitement réussies (Guiraud, 2012) qui sont souvent mal menées ou non réalisées.

Des bactéries lactiques sont également présentes dans les margines étudiées. La valeur trouvée est de $4,2 \cdot 10^3$ UFC/ml. Leur présence témoigne de leur résistance au milieu agressif des margines (Guiraud, 2012). Cependant, sa résistance diminue et donc leur disparition devient normale avec le temps.

Aucune bactérie fécale n'a été détectée dans cette étude. Les coliformes totaux et fécaux, streptocoques fécaux ont montré l'absence de ces germes (El Yamani *et al.*, 2020).

L'absence de ces agents pathogènes humains est attribuée à leur sensibilité au pH acide et à l'activité antimicrobienne des composés phénoliques. L'absence de ces bactéries a été rapportée dans l'étude d'Esmail *et al.* (Esmail *et al.*, 2014). On peut affirmer que les margines étudiées ne présentent pas de problème sanitaire ou hygiénique.

II.4 Conclusion

Les margines sont définies comme le résidu liquide issu de la production de l'huile d'olive. La présence de ce sous-produit dans le milieu naturel ou dans l'environnement cause des problématiques environnementales et des risques sérieux. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à la caractérisation physico-chimique et microbiologique des margines collectées de l'huilerie d'ENNAKHLA (Chlef, Algérie).

L'analyse physicochimique montre que ces margines sont légèrement acides et ont une charge organique et minérale suffisantes pour l'activité microbienne. Ce qui nous laisse prédire que leur déversement directement dans la nature causera un vrai problème pour la région. La caractérisation microbiologique de ces résidus indique leur contenu intéressant en substances antimicrobiennes avec une absence de la flore fécale. Cependant, la détermination de la flore microbienne a montré la présence de levures et de bactéries lactiques qui pourraient avoir une importance pratique.

Chapitre III. Production de
biomolécules par
immobilisation cellulaire

Chapitre III. Production de biomolécules par immobilisation cellulaire

III.1 Introduction

Les agents de biodégradation représentés par les microorganismes connus par leurs propriétés métaboliques et cinétiques peuvent être utilisées pour les actions de l'hydrolyse, l'oxydation, la nitrification, la dénitrification, l'élimination des sulfates et des phosphates ainsi que la méthanisation des effluents polluants. Aussi, les microorganismes sont de principaux agents de production et on leur doit la production de nombreuses molécules organiques obtenues par fermentation et utilisées pour leurs propriétés fonctionnelles dans des domaines extrêmement variés.

L'exploitation industrielle des microorganismes constitue l'industrie des fermentations. Les produits de fermentation comprennent en plus de la biomasse microbienne et des spores, les métabolites primaires et secondaires et les enzymes. Parmi les métabolites, il a été cité les acides organiques, acides aminés, polysaccharides, vitamines et pigments alimentaires, alcools, lipides, bactériocines, antibiotiques, molécules à autres activités pharmacologiques tels que anti-tumorale, immuno-suppresseur, immuno-stimulant, anti-cholestérolémique, anti-hypertenseur, insecticides biologiques, les arômes, hormones (Boukhalfa-Lezzar, 2020).

Il est possible d'effectuer les fermentations en batch (discontinu), fed-batch (semi-continu) ou en continu. Le mode batch est le plus simple à utiliser. Le temps de séjour peut être adapté à la fermentation, et les contaminations bactériennes éventuelles sont plus faciles à gérer que lors d'une fermentation continue. Cependant, l'efficacité d'un procédé discontinu n'est pas optimale, étant donné les pertes de temps entre deux fermentations (Abedi *et al.*, 2020).

Le présent chapitre vise à isoler des souches et les utiliser dans un procédé et à un dispositif pour la production de biomolécules. Particulièrement, ce procédé et ce dispositif permettent la production de bioéthanol et d'acide lactique en fixant des microorganismes dans deux supports solides à savoir la pouzzolane et l'os bovin dans un bioréacteur en mode continu.

Le mode d'immobilisation des souches sur un support solide tel que la pouzzolane et l'os bovin n'a pas fait l'objet de travaux en vue de produire ces métabolites, de ce fait, il nous est apparu intéressant d'envisager une étude sur la production en continu de l'acide lactique et de l'éthanol par de souches isolées à partir des margines immobilisées sur pouzzolane et l'os bovin en bioréacteur à lit fixe. Les milieux de culture utilisés dans ces recherches sont les

margines d'olives supplémentées ou non au lactosérum d'une part, MRS, M17, Sabouraud et PDA d'autre part en tant que des milieux de référence.

L'avantage de ce procédé est que les effets inhibiteurs de l'éthanol, des sucres fermentescibles et des furanes sont amoindris. Le mode continu est le procédé le plus utilisé pour la fabrication d'éthanol, il consiste généralement en une cascade de fermenteurs. (Nanis *et al.*, 2020). Il est envisageable d'utiliser des procédés permettant de recycler les levures ou de les conserver dans les fermenteurs en les immobilisant (Sierra *et al.*, 2007).

Plusieurs études ont été consacrées à la recherche de nouvelles souches lactiques plus performantes pour produire l'acide lactique. Ces métabolites sont traditionnellement produits par fermentation discontinue appelée également fermentation «batch». L'accumulation de produits toxiques est un facteur important limitant la production de levains lactiques par cette technologie (Senedese *et al.*, 2015).

Les cultures en continu permettent d'éviter ce problème. D'autre part, en culture mixte, les interactions entre les souches peuvent conduire à l'élimination des risques importants de contamination d'une ou plusieurs souches dans le bioréacteur par l'emploi de taux de dilution adéquats (Gómez-Caravaca *et al.*, 2014).

III.2 Matériels

Notre travail a été réalisé au niveau du laboratoire de bioressources naturelles, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Hassiba Benbouali de Chlef (Algérie), à partir de l'année de 2017/2018.

III.2.1 Matériels utilisés (Réactifs, produits chimiques et matériels de laboratoire)

L'appareillage, les réactifs chimiques et les milieux de culture utilisés dans ce chapitre sont résumés dans le Tableau III.1.

Tableau III.1: Produits, appareillage et petit matériel.

	Désignation
Appareillage et petit matériel	<ul style="list-style-type: none"> - pH mètre (HANNA) - Spectrophotomètre UV visible (WPA BIOWAVE II) - Réfrigérateur réglé à 4 °C (ELECTROSTAR) - Congélateur réglé à -20 °C (ELECTROSTAR) - Loupe binoculaire optique (ZEISS) - Polarimètre (SHIADRU) - Balance analytique de paillasse (RAYNA) - Etuve réglée à 30 °C (MEMMERT) - Bain marie réglable (DIGITAL WATER BATH) - Autoclave (RAYPA) - Microscope optique (LEICA) - Agitateur (IKACMAG) - Agitateur Vortex électrique (VELP) - Agitateur / Incubateur Shaker (DSW CUBE WIS-010) - Multi agitateur (VELP)
Produits chimiques	<ul style="list-style-type: none"> - NaOH anhydre (SCHARLAU) - H₂SO₄ 10% (SCHARLAU) - NaCl 99.8% (CHEM-LAB) - HCl 35% (SCHARLAU) - Ethanol absolu 96° - Lugol et Fuchsine - Violet de Gentiane
Milieux de culture	<ul style="list-style-type: none"> - Isolement des levures : OGA /Sabouraud (gélose et bouillon) - Isolement des bactéries lactiques : MRS et M17 (gélose et bouillon) - Conservation : - Courte durée : Sur tube incliné à 4 °C. - Longue durée : 70% de milieux de culture et 30% de glycérol - Margines d'olives traitées et diluées - Lactosérum traité - Margines supplémentées au lactosérum
Autres	<ul style="list-style-type: none"> - Eau physiologique : préparée selon Larpent-Paul (Jean-Paul, 1997) par dissolution de 9 gr de NaCl dans un litre d'eau distillée suivi d'un autoclavage à 120 °C pendant 20 min.

III.2.2 Souches utilisées

III.2.2.1 Levures

Pour la fermentation alcoolique, les levures utilisées pour la production de l'éthanol sont des souches isolées à partir des margines conservées pendant 15 jours à 30 °C. Pour pouvoir effectuer les essais de fermentation, des souches levuriennes de *Saccharomyces cerevisiae* sont isolées, purifiées puis conservées. Une levure commercialisée à savoir *Saccharomyces cerevisiae* a été utilisée en tant que souche de référence (ATCC 20786).

III.2.2.2 *Lactobacilles* sp.

Pour la fermentation lactique, les lactobacilles utilisées pour la production de l'acide lactique sont des souches isolées à partir des margines. Pour pouvoir effectuer les essais de fermentation, des souches de lactobacilles sont isolées, purifiées et identifiées puis conservées.

III.2.3 Supports

III.2.3.1 Pouzzolane

La pouzzolane est le support utilisé pour l'immobilisation (Figure III.1). En effet, ce support est une roche correspondant à des projections volcanique, scoriacées, essentiellement stromboliennes et basiques, de composition basaltique, de couleur noire ou rouge selon le degré d'oxydation du fer présent (magnétite ou d'hématite). Cette roche siliceuse éruptive dans la partie cristalline représente selon le gisement d'où elle est extraite entre 80 et 100% du volume de solide. Disponible en Algérie, elle présente des caractéristiques intéressantes pour la fixation des cellules par adsorption (Menoret, 2001).



Figure III.1: Pouzzolane vue sous une loupe binoculaire.

Ce matériau est originaire d'EL KALKOUL (BOUHAMIDI, Ain Témouchent) qui se situe à 25 Km de Béni-Saf, à l'Ouest de l'Algérie.

III.2.3.2 Os bovin

La nature du support organique utilisé est l'os bovin, déchet d'une boucherie de Chlef centre (Figure III.2), ce dernier existe sous deux formes majeures:

- Os cortical, partie la plus externe de l'os. Il est très dur et constitue la paroi (os compact). La porosité est de 5 à 30% (Kraiem *et al.*, 2014).
- Os spongieux, partie interne de l'os. Il est constitué de petites travées, et nommé os poreux ou os trabéculaire. La porosité est de 30 à 90%. Les vertèbres sont riches en os spongieux (Kraiem *et al.*, 2014).



Figure III.2: Os bovin après traitement.

III.3 Méthodes

III.3.1 Echantillonnage

III.3.1.1 Margines

Afin de produire des biomolécules tels que le bioéthanol et l'acide lactique, les margines issues d'ENNAKHLA sont utilisées comme matière première pour l'isolement des souches responsables de la fermentation alcoolique (*Saccharomyces cerevisiae*) et lactiques (*Lactobacillus* sp.).

Ces margines ont été prélevées au mois de décembre à partir du bassin de stockage des margines. Elles sont homogénéisées et conditionnées dans des flacons stériles de 2 L fermés hermétiquement sans laisser des bulles d'air. Elles sont transportées au laboratoire et conservées à 4 °C pendant un mois pour une utilisation ultérieure. En effet, les margines sont utilisées comme matière première pour la préparation du milieu d'isolement de levures (*Saccharomyces cerevisiae*) et bactéries lactiques (*Lactobacillus* sp.) et de fermentation pour la production des biomolécules (bioéthanol et l'acide lactique).

III.3.1.2 Lactosérum

Le lactosérum liquide utilisé, provient de la laiterie de Sidi Saada (Relizane, Algérie). Il a été recueilli proprement dans des récipients en plastiques de 5 litres préalablement stérilisés. C'est un sous-produit de la fabrication des fromages à pâte pressé, et peut être utilisé pour d'autres préparations telles que des compléments alimentaires ou des boissons lactées entre autres. Les margines supplémentées au lactosérum sont utilisées pour l'enrichissement du milieu de la fermentation lactiques.

III.3.1.3 Supplémentation des margines par le lactosérum

En ce qui concerne l'ajout de lactosérum aux margines au tant que milieux de cultures pour les bactéries lactiques, des combinaisons de mélanges margines-lactosérum ont été effectuées en fonction de la croissance bactérienne à savoir 50-50%, 75-25%, 100-0% et 0-100%.

III.3.2 Préparation du milieu de fermentation

Avant de procéder aux étapes de la préparation du milieu de culture, nous avons laissé reposer les margines d'olives qui sont un mélange de deux liquides qui ne sont pas miscibles à savoir l'huile d'olives et les eaux dans une ampoule à décanter. Après 3 heures de repos, l'huile restante de la trituration qui est un liquide le plus dense s'est placé en dessous des eaux qui représentent un liquide le moins dense, et qu'apparaisse une surface de séparation horizontale entre les deux liquides (Figure III.3). Cette huile peut inhiber la croissance microbienne.

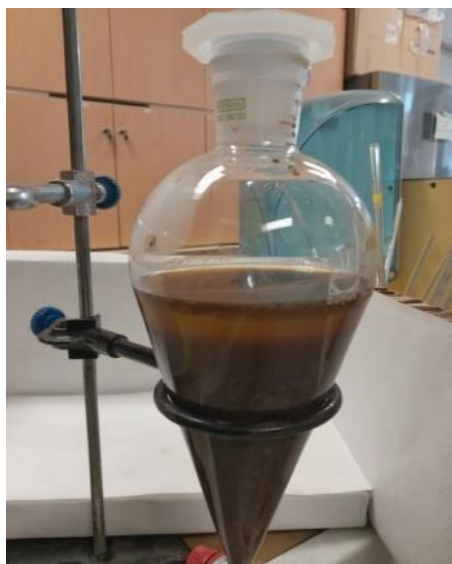


Figure III.3: Margines d'olive après 3 heures de repos.

III.3.2.1 Filtration

La filtration est une technique qui permet de séparer les constituants d'un mélange, lorsqu'un des constituants est sous la phase liquide et l'autre sous la phase solide. Pour ce faire, un filtre de porosité 10 μm est utilisé. Le filtrat a subi des dilutions.

III.3.2.2 Centrifugation

Pour éliminer davantage les solides, les margines ont été centrifugées à 4500 tr/min pendant 30 min.

III.3.2.3 Dilutions

Les margines brutes utilisées avaient une DBO_5 de 7 g/L à 20 °C qui est une température favorable à l'activité des micro-organismes consommateurs d'oxygène.

Afin que l'oxygène ne doit pas devenir un facteur limitant de l'activité microbienne, nous avons procédé à un ensemble de dilutions, d'où les margines sont diluées dans des quantités d'eau telle qu'à l'issue de la mesure du taux d'oxygène résiduel reste inférieur du taux initial. Cette dilution a été effectuée par des quantités variées de l'eau distillée dans le but d'améliorer l'anaérobiose du milieu pour l'activité biologique de la flore fongique et lactique ciblées initialement dans l'objectif principal de ce travail. Elle est basée sur une étude préalable du pH et réduction des substances toxiques à savoir les polyphénols dans les différents mélanges ajustés à pH neutre, à 20 °C et à l'obscurité à l'aide d'un DBO -mètre. Une optimisation de dilution des margines a été réalisée 2 fois, 5 fois, 10 fois et 20 fois avec de l'eau distillée.

III.3.2.4 Stérilisation

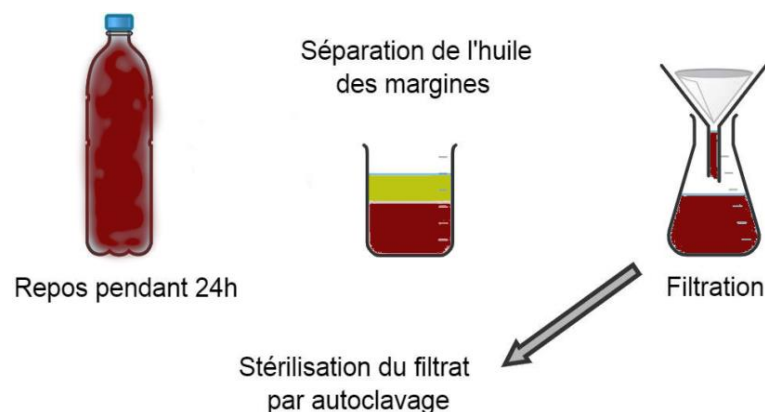


Figure III.4: Etapes de préparation du substrat à base des margines.

Les milieux préparés ont fait objet de stérilisation à 115 °C durant 20 min (Figure III.4).

III.3.3 Stérilisation du matériel et milieux de culture utilisés dans les essais de fermentation

Pour éviter toute contamination, la stérilisation a été effectuée à une température de 120 °C (15 à 20 min). Toutes les colonnes de fermentation, ainsi que ses accessoires, ont été stérilisés à l'exception de certaines pièces qui sont stérilisées au peroxyde d'hydrogène pour des raisons pratiques.

III.3.4 Isolement et identification de souches levuriennes et lactiques

III.3.4.1 Souches levuriennes

a. Isolement

Des dilutions décimales dans l'eau physiologique sont effectuées à partir de la suspension (margines). 0,1 ml de chaque dilution est étalé sur la surface d'un milieu solide sélectif aux levures (milieu OGA à l'oxytétracycline) dans des boîtes de Pétri. Après incubation à 25 °C pendant 5 à 7 jours, les boîtes présentant des colonies isolées et faciles à prélever sont retenues (Figure III.5). Chaque colonie va servir à ensemencer un tube en milieu OGA à l'oxytétracycline (Šuranská et *al.*, 2016).

b. Purification

Selon Nanis et *al.*, la pureté des levures isolées est contrôlée au microscope par un examen à l'état frais. L'identification est basée sur les caractères morphologiques et biochimiques (Nanis et *al.*, 2020).

Un repiquage successif sur le milieu Sabouraud gélosé est fait pour la purification de chaque souche. Les colonies bien isolées ont subi une coloration au bleu de méthylène, puis observées au microscope (x 40 puis x100), pour vérifier la morphologie et l'homogénéité des cellules. Les souches ont été conservées à 4 °C pour une utilisation ultérieure (Figure III.6).

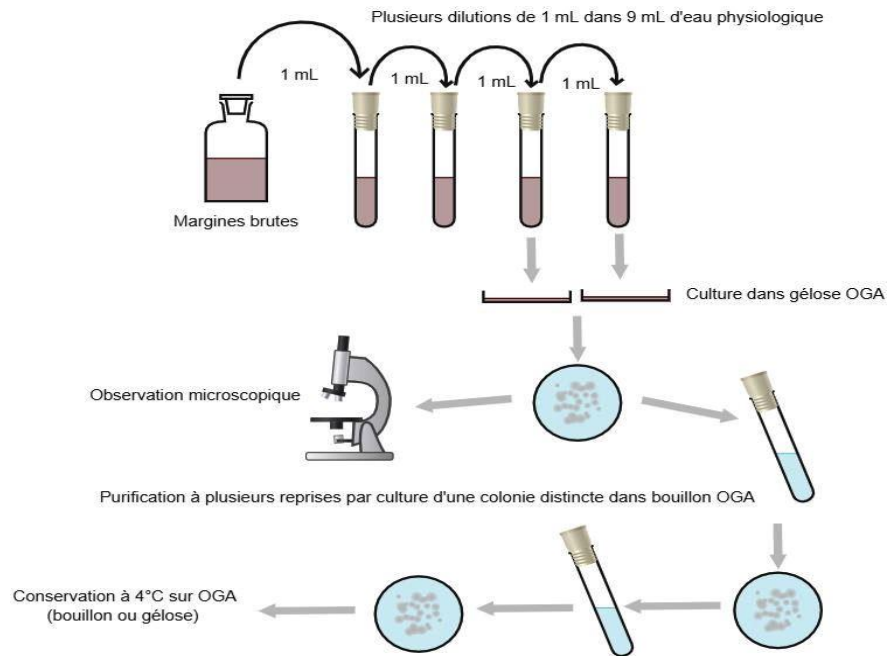


Figure III.5: Diagramme d'isolement des souches.

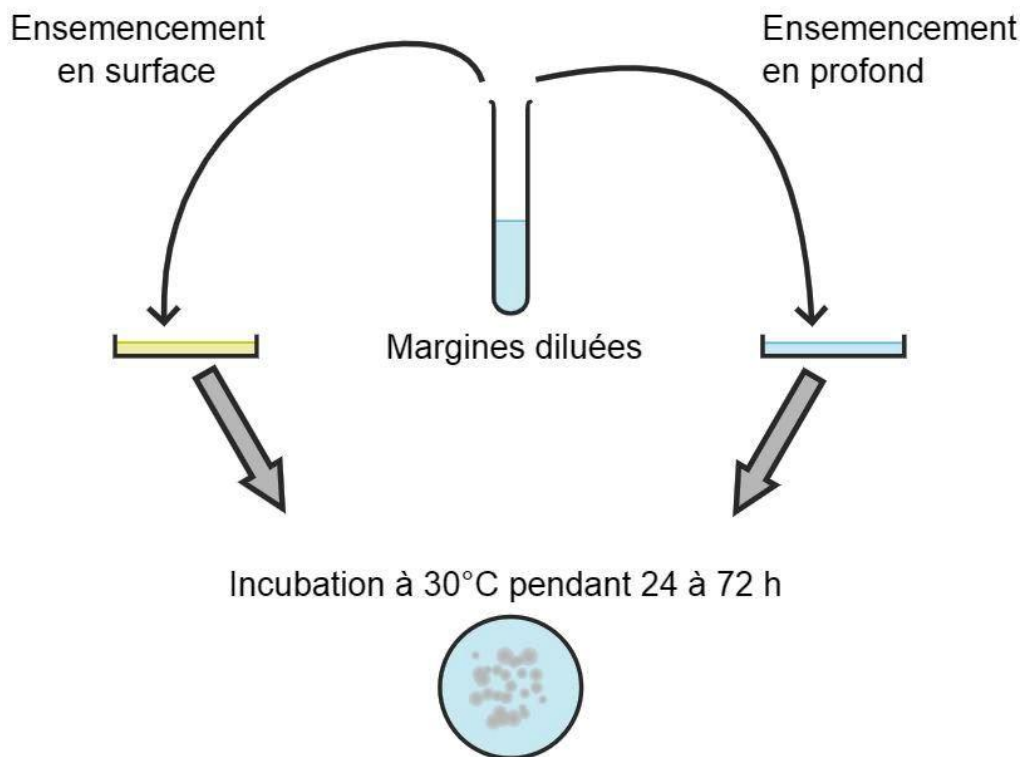


Figure III.6: Ensemencement des différentes dilutions sur gélose (Sabouraud et PDA).

Dans une zone stérile et à l'aide d'une anse de platine, chaque souche est transférée dans un tube à essai stérile rempli avec 10 ml de bouillon Sabouraud, suivi d'une incubation pendant 24 heures à 30 °C (Figure III.7).

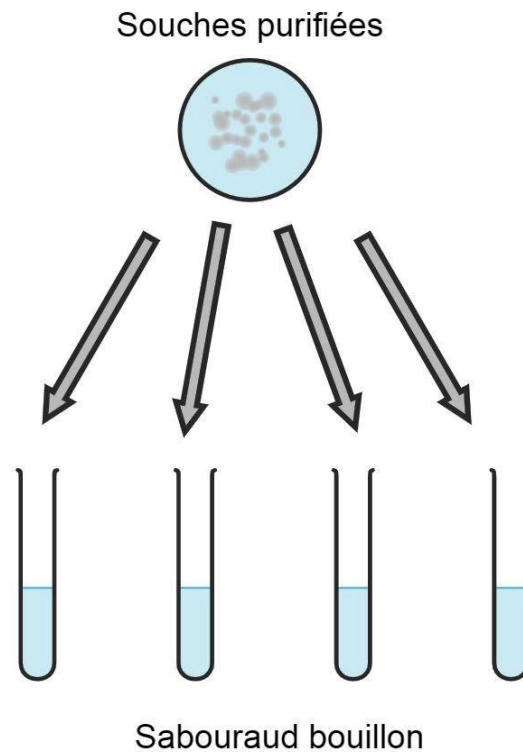


Figure III.7: Transfert des souches dans des tubes de bouillon Sabouraud.

c. Identification des levures

L'identification des levures selon les méthodes conventionnelles est basée sur l'étude des caractères cultureux et morphologiques (macroscopiques et microscopiques) et biochimiques (Šuranská et *al.*, 2016; Nanis et *al.*, 2020).

c.1 Étude des caractères cultureux (macroscopiques)

L'aspect des cultures ou des colonies des levures a été étudié sur les milieux gélosés (Sabouraud et OGA + Oxytétracycline). Après l'incubation pendant 3 jours à 30 °C, une observation macroscopique permet de décrire l'aspect des colonies (taille, pigmentation, contour, viscosité).

c.2 Étude des caractères morphologiques (microscopiques)

Cette étude a pour but d'examiner la morphologie cellulaire telle que la forme et la taille des levures, et leur mode de reproduction végétative.

c.2.1 Observation microscopique sans coloration

L'examen est réalisé à l'état frais sous microscope optique (x 40 et x 100) avec l'huile à immersion. Les frottis ont été préparés à partir de colonies fraîches bien isolées sur les milieux gélosés. Ce test sert à déterminer la forme microscopique de la levure et le type de bourgeonnement.

c.2.2 Observation microscopique après coloration par le bleu de méthylène

Afin de mieux observer la forme des levures et les types de bourgeonnement après une coloration un peu plus spécifique, une colonie est prélevée et déposée sur une lame stérile contenant une goutte de solution de bleu de méthylène, puis rapidement observée au microscope à l'objectif (x 40).

c.3 Test de filamentation

L'aptitude à la filamentation est observée à partir d'une culture sur milieu dans une boîte de Pétri. La levure à examiner est ensemencée en une strie longitudinale à la surface du milieu gélosé. L'observation microscopique (x 100) se fait après 3 à 5 jours d'incubation à 30 °C.

La bordure de la culture est examinée, si la levure filamentée, la nature de mycélium (pseudomycélium ou vrai mycélium), son abondance, sa ramification sont notées.

La différenciation entre vrai mycélium et pseudomycélium se fait sur la base de deux constatations :

- La cellule terminale d'un filament de mycélium vrai est plus grande que l'avant dernière
- Les filaments de pseudomycélium présentent des constriction au niveau de deux cellules consécutives.

On peut noter dans certains cas, la présence de blastospores et de chlamydozoospores (Aouidi *et al.*, 2010).

c.4 Test de sporulation (Test de reproduction sexuelle)

La sporulation est observée à partir d'une culture sur milieu de gélose supplémenté avec 1% de Tween 80 dans une boîte de Pétri. Les levures sont ensemencées à la surface du milieu, puis incubés pendant 10 jours à 30 °C et observées au microscope optique (x 100) à l'état frais. Si les levures sont capables de faire une reproduction sexuée, elle forme des asques, le nombre et la forme des ascospores, leur position, sont notés (Paredes *et al.*, 1987).

Un frotti épais a été réalisé et séché à l'air, puis recouvert de solution de vert de malachite. A l'aide d'un bec benzène, un léger chauffage a été appliqué jusqu'à évaporation sans faire bouillir. Ensuite, le frotti a été rincé pendant 1 minute sous un filet d'eau avant d'être recouvert d'une solution de Safranine et laisser agir 20 sec. L'échantillon a été rincé une deuxième fois, séché et observé au microscope directement sans lamelle (x 40). Les levures et la paroi des asques sont colorées en rose tandis que les ascospores sont colorées en vert.

III.3.4.2 Souches de *Lactobacillus* sp.

a. Isolement

Dans un tube à essai de 20 ml, 1 ml des margines a été pipeté aseptiquement dans 9 ml d'eau physiologique et des dilutions décimales ont été réalisées (10^{-1} à 10^{-12}), sont réalisées à partir de la solution mère obtenue.

Avant d'y couler la gélose refroidie à 40 °C à raison de 20 ml par boîte, une série d'ensemencement est effectuée par la méthode des stries sur des boîtes contenant le milieu MRS solide afin d'avoir des cultures pures.

b. Purification

La purification consiste à réaliser des repiquages successifs sur gélose et bouillon MRS pour les lactobacilles ; avec une incubation à 30 °C pendant 72 heures sur boîtes et 24 heures en milieu liquide, jusqu'à l'obtention des colonies de même taille, même forme et même couleur renseignant sur la pureté des souches.

c. Identification

La pureté des souches est confirmée par des observations macroscopiques et microscopiques :

c.1 Observation macroscopique

Après observation sur une boîte de Pétri incubée à 30 °C pendant 24 à 48 heures, l'aspect, la couleur, la taille et le contour des colonies sont décrits.

c.2 Observation microscopique

La pureté des souches est confirmée par des observations microscopiques à l'état frais et une coloration de Gram après chaque repiquage.

c.2.1 Observation à l'état frais

Permet de déterminer la forme, l'arrangement et la mobilité des bactéries. Il consiste à l'observation d'une goutte de suspension bactérienne, préparée avec de l'eau physiologique et placée entre lame et lamelle. L'observation se fait au microscope photonique à grossissement x 100 (Singleton *et al.*, 1999).

c.2.2 Coloration de Gram

La coloration de gram est une double coloration qui permet de connaître la forme, l'arrangement, la pureté ainsi que la nature biochimique de la paroi des cellules purifiées. Elle est la base de l'identification d'une souche bactérienne. Cette coloration permet de classer les

bactéries selon leur capacité à fixer le cristal violet. Celles qui possèdent une couche de peptidoglycane mince sont décolorées lors du lavage à l'éthanol (Gram⁻), alors que celles qui possèdent une couche de peptidoglycane épaisse vont retenir le colorant (Gram⁺). La consistance et la valeur de la coloration de Gram correspond à des différences biochimiques entre la paroi des bactéries Gram positif et les bactéries Gram négatif (Marchal *et al.*, 1982).

c.3 Critère Physiologique et biochimique

c.3.1 Étude du caractère Physiologique

La croissance sur bouillon nécessite un tube stérile contenant 10 ml du bouillon inoculé par une colonie isolée sur gélose MRS puis incubé à 30 °C pendant 24 à 48 heures, jusqu'à l'apparition d'un trouble bactérien (Belaqziz *et al.*, 2016).

c.3.2 Croissance à différentes températures

Ce test est important du point de vue taxonomique, car il permet de distinguer les bactéries lactiques mésophiles des bactéries lactiques thermo-tolérantes. Il a été réalisé après inoculation du bouillon MRS par des cultures fraîches. Les cultures ont été incubées à différentes températures 15, 37 et 45 °C pour les lactobacilles. La croissance est révélée par un trouble du milieu après 24 à 48 heures en comparaison avec un témoin non ensemencé (Guiraud, 2012).

c.3.3 Thermorésistance

Ce test permet de sélectionner des espèces thermorésistantes. Les souches à tester ont été préalablement réparties dans des tubes stériles contenant du bouillon MRS. Ces tubes ont été par la suite exposés à une température de 62 °C pendant 30 min puis refroidis rapidement sous un jet d'eau de robinet. L'incubation a été faite à 30 °C pendant 48 heures (Guiraud, 2012).

c.3.4 Croissance en présence de différentes concentrations de NaCl

Des Eppendorfs stériles ont été ensemencés avec du bouillon MRS à 4, 6,5 et 10 % de NaCl, l'incubation a été faite à 30 °C pendant 24 heures (Guiraud, 2012). La croissance de ces bactéries se manifeste par un trouble du milieu en comparaison avec un tube témoin non ensemencé.

c.3.5 Croissance à pH 4,8 et 9,6

Ce test a été réalisé sur bouillon MRS dont le pH est ajusté à 4,8 et 9,6 en ensemencant des Eppendorfs stériles contenant 1ml du bouillon MRS à pH voulue avec une colonie prise de la gélose MRS. La croissance se traduit par un trouble du milieu après 24 à 48 heures à 30 °C (Sciubba *et al.*, 2020).

c.4 Étude des caractères biochimiques

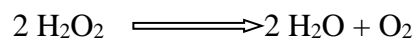
Les épreuves biochimiques permettent en général de distinguer les espèces, même étroitement apparentées entre elles (Babić *et al.*, 2019).

c.4.1 Recherche de l'oxydase

Ce test effectue avec des disques prêts à l'emploi disponible dans le commerce. Déposer le disque sur une lame porte-objet, l'humidifier avec deux gouttes d'eau distillée stérile et écraser la colonie testée sur le disque. Une réaction positive se traduit par un virage rapide du disque de l'incolore au violet.

c.4.2 Test de catalase

La catalase permet la décomposition de l'eau oxygénée selon la réaction :



L'activité catalasique permet la dégradation de l'eau oxygénée en oxygène et en eau. Elle est mise en évidence en déposant une à deux colonies de l'isolat de la souche à tester dans une solution fraîche d'eau oxygénée à 10 volumes sur une lame. Un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse, traduit la décomposition de l'eau oxygénée (Guiraud, 2012). Ce test a pour but de différencier les bactéries lactiques (catalase -) des autres bactéries.

c.4.3 Test à la potasse (KOH)

Sur une lame on dépose une goutte de KOH et on ajoute une colonie de l'espèce à tester puis on mélange avec une pipette Pasteur, en cas de la formation d'un filament (mélange visqueux) cela signifie que la bactérie est à Gram négatif. L'absence de filament, indique que la bactérie est à Gram positif (Guiraud, 2012).

c.4.4 Hydrolyse de l'Arginine (ADH)

La recherche de l'arginine déhydrolyse (ADH) est étudiée sur milieu M16 BCP. Les bactéries lactiques utilisent le lactose en acidifiant le milieu, les colonies donnent ainsi une coloration jaunâtre. D'autres bactéries lactiques sont capables d'utiliser l'arginine et ré-alcaliniser le milieu (cette enzyme libère l'ammoniac et la citruline à partir de l'arginine) et par conséquent changer la couleur du milieu du jaune au violet qui est la couleur initiale (Molina Alcaide *et al.*, 2003).

c.4.5 Type fermentaire

Ce test permet de différencier les bactéries lactiques homofermentaires de celles hétérofermentaires. Il consiste à mettre en évidence la production du gaz (CO₂). Des souches fraîches préalablement cultivées sur gélose MRS ont étéensemencées dans des tubes stériles contenant du bouillon MRS sans citrate (Biokar, France) et une cloche de Durham. L'incubation est réalisée à 30 °C pendant 24–48 heures. Les souches homofermentaires

produisent l'acide lactique à partir du glucose, par contre les souches hétérofermentaires produisent l'acide lactique et le CO₂ à proportions égales (Nanis *et al.*, 2020).

c.4.6 Production de dextrane

La production du dextrane à partir de saccharose est mise en évidence sur milieu solide. Les souches productrices de dextrane sont caractérisées par la formation de colonies larges, visqueuses et gluantes. Ce test est aussi considéré comme clé d'identification permettant aussi de différencier entre les bactéries productrices et non productrice de dextrane. On teste la production de dextrane sur milieu MRS à 10% saccharose (Aouidi *et al.*, 2010).

c.4.7 Utilisation du citrate

L'utilisation du citrate est étudiée sur milieu Kempler et Mc Kay (KMK) (1980). Ce milieu contient une solution de ferricyanure de potassium et une solution de citrate ferrique. La présence du citrate dans le milieu inhibe la réaction entre l'ion ferrique et le potassium ferricyanide. Les colonies qui fermentent le citrate lancent la réaction entre ces ions, il en résulte la formation des colonies bleues ou ayant un centre bleu (après 48 à 72 heures d'incubation). Les colonies incapables de fermenter le citrate restent blanches (Dashti *et al.*, 2015).

c.4.8 Production d'acétoïne

La production d'acétoïne est testée sur milieux Clark et Lubs (Guiraud, 2012) qui est inoculé par les souches à tester et incubé à 30 °C. Après 24 heures et dans un tube à hémolyse on dépose sur cette culture de 2 ml, 0,5 ml de α -naphthol à 6 % dans l'alcool absolu (VP₁) et 0,5 ml d'une solution de soude (NaOH) à 16 % dans l'eau distillée (VP₂) pour assurer la réaction de Voges-Prokauer dite réaction de VP. On agite soigneusement les tubes et on les laisse en contact avec l'air libre pendant 5 à 10 min à température ambiante. La production d'acétoïne se traduit par l'apparition d'un anneau rose à la surface du milieu (Guiraud, 2012).

c.4.9 Utilisation de carbohydrates

Les bactéries lactiques dégradent différemment les sources de carbone. L'étude de la fermentation des sucres est réalisée sur le bouillon MRS modifié (sans glucose et sans extrait de viande), additionné au pourpre de bromocrésol (BCP) comme indicateur de pH (Lin *et al.*, 2020). La source de carbone est représentée par l'un des sucres suivant : 1^{ère} colonne: Arabinose, Mannose, Mannitol ; Sorbitol, Fructose, Maltose, lactose, raffinose (Di Mauro *et al.*, 2017). Les solutions sucres sont préparées à 3 % et stérilisées par tyndallisation.

Vu le nombre important de souches étudiées, des plaques d'Elisa ont été utilisées. Les puits de chaque ligne contiendront une source de carbone qui sera testé pour différentes

souches. Une solution bactérienne servant à ensemercer les puits contenant les différentes sources de carbone a été préparée (Figure. III.8).

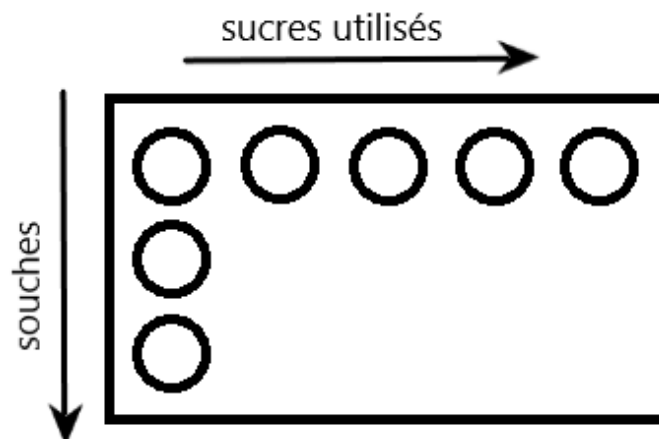


Figure III.8: Schéma représentant la mini préparation pour le test de la fermentation des sucres (Tsigkou *et al.*, 2019).

Une culture de 18 heures de la souche appropriée à 6000 tour/minute pendant 15 min. Le culot est récupéré et additionné à 1,5 ml de tampon phosphate puis recentrifugé aux mêmes conditions pour le débarrasser des restes du milieu de culture et obtenir un culot cellulaire pur, cette action est répétée deux fois (Mekki *et al.*, 2006).

1,5 ml du milieu MRS BCP-EV est additionnée à ce culot, pour fournir la solution cellulaire servant à ensemercer les puits de a plaque Elisa contenant différentes sources de carbone, 50 μ L de cette solution bactérienne est déposée dans chaque puits avec 50 μ L de sucre, et 200 μ L du milieu MRS, le tout recouvert par une goutte d'huile de paraffine pour créer les conditions d'anaérobiose (Tsigkou *et al.*, 2019).

c.4.10 Antibiogramme

Pour réaliser l'antibiogramme par la méthode des disques, la culture bactérienne est ensemercée à la surface d'une gélose spécialement étudiée, la gélose de Mueller-Hinton. Des disques pré-imprégnés d'une dose connue d'antibiotique sont déposés à la surface de la gélose. L'antibiotique diffuse à partir du disque en créant un gradient de concentration. La détermination du diamètre de la zone d'inhibition permet une estimation de la concentration minimale inhibitrice. Les caractères de sensibilité ou de résistance de la souche bactérienne en seront déduits.

En pratique, On dispose ensuite les disques d'antibiotiques et on place à l'incubateur. Au bout de 24 heures, on lit les différents diamètres d'inhibition et on peut conclure en comparant ceux-ci aux abaques de lecture.

c.4.11 Etude du pouvoir acidifiant des souches de lactobacillus sp.

L'activité acidifiante des bactéries lactiques représente leur principale activité métabolique et qui dépend directement de leur croissance. La façon la plus indiquée pour la mesure d'acidité consiste à suivre d'une part, l'évolution du pH des cultures au cours du temps et d'autre part, à doser simultanément l'acidité Dornic par la soude NaOH N/9 (Yoo *et al.*, 1996).

La mesure du pouvoir acidifiant est réalisée dans les margines et dans le milieu de culture stérile dont l'acidité initiale est mesurée au moment de l'ensemencement c'est-à-dire à 0 heure.

Une culture de 18 heures de la souche appropriée a été centrifugée à 6000 trs/min pendant 15 min. Le culot est récupéré et additionné 45 ml de bouillon et de margines stérile. L'incubation est réalisée à 30 °C. Des dénombrements sont réalisés chaque 2 heures (2, 4, 6 et 8 heures) et après 24 heures puis 48 heures d'incubation. Au terme de cette étude, les souches présentant le meilleur pouvoir acidifiant seront sélectionnées pour le reste de l'étude.

c.4.12 Etude de la fermentation de substrats

- **Utilisation de galerie API 50 CH**

La galerie API 50 CH est constituée de 50 microtubes permettant l'étude de la fermentation de substrat, appartenant à la famille des hydrates de carbone et dérivés (hétérosides, polyalcools, acides uroniques). Les tests de fermentation sont inoculés avec API 50 CHL Medium qui réhydrate les substrats. Durant la période d'incubation, la fermentation se traduit par un changement de couleur dans le tube, dû à une production d'acide en anaérobiose révélée par l'indicateur de pH du milieu choisi. Le premier tube, sans principe actif, sert de témoin négatif.

- **Utilisation de la galerie API 20E**

Cette galerie comporte 20 microtubes contenant des substrats sous forme déshydraté, et dont seront inoculés par la suspension bactérienne de la souche à tester. Ce type de galerie est recommandé pour l'identification des entérobactéries.

III.3.5 Préparation des supports de garnissage

III.3.5.1 Traitement des supports

Afin d'éliminer toute substance contenue dans la pouzzolane susceptible de se solubiliser dans le milieu réactionnel, la pouzzolane est traitée par rinçage à l'eau distillée, puis émergée dans l'alcool 96 % pendant 24 heures. Ensuite, elle est rincée à l'eau oxygénée

afin d'éliminer toute trace restante. Après plusieurs rinçages à l'eau distillée, le support est séché à 105 °C dans l'étuve pendant 10 heures, jusqu'à poids constant. Avant l'utilisation pour l'immobilisation cellulaire, la pouzzolane est autoclavée à 120 °C pendant 30 min.

L'os bovin a été dégraissé par l'utilisation de l'éther de pétrole, puis un rinçage a été effectué avec de l'eau de robinet pour éliminer toutes les traces du solvant et les impuretés de la graisse.

Un traitement thermique a été procédé à une température allant de 180 °C et 200 °C. Un deuxième rinçage abondant avec de l'eau distillée a été réalisé pour éliminer les traces de sels issues de l'eau de robinet. Puis un séchage a été fait dans une étuve à 105 °C jusqu'à un poids constant.

III.3.5.2 Préparation de la granulométrie des supports

Le choix de la granulométrie de la pouzzolane a été basé sur des travaux effectués durant les années précédentes. Par contre, la granulométrie de l'os bovin est la même que celle de la pouzzolane afin de comparer les résultats de l'utilisation des deux supports. Le diamètre des grains utilisés est de 6 mm (Figure III.9).

L'os bovin a subi diverses étapes au cours de sa transformation. Commencant par une congélation pendant 48 heures, les tissus cellulaires et tendineux ont été éliminés. Les os ont ensuite été broyés en petits morceaux de 2 cm avant d'être bouillis pendant 10 heures pour éliminer les protéines.

Les morceaux d'os déprotéinés ont été immergés dans une solution de chloroforme pendant 1 heure pour éliminer les lipides puis dans une solution de H₂O₂ pendant une heure pour éliminer toute matière organique. Ensuite, ils ont été bouillis pendant une heure, lavés et séchés à 80 °C. De petits morceaux entre 0,4 et 0,6 cm ont été obtenus par broyage. Enfin, l'os a été stérilisé à 120 °C pendant 20 minutes.

Les étapes de préparation du support de pouzzolane commencent par un concassage avec un maillet métallique mécanique en petits morceaux compris entre 0,4 et 0,6 cm. Ceci est suivi d'une incinération dans un four à moufle à 500 °C pour obtenir une bonne porosité et éliminer toute matière biologique présente dans la pouzzolane.

Les échantillons ont été rincés plusieurs fois à l'eau du robinet. Ils ont été plongés dans l'alcool pendant 24 heures. Rincer à nouveau avec du peroxyde d'hydrogène et de l'eau distillée plusieurs fois. Suivi d'un séchage à 105 °C pendant 10 heures dans une étuve. Terminer par une stérilisation en autoclave à 120 °C pendant 20 minutes.



Figure III.9: Granulométrie des supports.

III.3.5.3 Détermination de la granulométrie, la porosité et la densité des supports

a. Détermination de la porosité des supports

Un support poreux est un matériau constitué des particules solides cimentées entre elles et formant un squelette autour duquel subsistent des espaces vides. L'autre phase qui est le fluide, occupe le volume poreux constitué par les espaces de la phase du solide. La porosité (Tableau III.2) c'est la fraction volumique occupée par le fluide entre les grains.

$$\varphi = \frac{\text{Volume d'eau nécessaire à la saturation}}{\text{Volume du matériau saturé}}$$

φ : Porosité totale du matériau.

b. Densité et masse volumique

La masse volumique apparente d'un matériau est mesurée en effectuant le rapport masse sèche sur le volume. Cette mesure prend en compte dans l'estimation du volume, les vides ménagés par la porosité du matériau. La masse volumique s'exprime en Kg.m^{-3} (Tableau III.2).

L'augmentation du volume et de la masse provoquée par l'introduction du matériau dans une éprouvette d'eau permet d'estimer sa masse volumique réelle, c'est-à-dire le rapport entre la masse du matériau et le volume qu'il occupe sans prise en compte du vide.

La densité (Tableau III.2) s'obtient en faisant le rapport entre la masse volumique réelle du matériau et celle de l'eau (Ducom et *al.*, 2020; Sánchez-Martínez and Garrido-Almonacid, 2019) (Tableau III.2).

$$\rho_{\text{matériau}} = \frac{\Delta m_{\text{matériau}}}{\Delta v_{\text{matériau}}}$$

$\rho_{\text{matériau}}$: la masse volumique du matériau (Kg.m^{-3}).

$$d_{\text{matériau}} = \frac{\rho_{\text{matériau}}}{\rho_{\text{eau}}}$$

d : Densité du matériau, le cas de pouzzolane la densité est égale à 1,02 g.m⁻³.

Tableau III.2: Porosité et densité des supports.

Support	Porosité (%)	Masse volumique (Kg.m ⁻³)	Densité
Pouzzolane	63±5	1,02 x10 ⁻³	0,8-1,13
Os	72±3	1,1 x10 ⁻³	1,2

III.3.5.4 Immobilisation de souches isolées sur supports solides traités

a. Test de fixation des souches

Nous avons introduit dans des boîtes de Pétri en verre des quantités égales de la pouzzolane de l'ordre 20 g et 15 g de l'os bovin. Le lit de pouzzolane et celui de l'os bovin sont immergés par les milieux préparés pour la fermentation alcoolique et lactique, par culture levurienne et bactérienne pour une fermentation alcoolique durant 72 heures, et pour une fermentation lactique durant 24 heures, jusqu'à la fixation des cellules puis le surnageant est récupéré. Un test de confirmation de fixation est effectué par observation sous une loupe binoculaire.

b. Fixation de souches sur supports en vue de fermentation

Avant d'effectuer la fermentation discontinue à cellules immobilisées, nous avons effectué une immobilisation cellulaire dans des flacons sur la pouzzolane et l'os bovin en suivant les étapes suivantes :

- Mise dans des flacons stériles des poids déterminés de supports autoclavés ;
- Ajout de différents milieux de culture de référence et préparés à partir des margines et lactosérum selon la souche et produit ;
- Agitation des flacons conditionnés dans un incubateur (Shaker) à 30 °C pendant 72 heures (Figure III.10).

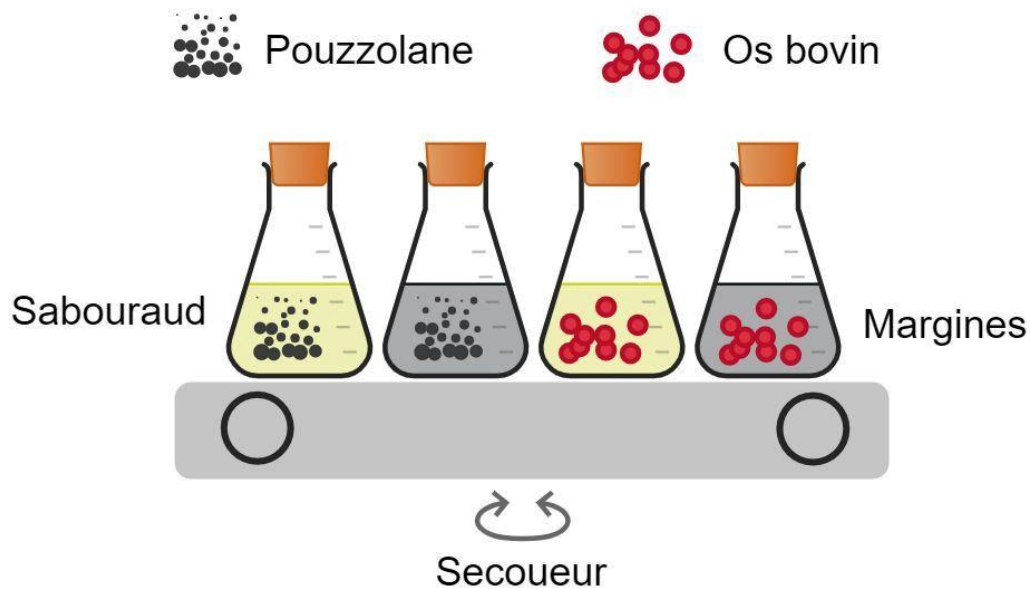


Figure III.10: Fixation cellulaire sur les supports (Os bovin et pouzzolane)

Pour apprécier le temps de la phase d'immobilisation sur les deux supports pouzzolane et l'os bovin, un suivi a été effectué sur l'évolution de la biomasse des souches utilisées après un temps de séjour de 18, 24, 48 et 72 heures en fonction de :

- La différence des poids de la pouzzolane avant l'immobilisation et celui d'après à l'état frais.
- L'évolution de la biomasse dans les milieux (récupérât à t=18, 24, 48, 72 heures) et récupérer les cellules fixées et éventuellement pour apprécier les étapes de la fixation (Piacentini et *al.*, 2016).

III.3.6 Conduites des différentes fermentations

III.3.6.1 Préparations des précultures de souches isolées

a. Levures

Avant chaque préparation, un aliquote de chaque souche est repiqué sur une boîte de gélose OGA contenant la tétracycline et incubé à 28 °C pendant 24 à 48 heures. Après croissance, une colonie est prélevée stérilement à l'aide d'une pipette et mise en suspension dans un tube à essai de 10 ml des margines traitées, diluées et autoclavées et le milieu de référence Sabouraud individuellement. Afin de s'assurer que toutes les cellules sont dans le même état physiologique, une deuxième préculture est réalisée, la culture de 24 heures de tubes à essai est mise dans des flacons de 250 ml contenant 100 ml de milieux suscités et incubée à 30 °C sous agitation de 150 trs/min pendant 24 heures.

La croissance cellulaire est suivie par la mesure de la densité cellulaire par spectrophotométrie à 600 nm (spectrophotomètre) dans une cuve en verre de 2 mm de trajet optique. La suspension cellulaire est diluée de façon à obtenir une densité optique comprise entre 0,05 et 0,8 unité d'absorbance, ce qui place la valeur dans la zone de linéarité de la méthode et pour avoir la corrélation UFC/DO. Les souches isolées ont été objets de 24 préparations de précultures.

b. *Lactobacillus* sp.

Après croissance, une colonie est prélevée de façon stérile à l'aide d'une anse et mise en suspension dans un flacon de 100 ml contenant 50 ml de bouillon MRS stérile (le milieu principal de lactobacilles) et des milieux supplémentée avec le lactosérum à savoir: milieu 1 (100% *Margines diluées 10 fois (MMD10)*), milieu 2 (50% *MMD10* + 50% de lactosérum), (75% *MMD10* + 25% de lactosérum), milieu 4 (100 % lactosérum). Les milieuxensemencés sont incubés pendant 24 heures à 30 °C.

Cinq millilitres de chaque culture préliminaire sont ensuite centrifugés à 4000 trs/min, les culots sont mis dans les mêmes conditions des précultures primaires dans un volume de 250 ml puis sont mis sous incubation pendant 24 heures à 30 °C.

Les fermentations ont été débutées en fiole d'Erlenmeyer de 250 ml avec un volume de 100 ml de milieux de culture à cellules libres avec un *pH* de 6,5 pour les lactobacilles et levures, à 37±1 °C pour les lactobacilles et à 30±2 °C pour les levures et une agitation de 100 trs/min pour les deux microorganismes.

En ce qui concerne le mode immobilisé, il a été utilisé des flacons de 100 ml muni de seringues pour les levures dont le volume réactif a été de 48 ml avec un *pH* de 6,5 et 30±2 °C. Par contre, la fermentation lactique à cellules immobilisées de différents milieux sur les deux supports a été réalisée dans un volume de 48 ml avec un *pH* de 6,5 et 37±1 °C. Toutes les fermentations ont été maintenues sous agitation de 100 trs/min.

- ***Avec cellules libres***

Les différentes déterminations (BE, PA et B) avec cellules libres en mode statique sont montrées dans le Tableau III.3.

Tableau III.3: Déterminations de bioéthanol, pouvoir acidifiant et biomasse en mode statique avec cellules libres.

Phase	Initiale			Finale		
	BE	PA	B	BE	PA	B
Facteur						
Milieux de culture	<i>100% Margines diluées 10 fois (MD10%) et Milieu de référence (bouillon Sabouraud pour levure et Bouillon MRS pour les lactobacilles) individuellement</i>					
Souches						
<i>Saccharomyces sp. (23 souches)</i>	-	00	-	-	00	-
<i>Levure commerciale S. cerevisiae</i>	-	00	-	-	00	-
<i>Lactobacillus sp. (16 souches)</i>	00	-	-	00	00	-
<i>Lactobacillus sp. (16 souches)</i>	<i>50% MD10 + 50% de lactosérum</i>					
	00	00	00	00	00	00
<i>Lactobacillus sp. (16 souches)</i>	<i>75% MD10 + 25% de lactosérum</i>					
	00	00	00	00	00	00
<i>Lactobacillus sp. (16 souches)</i>	<i>100% lactosérum</i>					
	00	00	00	00	00	00

BE : Bioéthanol

PA : Pouvoir Acidifiant

B : Biomasse (DO)

- *Avec cellules immobilisées sur supports*

Les différentes déterminations avec cellules immobilisées sur les deux supports solides en mode statique sont montrées dans le Tableau III.4.

Tableau III.4: Déterminations de bioéthanol, pouvoir acidifiant et biomasse en mode statique avec cellules immobilisées sur supports pouzzolane et os bovin.

Support	<i>Pouzzolane</i>						<i>Os bovin</i>					
	<i>Initiale</i>			<i>Finale</i>			<i>Initiale</i>			<i>Finale</i>		
	BE	PA	B	BE	PA	B	BE	PA	B	BE	PA	B
Phase	<i>100% Margines diluées 10 fois (MD10) et Milieu de référence (bouillon Sabouraud pour levure et Bouillon MRS pour les lactobacilles) individuellement</i>											
Facteur												
Milieus de culture												
Souches												
<i>Saccharomyces sp. (23 souches)</i>	-	00	-	-	00	-	-	00	-	-	00	-
<i>Levure commerciale S. cerevisiae</i>	-	00	-	-	00	-	-	00	-	-	00	-
<i>Lactobacillus sp. (16 souches)</i>	00	-	-	00	00	-	-	00	00	-	-	00
<i>Lactobacillus sp. (16 souches)</i>	<i>50% MD10 + 50% de lactosérum</i>											
	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00
<i>Lactobacillus sp. (16 souches)</i>	<i>75% MD10 + 25% de lactosérum</i>											
	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00
<i>Lactobacillus sp. (16 souches)</i>	<i>100% lactosérum</i>											
	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00

BE : Bioéthanol

PA : Pouvoir Acidifiant

B : Biomasse (DO)

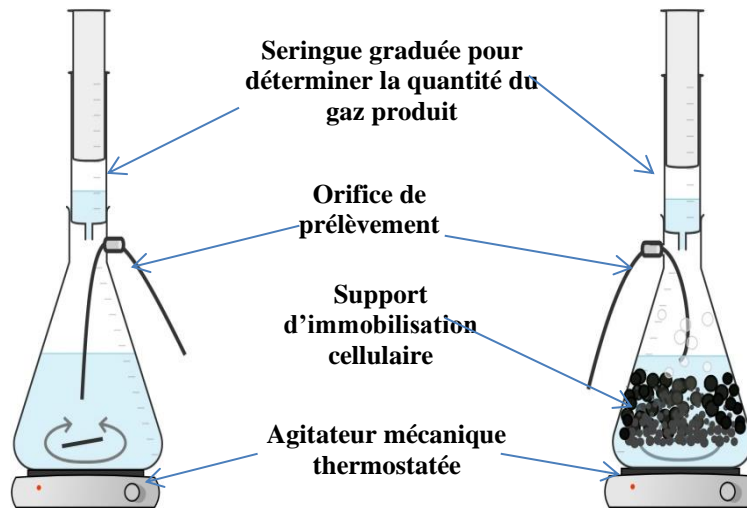


Figure III.11 : Fermentation statique des différents milieux par les levures isolées à cellules libres et immobilisées à 30 ± 2 °C, pH_i de 5,6 et sous agitation de 100 trs/mn.

Cette étape a été réalisée afin de déterminer la souche la plus performante parmi les 23 souches levurienne isolées et les 16 souches lactiques en mesurant le volume du gaz élaboré par l'isolat fongique (Figure III.11), le pouvoir acidifiant en ° Dornic pour l'isolat lactique (Figure III.12) et la DO des deux isolats.

Le suivi de la cinétique des souches plus productrices de gaz et acide lactique a été réalisé afin de sélectionner la ou les souches les plus performantes et les utilisées pour les fermentations en batch discontinue et continue immobilisées ou non.

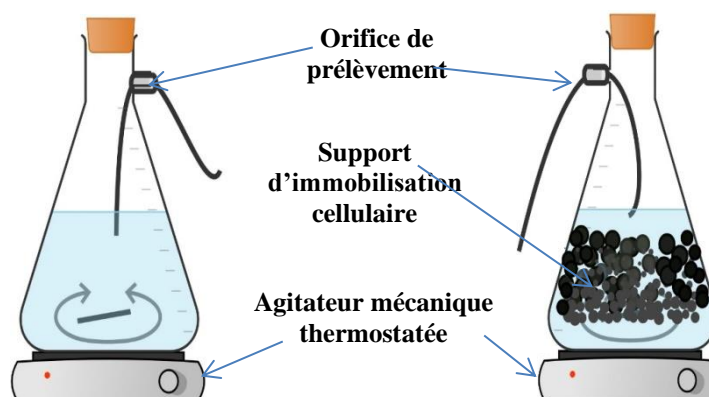


Figure III.12: Fermentation statique des différents milieux par les *Lactobacillus* sp. isolées à cellules libres et immobilisées à 37 ± 1 °C, pH_i de 5,6 et sous agitation de 100 trs/min

III.3.6.2 Fermentations en culture discontinue « batch » à cellules libres

Dans ce protocole expérimental, nous avons mené en première étape des fermentations en discontinue « batch » dans un fermenteur composant des montages expérimentaux. Les paramètres étudiés dans cette phase sont : pH , DO, dénombrement des cellules vivantes pendant 120 heures, à température 30 ± 2 °C pour les levures et 37 ± 1 °C pour les souches lactiques, pH_i 6,5 avec une agitation de 140 tr/mn pour les deux souches. Les suspensions sont versé dans 1 L de milieu spécifique de chaque souche et 1 L de margines diluées à 10% sans ajout pour les deux souches. Les margines supplémentées aux pourcentages de 50 et 75 ont été utilisées pour les souches lactiques uniquement. Les fermenteurs contenant les substrats sont autoclavés avant puis ensemencés par une préculture de 10 % de chaque souche (Figures III.13 et III.14).

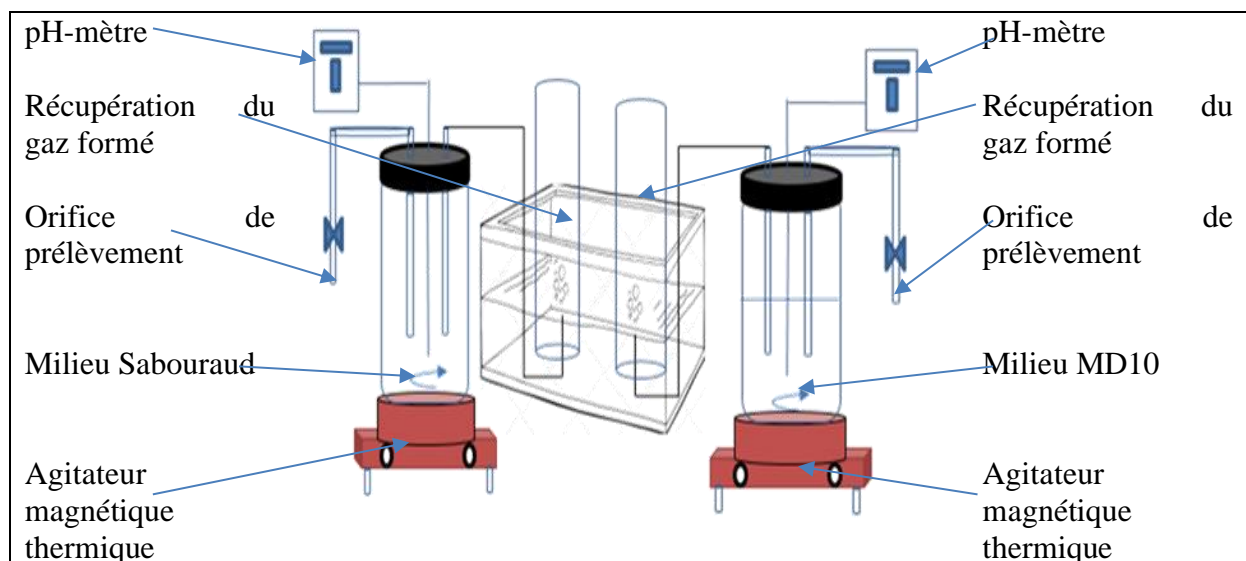


Figure III.13 : Fermentation éthanolique en culture discontinue «batch» à cellules libres à 30 ± 2 °C pour levures et 37 ± 1 °C pour les souches lactiques, pH_i 5,6 avec une agitation de 140 trs/mn pour les deux souches

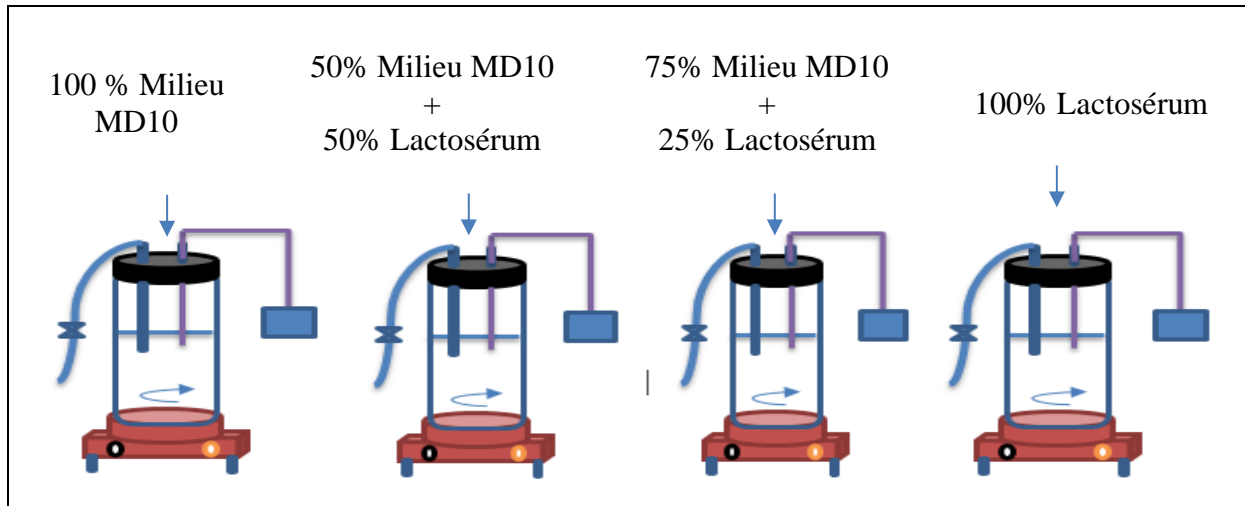


Figure III.14 : Fermentation lactique en culture discontinue «batch» à cellules libres à 37 ± 1 °C p_{Hi} 5,6 avec une agitation de 140 trs/min en comparaison avec MRS.

III.3.6.3 En culture discontinue (batch) immobilisé

Dans ce dispositif, la suspension microbienne est fixée sur un support (pouzzolane/os bovin). Un filet en plastique a été ajouté pour séparer entre le barreau agitateur et la suspension (Figures III.15 et III.16).

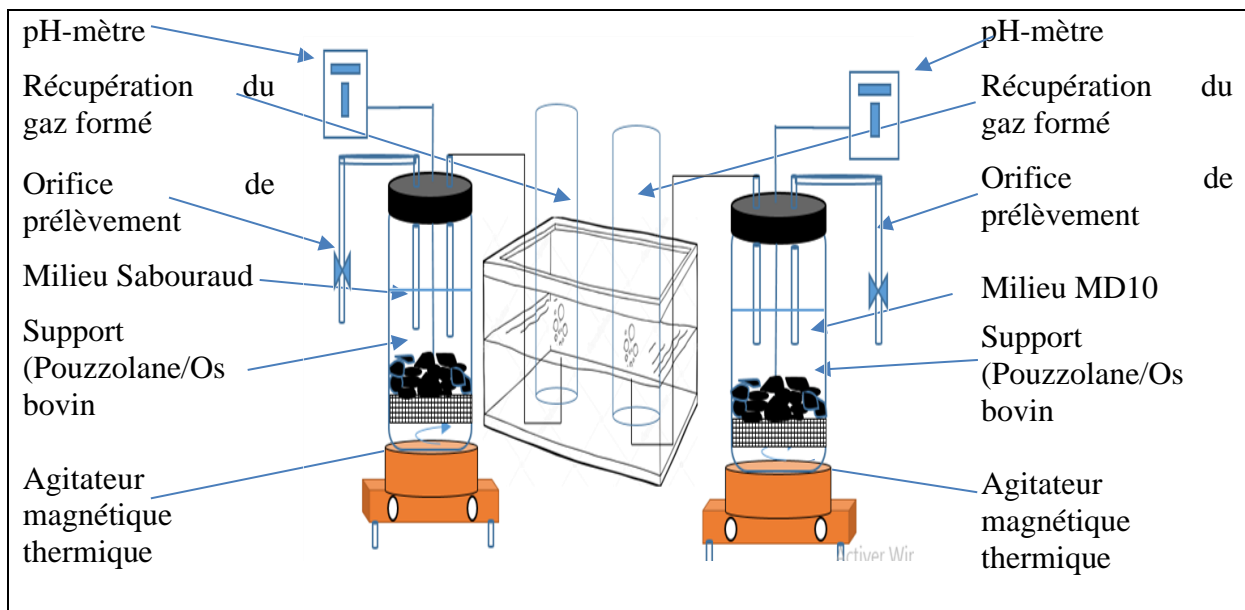


Figure III.15 : Fermentation éthanolique en culture discontinue «batch» à cellules immobilisées à 30 ± 2 °C pour levures et 37 ± 1 °C pour les souches lactiques, p_{Hi} 5,6 avec une agitation de 140 trs/min pour les deux souches.

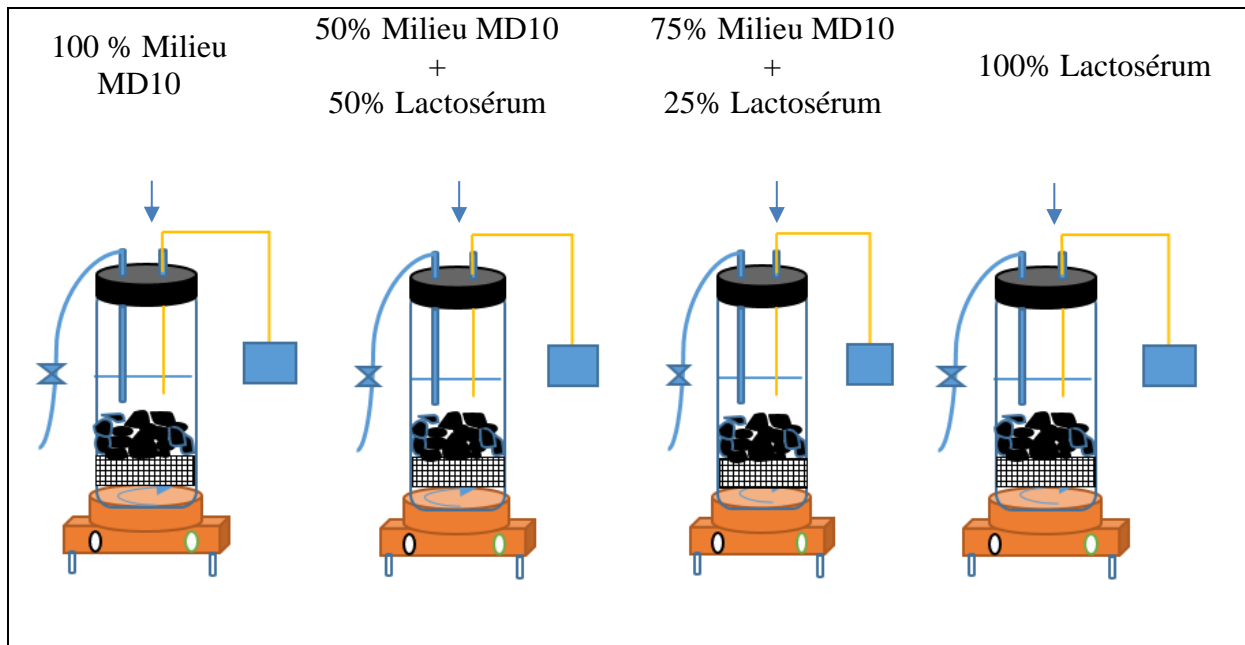


Figure III.16: Fermentation lactique en culture discontinue «batch» à cellules immobilisées à 37 ± 1 °C pH 5,6 avec une agitation de 140 trs/min en comparaison avec MRS.

III.3.6.4 En culture continue à cellules immobilisées

Dans ce protocole expérimental, nous avons mené en première étape des fermentations en continue à cellules immobilisées dans un fermenteur composé d'un montage expérimental (Figure III.17).

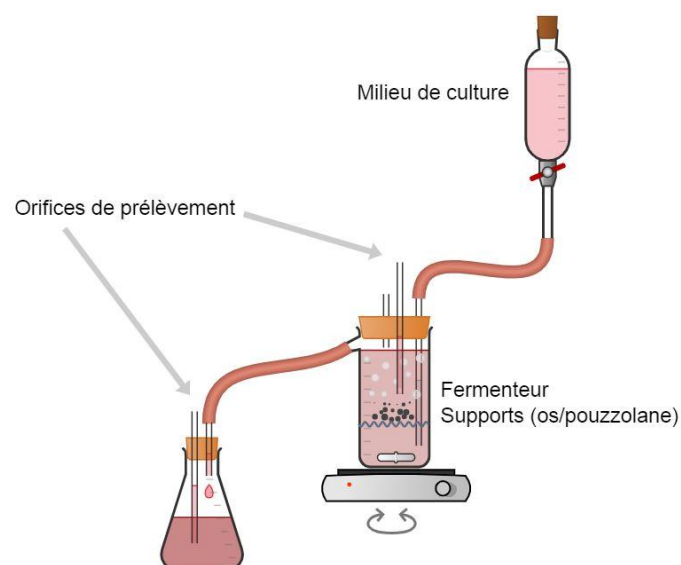


Figure III.17: Dispositif de fermentation en culture continue à cellules immobilisées sur supports pouzzolane et os bovin.

Le dispositif est constitué de colonne fabriquée à base d'un polymère alimentaire de 15 cm de hauteur, 5 cm de diamètre et de volumes garnies par la pouzzolane ou l'os bovin. Ces colonnes sont stérilisables par un autoclavage de 121 °C pendant 15 min.

Au fond de ces colonnes, est disposée une grille qui empêche le support d'obstruer l'orifice d'alimentation ascendante. L'envoi du milieu de culture est assuré par effet de la pesanteur ayant un débit réglé. Le bioréacteur a été alimenté à un taux (40 à 50 ml.heure⁻¹). Cette vitesse a été augmentée quand la matière particulaire est accumulée dans la canalisation.

Le temps de résidence ou de séjour (min) a été calculé à partir du volume du bioréacteur et du débit d'alimentation selon l'équation suivante :

$$t_s = \frac{V_t}{D_a}$$

Où:

t_s : Temps de résidence ; V_t : Volume total du réacteur incluant le décanteur ; D_a : Débit de l'alimentation.

Par contre le temps de contact est calculé en fonction des hauteurs du garnissage de chaque granulométrie, d'où il est calculé comme suit :

$$t_c = \frac{V_{lit}}{D_a}$$

Où:

t_c : Temps de résidence ; V_{lit} : Volume du garnissage ; D_a : Débit de l'alimentation.

Le taux de dilution hydraulique D (heure⁻¹) est le rapport du débit d'alimentation Q (L.heure⁻¹) sur le volume utile du réacteur (V).

$$D = \frac{Q}{V}$$

L'évolution des différentes fermentations est évaluée par la mesure du pH , l'évolution de la biomasse, le dosage d'éthanol et le dosage de l'acidité dornic en fonction du temps.

III.3.7 Suivi de la production

III.3.7.1 Evolution du pH

Le suivi de l'acidité est effectué par la mesure du pH des échantillons prélevés dont la sonde du pH mètre de type Hanna est mise directement dans la solution.

III.3.7.2 Evolution de la biomasse

L'évolution de la biomasse en fonction du temps a été déterminée par la mesure de la densité optique à 600 nm (Akretche *et al.*, 2019). En parallèle, pour estimer le

développement des levures au cours de l'incubation des cultures pures, nous avons employé la méthode des dénombrements sur gélose Sabouraud.

Le dénombrement bactérien lactique nécessite une ou plusieurs dilutions décimales. Toutes les colonies présentes sur le Pétri sont dénombrées à l'aide d'un stéréomicroscope et d'une source lumineuse à fibre optique. La technique des comptes de surface permet de connaître le nombre d'unités prélevées pouvant former une colonie (UFC).

III.3.7.3 Dosage de l'éthanol

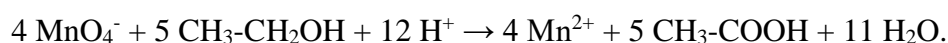
La détermination de la teneur en bioéthanol dans la solution de fermentation a été réalisée par permanganate (MnO_4^-). Cependant, l'étape de distillation était nécessaire pour séparer l'éthanol et éviter le titrage d'autres composés. Le bioéthanol ainsi recueilli a été mis à réagir avec une solution de permanganate 0,1 M en présence d'acide sulfurique (H_2SO_4 1 M). Un titrage en retour avec une solution de permanganate d'acide oxalique (0,1 M) a permis de déterminer la teneur en bioéthanol (Ayadi *et al.*, 2022).

Le dosage de l'éthanol est réalisé selon le protocole décrit par Negro *et al.* (Negro *et al.*, 2017). Un volume de 10 ml de prélèvement a été distillé: ces prélèvements sont versés dans un ballon, puis porté à l'ébullition. L'échantillon renferme de l'eau de l'alcool, du sucre et de nombreux autres constituants; l'alcool s'évapore en premier à $T = 78,4^\circ\text{C}$ et le distillat est récupéré.

Une quantité de 1 ml de milieu fermenté a été prélevée et complétée ensuite avec de l'eau distillée afin d'obtenir 10 ml d'une solution (S_1). Cette solution (S_1) contient donc tout l'éthanol présent dans les 1 ml de milieu prélevé. L'éthanol ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{OH}$) est ensuite oxydé en acide acétique ou éthanoïque par une solution de permanganate de potassium.

Dans un erlenmeyer, 10 ml (V_1) de la solution (S_1) a été mélangé et environ 10 ml (V_2) d'acide sulfurique concentré. Cette solution incolore est dosée avec une solution de permanganate de potassium ($\text{K}^+ \text{aq} + \text{MnO}_4^- \text{aq}$) violette de concentration $8,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol/L}$ (C_2).

Considérant que l'éthanol ne s'évapore pas lors du dosage, On obtient un changement de couleur de la solution est obtenue pour un volume de permanganate de potassium versé. L'équation de la réaction totale de dosage est :



La relation entre la quantité de matière n_1 d'éthanol du prélèvement de la solution S_1 et la quantité de matière n_2 d'ion permanganate versés à l'équivalence: 1 mol d'ion permanganate réagit avec $5/4 = 1,25$ mol d'alcool; n_2 mol d'ion permanganate réagit, avec $n_1 = 1,25 n_2$ mol d'alcool.

De plus : $n_2 = C_2 V_2$ d'où : $n_1 = 1,25 C_2 V_2$

V_0 : le volume d'éthanol contenu dans les 1 ml d'où: $V_0 = m_0/\rho_0$

ρ_0 : masse volumique de l'éthanol ; $\rho_0 = 0,78 \text{ g/ml}$.

III.3.7.4 Dosage de l'acidité Dornic

Le degré Dornic est une unité de mesure d'acidité des margines, Selon la méthode Dornic, le titrage se fait à l'aide d'une solution de soude à N/9 (0,111 mol/L) et de phénolphthaléine en solution alcoolique à 2% employée comme indicateur.

On prélève 10 ml de chaque culture choisie, on y ajoute deux gouttes de phénolphthaléine et on verse la soude goutte à goutte jusqu'à obtenir une couleur rose pale.

1 °D correspond à 0,1 g d'acide lactique par litre de lait. Parfois on utilise le degré Soxhlet-Henkel (°SH) ou le degré Thörner (°Th).

- $2,25 \text{ °D} = 1 \text{ °SH} = 2,5 \text{ °Th}^1$
- $1 \text{ °SH} = 0,225 \text{ g d'acide lactique par litre de lait}$
- $1 \text{ °Th} = 0,09 \text{ g/L}$
- $1 \text{ °D} = 0,1 \text{ g/L}$

III.4 Résultats et discussion

III.4.1 Composition physicochimique des margines

Pour la détermination de la composition physicochimique, nous avons jugé intéressant de déterminer seulement les composés qui pourraient avoir un rôle dans la fermentation ultérieure (voir chapitre II, Tableau II.2).

L'indice de biodégradabilité (Ib) exprimé par le rapport DCO/DBO₅ des échantillons est égal à 26 qui est plus que 9 fois supérieur au seuil limite de biodégradabilité qui est égal à 3. Ces margines présentent une charge organique élevée, elles sont partiellement biodégradables. A cet effet, des dilutions des margines ont été réalisées afin d'optimiser les facteurs physicochimiques notamment :

- pH ;
- Couple composition minérale (NaCl) ;
- Conductivité électrique ;
- Intensité de la couleur noire très sombre qui est due aux réactions d'autooxydation et de polymérisation qui transforment les alcools phénoliques en acides phénoliques ;
- Prédominance de substances toxiques notamment les composés phénoliques qui sont des substances organiques cycliques très variées et que leur solubilisation selon la littérature

dans l'huile est inférieure à celle dans les eaux de végétation, ce qui explique leur concentration élevée dans les margines.

Pour le choix de dilutions des margines brutes, les résultats ont montré que plus le pourcentage de dilution des margines par l'eau distillée augmente, plus le pH augmente d'un pH acide à un pH neutre. Les dilutions 0 et 25% ont montré un pH acide du mélange qui n'est pas convenable pour le développement bactérien lactique. Les dilutions 75% et 100% par l'eau distillée favorisent un pH convenable pour le développement mycélien uniquement.

Par contre la dilution à 50%, elle a favorisé un pH convenable pour la croissance de bactéries lactiques et *Saccharomyces cerevisiae* représentante des 23 isolats sélectionnés. Cette valeur a été retenue pour la dilution des margines brutes.

III.4.2 Production de l'éthanol

Le choix de rechercher des levures notamment le genre *Saccharomyces* sp. pour la production de l'éthanol revient aux avantages de l'espèce *S. cerevisiae* utilisée pour l'éthanol car elle présente de nombreux avantages comparée aux autres microorganismes. Elle est tolérante aux fortes concentrations en éthanol, en sucres et en ions (Lin *et al.*, 2006) et peut fermenter à des pH acides de 3 à 4 (Bai *et al.*, 2008). L'utilisation de *S. cerevisiae* dans de telles conditions permet ainsi de limiter le risque de contamination. La taille de la levure permet de la séparer facilement du milieu de fermentation, par filtration ou centrifugation, et ainsi de la recycler pour une nouvelle fermentation (Ballerini, 2006). *S. cerevisiae* est considéré comme non dangereuse pour la santé humaine (organisme GRAS pour *Generally Recognized As Safe*).

III.4.2.1 Etude des caractéristiques culturelles des levures

L'examen macroscopique des cultures levuriennes après incubation à 25 °C pendant 4-5 jours montre des colonies crémeuses (Figure III.18), généralement bien isolées, de couleur blanchâtre, crème ou parfois jaunâtre et à contour irrégulier et opaque. Par ailleurs, les colonies des isolats sont lisses et caractérisées par des tailles moyennes, cependant, certains isolats présentent une odeur intense.

L'observation microscopique nous a permis d'authentifier la forme cellulaire des isolats isolés et leurs modes de reproduction végétative. Les isolats sont sphériques, de forme allongée ou courte (Figure III.18), et présentent par ailleurs, différents modes de reproduction végétative (monopolaire et bipolaire même multipolaire). Certains isolats et après bourgeonnement, les cellules filles restent associées les unes aux autres et donnent des chaînettes appelés pseudomycéliums. Par contre, il a été noté quelques isolats présentant des

allongements importants des cellules et l'hyphe ainsi formées prolifèrent par des croissances apicales. Ce sont des mycéliums. Par conséquent, les isolats peuvent être des *Candida* sp., et / ou *Saccharomyces* sp.

A cet effet, nous avons sélectionné 23 isolats parmi eux qui sont caractérisés par des formes ovoïdes et propagent par bourgeonnement monopolaire. L'uniformité des cellules obtenues après isolement confirme la purification parfaite des isolats étudiés. Ces isolats appartiennent au genre de *Saccharomyces* sp.. Selon Jean-Paul (Jean-Paul, 1997), les levures se présentent sous forme de cellules uniques libres indépendantes ou associées deux à deux ayant une morphologie caractéristique variée qui peut être sphérique, ovoïde, cylindrique, apiculé en bouteille ou pyramidale.

Les levures non *Saccharomyces* poussent bien pendant les stades précoces de la fermentation, lorsque la concentration d'éthanol est encore faible, étant remplacé plus tard par les levures *Saccharomyces* qui sont plus tolérantes à l'éthanol et plus concurrentielles pour la croissance dans les milieux.

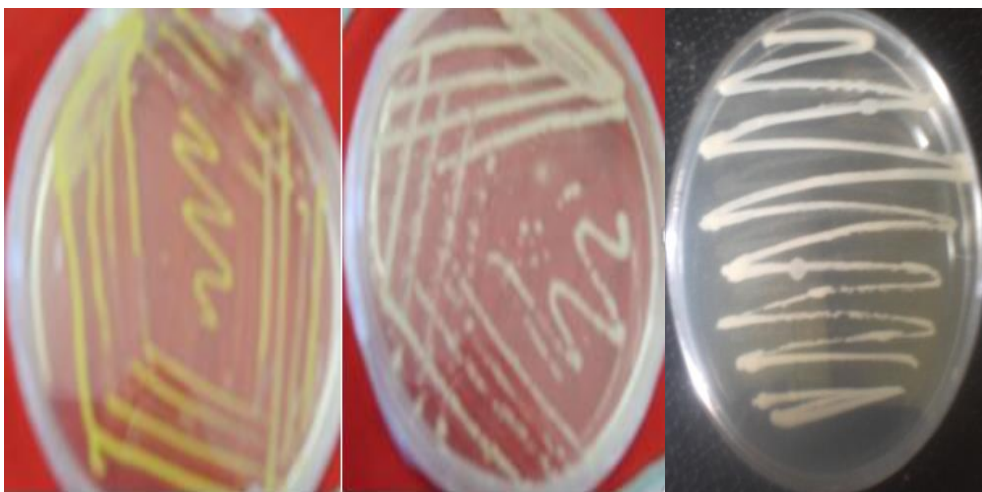


Figure III.18: Aspect de quelques colonies fongiques sur milieu Sabouraud.

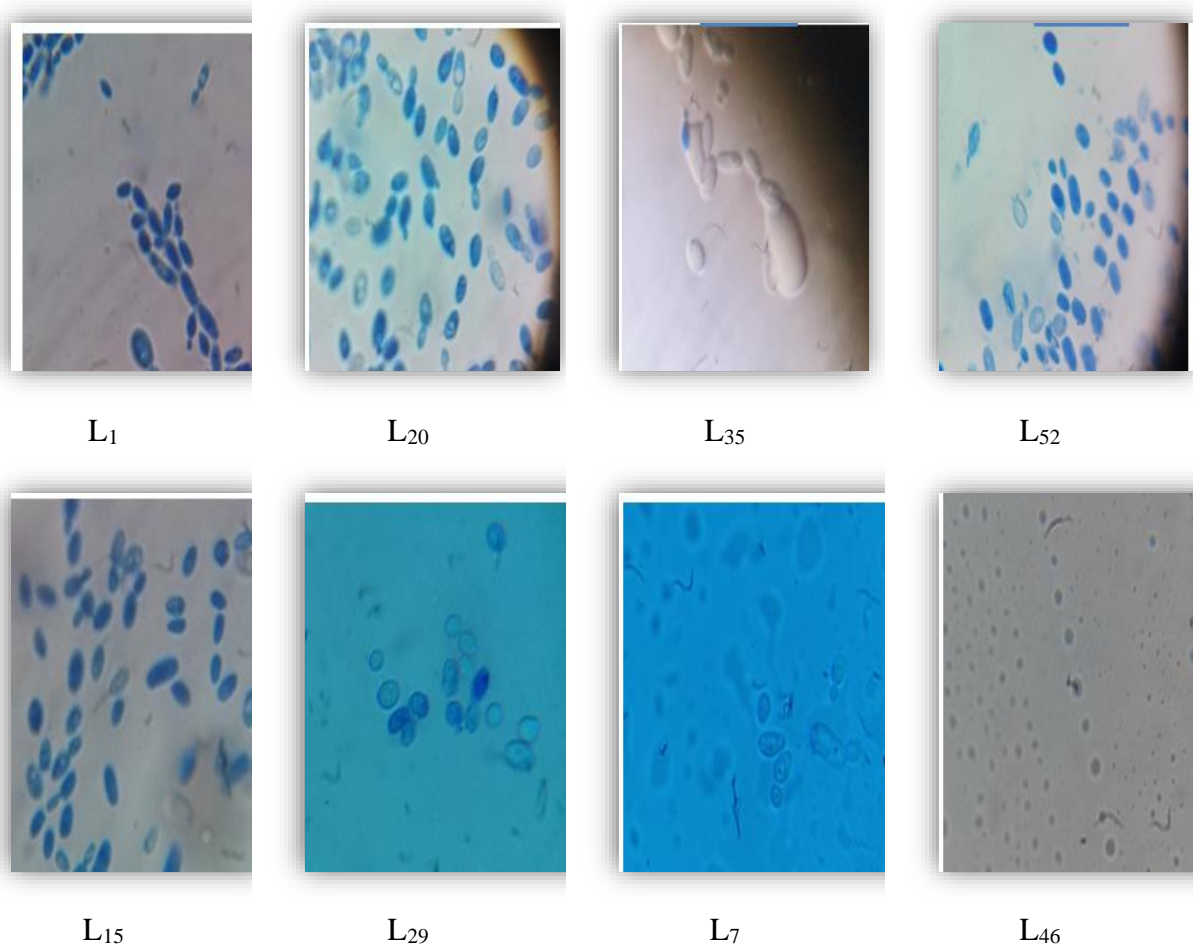


Figure III.19: Quelques exemples de souches levuriennes vue microscopique
(Gx100)

III.4.2.2 Vérification de l'adhésion des levures sur les deux supports

L'adhésion de l'isolat choisi sur les supports pouzzolane et Os bovin à granulométries entre 0,4 et 0,6 mm respectivement est différente d'un support à un autre.

Les résultats obtenus sont représentés sur les Figures III.20 et III.21 Celle-ci montre l'évolution des biomasses des différentes cultures à 30 °C en fonction du temps de rétention cellulaire fixé à 18, 24, 48 et 72 heures sur les différentes granulométries de pouzzolane et l'os bovin dans les deux milieux.

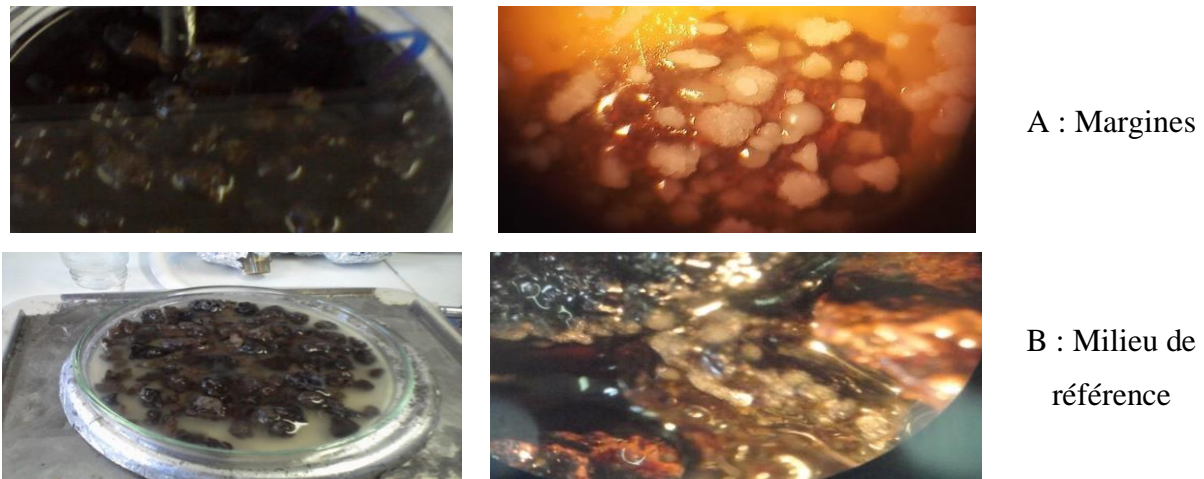


Figure III.20: Fixation des levures sur pouzzolane (Sous loupe binoculaire).

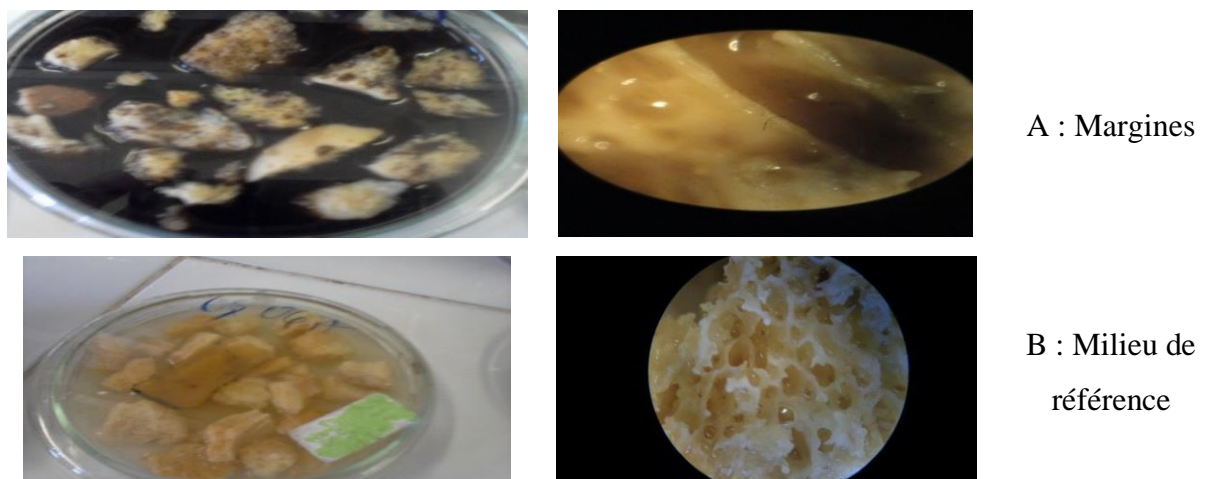


Figure III.21 : Observation de fixation des levures sur l'os bovin (Sous loupe binoculaire).

III.4.3 Etude cinétique

Pour les essais d'optimisation de la production de l'éthanol par les isolats levuriennes, le suivi a été réalisé en fin de culture, en effectuant une analyse du milieu au temps zéro (t_0) et une analyse en fin de culture (5 jours) sans prélèvement intermédiaire.

Le milieu des margines a été dilué 10 fois (MMD10). Le choix de ce taux de dilution est basé sur des essais préliminaires dans lesquels nous avons utilisé des taux 2 à 10 fois. Les résultats préliminaires après culture des 23 souches sur MMD10 ont montré une production du gaz mais à des volumes différents d'un isolat à un autre comparativement à leur culture dans le milieu de référence à savoir bouillon Sabouraud (BS).

III.4.3.1 Evaluation de la production du gaz en mode statique

La production du gaz diffère entre une souche et une autre. Nous avons constaté qu'il y a des tubes où le piston de la seringue monte rapidement. Les courbes suivantes (Figure III.22 et Figure III.23) montrent la quantité du gaz dégagé par les isolats durant la fermentation dans les conditions suivantes :

- Age d'inoculum : 24 - 72 heures ;
- Température d'incubation : 30 °C ;
- Milieux d'essais : Sabouraud et margines ;
- Durée de la fermentation : 5 jours ;
- Densité optique de toutes les souches : 0,7 ;

D'après la Figure III.22, les courbes de la cinétique de production du gaz par les 23 isolats de *Saccharomyces* sp. avaient un même profil présentant une phase exponentielle d'une durée de 3 jours (J_0 à J_3) est directement observée durant la cinétique de croissance de toutes les souches. La croissance passe directement dans une phase de déclin qui persiste durant un jour (J_4), de J_4 à J_5 une stabilisation a été notée.

Il faut noter que le maximum de production du gaz (28 ml) a été avec l'isolat S_4 suivi par 26 ml pour la souche S_6 et 23 ml par S_7 . Par contre le minimum de production a été noté pour la souche S_{23} (1,5 ml).

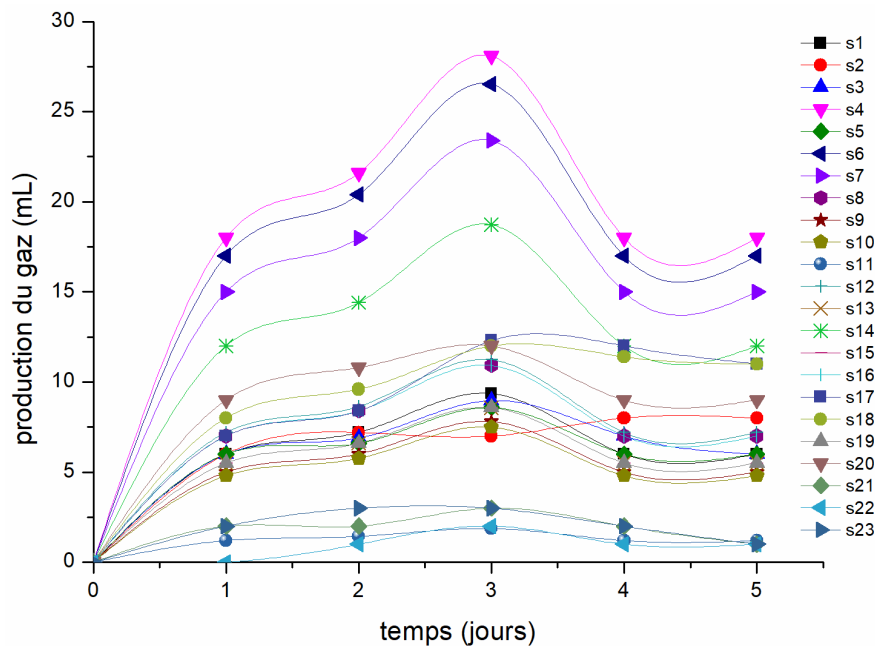


Figure III.22: Evolution de la production du gaz par 23 isolats levuriens à 30±2 °C dans le bouillon Sabouraud.

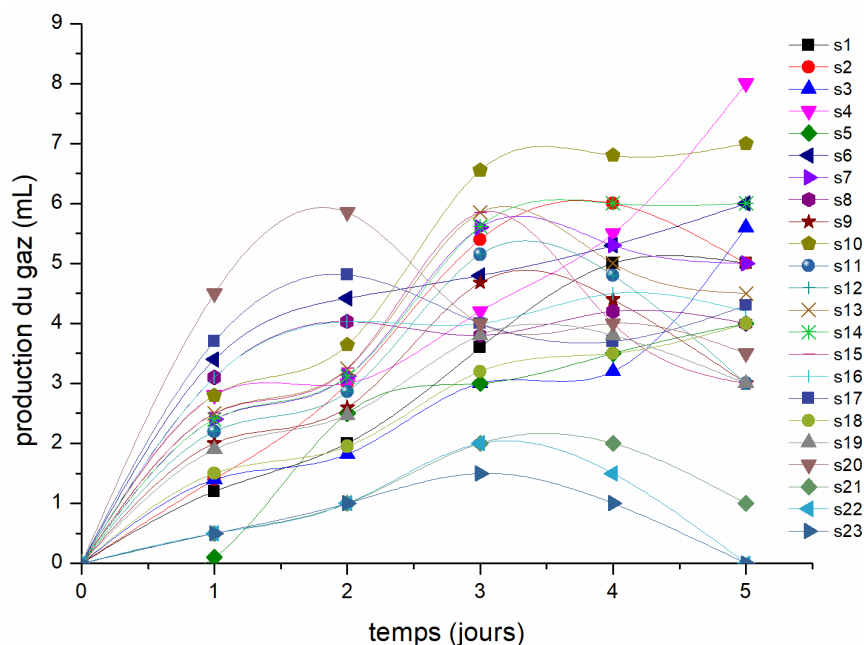
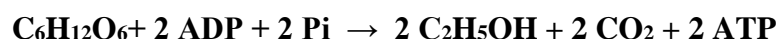


Figure III.23: Evolution de la production du gaz par 23 isolats levuriens à 30 ± 2 °C dans les margines.

La Figure III.23 montre que les courbes de tendance de la cinétique de production par les 23 isolats prennent exactement la même allure de J_0 au J_2 sauf qu'au-delà du 2^{ème} jour, il est noté une phase de déclin commençant par les isolats S_3 et S_{20} jusqu'au dernier jour (J_5). Pour les autres souches, une légère production du gaz persiste entre J_2 et J_3 dont ce dernier représente l'optimum de production sauf pour les isolats S_4 , S_6 , S_7 , S_{14} , S_{17} et S_{18} qui continuaient à produire le gaz jusqu'au J_5 .

La production maximale du gaz dans les margines était faible, dont la valeur maximale était au 5^{ème} jour de fermentation 8 ml pour S_4 , suivi par 7 ml pour S_6 et 6 ml pour S_7 et S_{14} (Figure III.23).

Les résultats ont montré que la production du gaz dans le milieu Sabouraud est plus rapide que celle dans les margines, et cela parce que le milieu Sabouraud est riche en glucose qui est utilisable directement par les levures pour la formation de l'éthanol et de CO_2 selon la réaction suivante (Assemany *et al.*, 2019):



Il est noté qu'il y a certains points communs entre les isolats dans les deux milieux de culture à savoir l'absence d'une phase de latence et d'une phase stationnaire. L'absence de la phase de latence peut être expliquée par le fait que les précultures soient menées dans les mêmes conditions que les cultures et qu'elles étaient prises en phase exponentielle de croissance. L'absence de la phase stationnaire est un phénomène qui a déjà été observé plusieurs fois chez les levures en mode batch (García *et al.*, 2014).

La production du gaz dans le milieu Sabouraud commence rapidement car il est riche en glucose qui est un substrat préféré pour les levures (Hissein *et al.*, 2019). Puisque le glucose est la seule source d'énergie qui existe dans le milieu Sabouraud, la production de gaz s'arrête plus vite après son épuisement. Dans les margines, les levures prennent aussi les mêmes allures d'évolution de celles du Sabouraud bien que les margines sont pauvres en glucose.

Pour la fermentation du glucose ou du mannose, sa voie métabolique utilise un processus bien connu pour produire de l'énergie dans le monde du vivant, la glycolyse (ou voie d'Embden-Meyerhof-Parnas), qui permet d'obtenir deux moles de pyruvate et deux moles d'adénosine-5'-triphosphate (ATP, molécule fournissant l'énergie dans les organismes vivants) à partir d'une mole de glucose ou de mannose. Le pyruvate est ensuite réduit en éthanol et glycérol dans des proportions variables (Otterstedt *et al.*, 2004).

L'étude de Sounni *et al.* a montré que les levures représentent le groupe microbiologique le plus diversifié en genre et en densité et le plus adapté *vis à vis* de ce milieu pollué (Sounni *et al.*, 2018). Ceci suggère qu'il y a une corrélation entre leur croissance et leur métabolisme. L'étude de l'activité de l'enzyme catalase chez les levures les plus performantes *vis à vis* de la dégradation des composés phénoliques des margines, montre clairement que cette enzyme est hautement exprimée dans les conditions d'induction par l'acide oléique qu'en présence de glucose.

III.4.3.2 Fermentation en discontinu

Pour ce suivi, la souche S4 la plus performante en production de gaz dans les deux milieux a été sélectionnée. Ce choix a été fait en tenant compte des résultats obtenus lors des études réalisées précédemment et qui ont démontré que les cinétiques de production de gaz par la souche de *Saccharomyces* sp. sélectionnée ont été menées en conditions initiales de son biotope c'est-à-dire non contrôlées et sans agitation.

En plus, cette souche n'a pas connu une phase de déclin ce qui suggère qu'elle a utilisé probablement l'éthanol comme substrat après l'épuisement de la source de carbone en diauxie (Otterstedt *et al.*, 2004) puisque la production d'éthanol s'accompagne par la libération du CO₂, traduit par le dégagement du gaz.

- **Mode batch à cellules libres**

Pour avoir plus d'informations sur la souche sélectionnée, nous avons étudié les paramètres suivants : pH, densité optique, dénombrement cellulaire et production de l'éthanol durant la fermentation en mode batch à cellules libres dans les deux milieux d'essais avec les conditions de fermentation fixées comme suit :

- Age d'inoculum : 24 et 72 heures ;

- Température d'incubation : 30 °C ;
- Milieux d'essais : MMD10 et BS ;
- Agitation : 100 trs/min ;
- *pH* non contrôlé ;
- Durée de la fermentation : 96 heures.

Dans le bouillon Sabouraud (BS), les résultats indiqués sur la Figure III.24 montrent les évolutions du *pH*, de la biomasse et de la production d'éthanol.

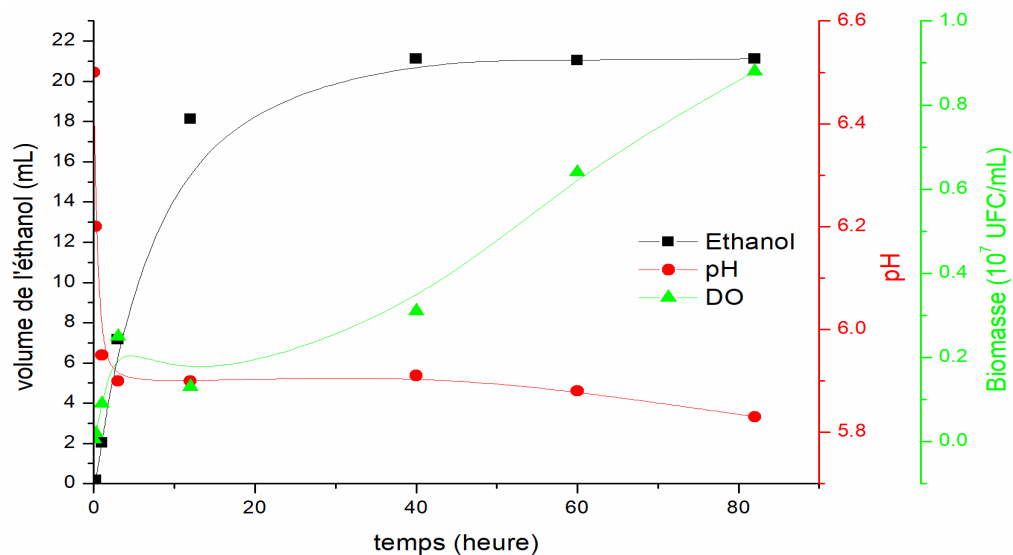


Figure III.24 : Evolution de la biomasse, *pH* et production d'éthanol en fermentation batch à cellules libre dans BS à 30 ± 2 °C, *pH* non contrôlé, 100 trs/min

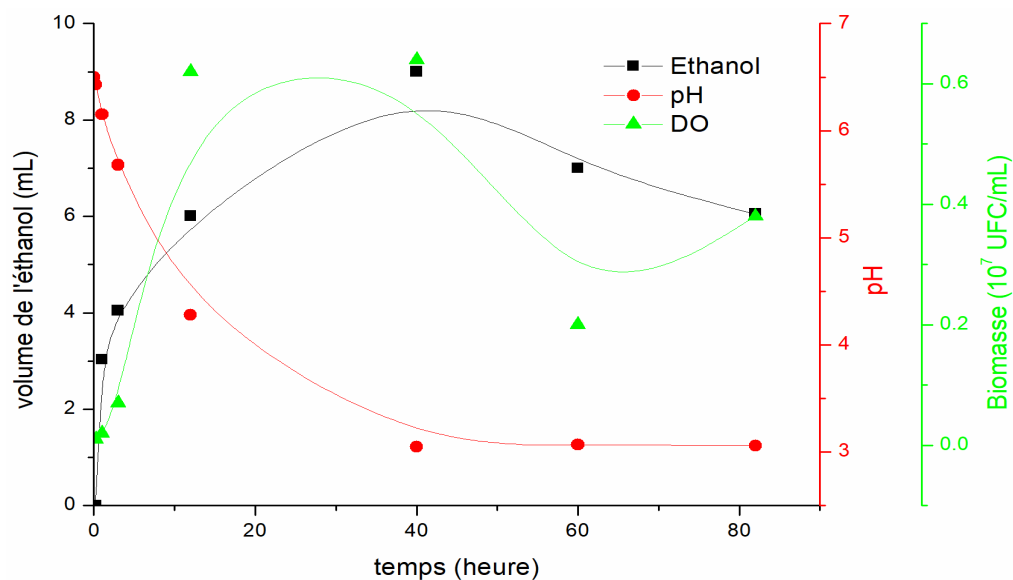


Figure III.25: Evolution de la biomasse, *pH* et production d'éthanol en fermentation batch à cellules libre dans le milieu MMD10 à 30 ± 2 °C, *pH* non contrôlé, 100 trs/min.

Le milieu Sabouraud est un milieu synthétique contenant 20 g de glucose, il a donné une bonne croissance et une bonne production d'éthanol avec la souche S₄. La croissance passe directement dans une phase de déclin qui persiste jusqu'à 13 heures (avec une légère stabilisation entre 13-20 heures) puis en diauxie passe en phase longue exponentielle jusqu'aux dernières heures de fermentation. Il faut noter qu'après 40 heures la production de l'éthanol a atteint son optimum 21 ml. Le pH initial n'a pas varié au cours des différentes phases. Il est passé de 6,2 pH de départ à 5,84 pH final.

Dans les margines diluées 10 fois (MMD10), les résultats indiqués sur la Figure III.25 montrent les évolutions du pH, de la biomasse et la production d'éthanol.

D'après les résultats montrés sur la Figure III.25, une faible évolution de concentration en éthanol produit a été notée à partir de 1 heure de fermentation jusqu'à 40 heures d'où une quantité de 8,5 ml/L a été enregistrée. La biomasse comportait une première phase de latence de 1 heure, une phase de croissance qui a duré 19 heures, une phase stationnaire de 10 heures, une phase de déclin de 30 heures, une deuxième phase de latence qui a duré 5 heures et une deuxième phase de croissance. Le pH diminue durant toutes les phases de croissance de 6,4 à 3,05.

L'amélioration de la production et de la conversion a été enregistrée avec l'agitation en mode batch que ce soit avec cellules libres ou fixées (Ayadi *et al.*, 2022b). D'après les résultats, nous avons remarqué que dans le cas de MMD10, le pH diminue. Cette baisse pourrait être expliquée par une production des acides pyruviques qui sont des précurseurs d'éthanol. Donc, ce qui donne un caractère d'acidité au milieu de fermentation (Lanza *et al.*, 2020). Aussi, la baisse du pH observée lors du suivi des essais de fermentation, témoigne d'une activité microbienne, source de production des composés acides (Ventura *et al.*, 2019). Ces derniers semblent avoir un effet inhibiteur de la croissance cellulaire en provoquant une diminution de la production de biomasse (Giannattasio *et al.*, 2005). Ce qui peut justifier la faible production du bioéthanol.

Pour le BS, la stabilisation du pH au niveau des différents essais pourrait correspondre à l'épuisement du milieu en sucres fermentescibles ou à la saturation des milieux par des métabolites secondaires susceptibles d'inhiber la croissance des levures ou de ralentir leur activité fermentaire (Novidzro *et al.*, 2013). Aussi, Ouédraogo *et al.* (Ouédraogo *et al.*, 2012) ont montré que la croissance de *Saccharomyces cerevisiae* est optimale à pH=5.

La baisse de la densité observée pour les différents essais est due à une perte de matière (sous forme de gaz carbonique) lors de la fermentation alcoolique (Tra Bi *et al.*, 2019) et à la transformation des sucres en bioéthanol (Sarris *et al.*, 2013).

- **Fermentation en discontinue batch à cellules immobilisées**

Pour les cellules immobilisées sur support pouzzolane et os bovin, les conditions de fermentation sont fixées comme suit:

- Age d'inoculum: 18 et 24 heures ;
- Granulométrie de la pouzzolane et de l'os bovin : 0,4- 0,6 mm ;
- Température d'incubation: 30 °C ;
- Agitation : 100 trs/min ;
- *pH* non contrôlé ;
- Durée de la fermentation : 92 heures.

Les résultats indiqués sur la Figure III.26 montrent les évolutions du *pH*, de la biomasse, et production de l'éthanol dans les milieux d'essais BS et MMD10 en batch à cellules immobilisées sur pouzzolane et os bovin.

- **Mode discontinu à cellules immobilisées**

D'après les Figures III.26 et III.27, les différentes fermentations en batch à cellules immobilisées sur la pouzzolane et l'os bovin ont donné les meilleures productions en éthanol en milieu de référence à savoir le BS comparativement avec le MMD10. Il est à noter que la production de bioéthanol est meilleure avec le mode immobilisé quel que soit le support comparativement avec le mode batch à cellules libres. Les systèmes d'immobilisation comparativement aux systèmes à cellules libres, permettent d'augmenter la productivité grâce aux opérations en continu (Ayadi *et al.*, 2022). Ce qui explique la forte production en éthanol dans la fermentation à cellules immobilisées par rapport à l'immobilisation à cellule libre dans les deux milieux.

Selon la Figure III.26 et sur le support pouzzolane, la production de l'éthanol suit une dynamique en trois phases distinctes dans les deux milieux (BS et MMD10). Le profil de la courbe est composé d'une 1^{ère} phase exponentielle, suivie d'une phase stationnaire, une 2^{ème} phase exponentielle et une phase de déclin.

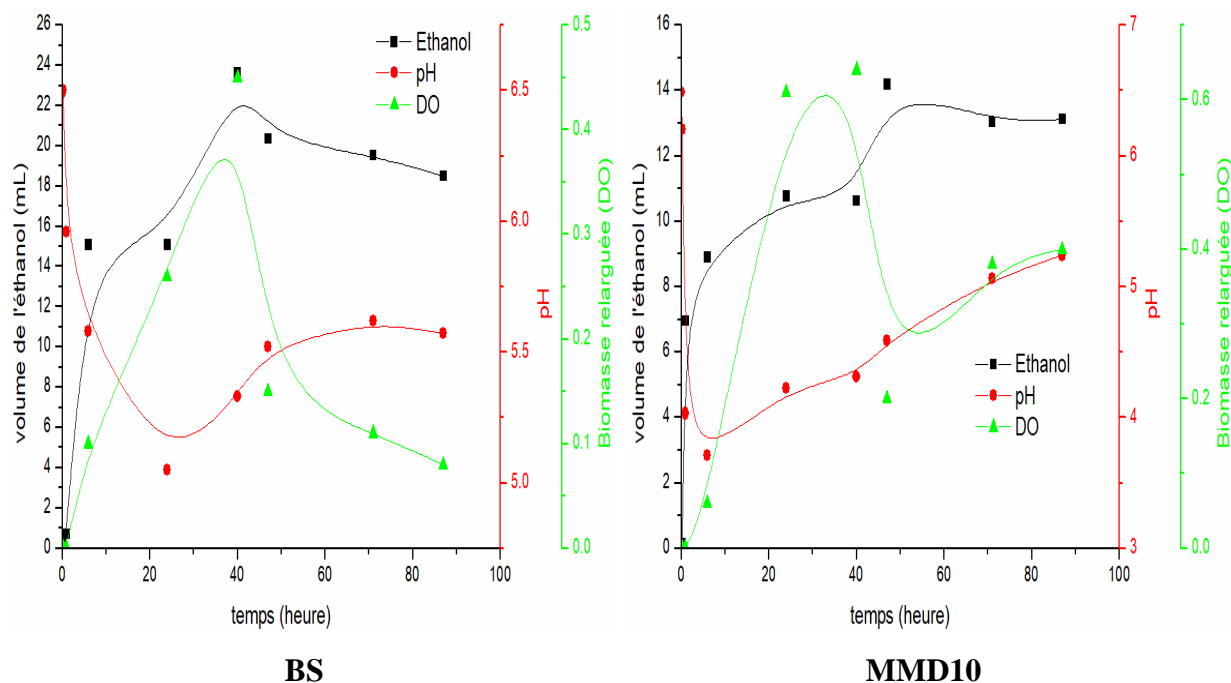


Figure III.26: Evolution de la biomasse, pH et production d'éthanol en fermentation batch à cellules immobilisées sur pouzzolane à 30 ± 2 °C, pH non contrôlé, 100 trs/min dans BS et MMD10

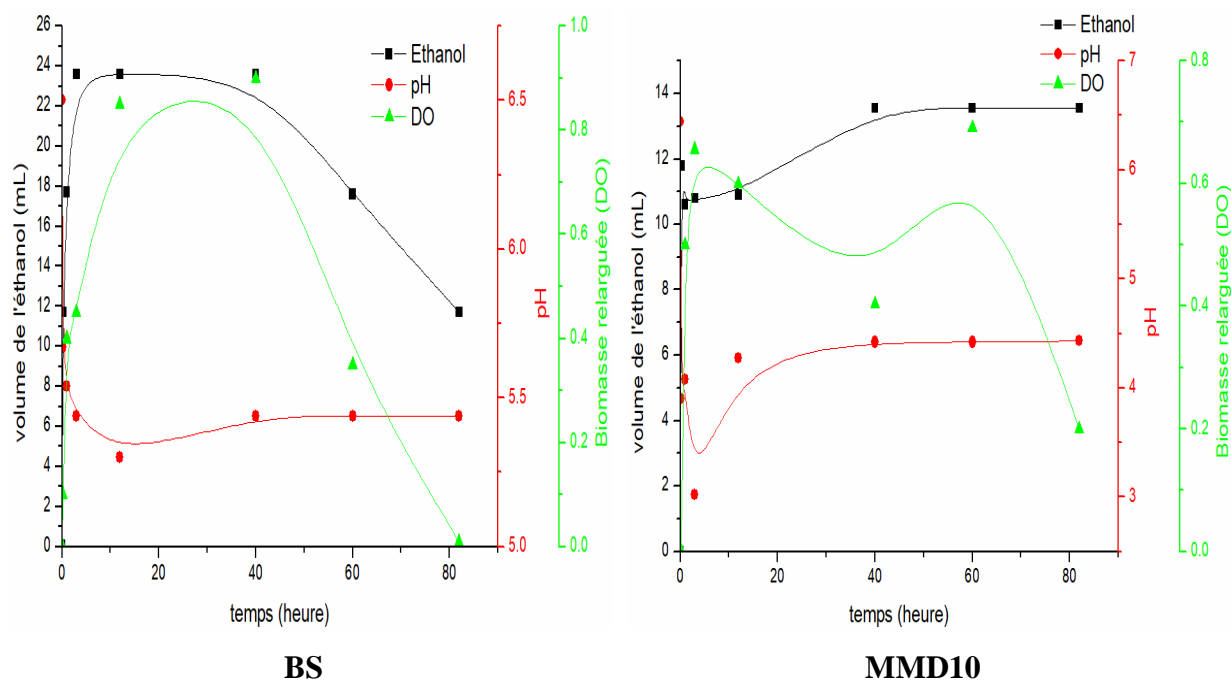


Figure III.27: Evolution de la biomasse, pH et production d'éthanol en fermentation batch à cellules immobilisées sur os bovin à 30 ± 2 °C, pH non contrôlé, 100 trs/mn dans BS et MMD10

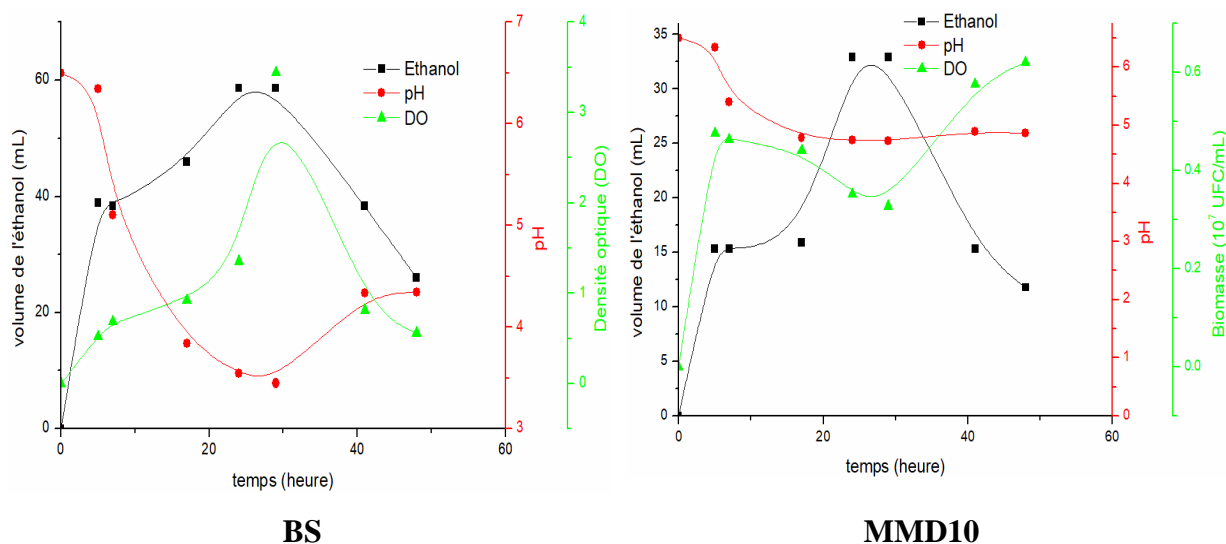


Figure III.28: Evolution de la biomasse, *pH* et production d'éthanol en fermentation continue à cellules immobilisées sur Pouzzolane dans Sabouraud à 30 ± 2 °C, *pH* non contrôlé dans BS et MMD10

Dans le milieu de référence BS, une forte production d'éthanol soit $15,07 \pm 0,50$ ml/L après 1 heure de fermentation a été notée. L'éthanol continue à augmenter jusqu'à $23,61 \pm 0,45$ après 24 heures de fermentation puis diminue jusqu'à $18,5 \pm 0,40$ après 66 heures de fermentation. Par contre dans le MMD10, une production de $6,96 \pm 0,10$ ml/L d'éthanol a été notée après 1 heure de fermentation, $8,90 \pm 0,10$ ml/L d'éthanol après 2 heures de fermentation, arrivé à son optimum après 48 heures avec une production de $14,19 \pm 0,80$ ml/L d'éthanol. La production diminue après 60 heures de fermentation et l'éthanol se stabilise à $13,12 \pm 0,88$ ml/L.

En ce qui concerne le *pH*, ce dernier connaît 2 phases dans les deux milieux : une diminution brute puis une augmentation lente. Dans le BS, le *pH* passe de $6,5 \pm 0,1$ à $5,37 \pm 0,5$ après 24 heures de fermentation puis il commence à augmenter jusqu'à un *pH* aux alentours de $5,6 \pm 0,4$ après 72 heures de fermentation. Une stabilisation de *pH* a été constatée au-delà de 72 heures.

Sur le support os bovin (Figure III.27), le profil de la courbe de la production de l'éthanol est composé de trois phases distinctes dans le milieu BS (exponentielle, stationnaire et déclin) et 2 phases dans le MMD10 (exponentielle et stationnaire).

Les résultats notés pour le support os bovin montrent ce qui suit :

Dans la première 1 heure de fermentation, la production de l'éthanol a été de $11,7 \pm 0,3$ ml/L dans le milieu BS. La production d'éthanol atteint son optimum soit $23,59 \pm 0,45$ ml/L. Ce dernier se stabilise jusqu'à 40 heures de fermentation suivi d'une diminution jusqu'à 80 heures de fermentation aux alentours de $10,5 \pm 0,2$.

Dans le milieu MMD10, une production d'éthanol de $10,79 \pm 0,30$ à $13,56 \pm 0,40$ ml/L a été observée de 1 heure à 40 heures de fermentation. Après cette période jusqu'au-delà 80 heures, la production de $13,56 \pm 0,45$ ml/L d'éthanol se stabilise.

- **Mode continu à cellules immobilisés**

Pour le mode continu à cellules immobilisées, le choix du support pouzzolane uniquement pour les fermentations des deux milieux par la levure S₄ a été basé sur le recyclage du support et son inertie comparativement avec l'os bovin qui est un support organique bien que la production de l'éthanol en mode batch est approximativement la même.

D'après la Figure III.28, les différentes fermentations en continu à cellules immobilisé sur la pouzzolane ont donné les meilleures productions en éthanol en milieu de référence à savoir le BS comparativement avec le MMD10. Les résultats ont montré que les meilleurs taux ont été donnés par le mode continu dans le BS d'où il a été noté $58,66 \pm 0,35$ ml/L contre $32,92 \pm 0,10$ ml/L dans le MMD10 après 24 heures de fermentation.

Les réacteurs à lit fixé présentent également une robustesse et une bonne stabilité vis à vis des chocs organiques, ainsi qu'un recouvrement rapide d'activité après une longue période d'arrêt (Messineo *et al.*, 2020). Ce qui explique la forte production d'éthanol dans ce réacteur *vis-à-vis* des autres réacteurs pré utilisé dans notre expérience.

- **Relargage cellulaire**

D'après les résultats, nous avons remarqué que la biomasse relarguée est presque égale sur pouzzolane et os bovin dans les marges au premier temps (t_0). Dans toutes les fermentations à cellules immobilisées procédées dans les deux modes batch et continu, des fluctuations de relargage cellulaire ont été notées avec le milieu Sabouraud mais elles sont importantes avec la pouzzolane qu'avec l'os bovin. Ces fluctuations de relargage cellulaires sont liées probablement à la présence des polyphénols totaux dans le milieu et à la production des acides organiques et alcool qui peuvent être objet de lyse cellulaire ou résultant de la croissance levurienne ainsi que des effets du cisaillement et des collisions dans les réacteurs agités mécaniquement, provoquent la fuite des levures des cavités ouvertes vers le milieu de culture (Nguyen, 2016). Le relargage cellulaire est à la base du procédé à cellules immobilisées de fabrication de biomasse libre (Lambolei *et al.*, 1997).

Avec le support pouzzolane et le milieu margines, nous avons noté un relargage cellulaire suivant une tendance exponentielle avec une vitesse lente. Cette observation probablement est liée à l'inertie du support pouzzolane et la présence de polyphénols totaux .

III.4.4 Production de l'acide lactique

III.4.4.1 Composition physicochimique du lactosérum

Le Tableau III.5 illustre les caractéristiques physicochimiques moyennes du lactosérum provenant de la laiterie de Sidi Saada sise à Rélizane.

Nous avons constaté que les caractéristiques biochimiques moyennes du lactosérum provenant de la Laiterie de Sidi Saada ne sont pas très différentes de ceux obtenues par Sottiez (Sottiez, 1990). Toutefois, les valeurs sont légèrement inférieures ce qui s'expliquerait par une différence de la composition initiale du lait utilisé. Comme montre le Tableau III.5, le lactose est le constituant le plus important du lactosérum (57,9 g/L), il représente 70 à 72 % de l'extrait sec (Sottiez, 1990).

Tableau III.5: Caractéristiques physicochimiques moyennes du lactosérum.

Facteurs	Lactosérum autoclavé
Teneur en eau (%)	89
pH	5.5
Matière sèche soluble g/L	79
Sucres totaux g/L	76
Protéines g/L	7
Matière grasse g/L	0
Cendre g/L	7
Azote totale g/l	1.12
Chlorures g/l	1.75

III.4.4.2 Isolement et identification de souches lactiques

La caractérisation microbiologique a permis de dévoiler une charge microbienne importante des margines brutes essentiellement les champignons et les levures dont ils sont

d'environ $1,08 \times 10^5$ UFC.ml⁻¹ et $1,7 \times 10^4$ UFC.ml⁻¹ respectivement. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par d'autres auteurs qui ont montré que dans les margines, les levures et les champignons sont capables de s'y développer mieux que les bactéries. Des résultats du dénombrement des germes ont montré l'absence totale de germes (CT/CF, St) donc aucun risque hygiéno-sanitaire n'est posé. La charge microbienne totale est évaluée par le dénombrement de la flore totale aérobie mésophile (FTAM). Elle est relativement faible de ($6,35 \times 10^4$ UFC.ml⁻¹) par rapport à celle enregistrée dans les effluents d'abattoir ($1,23 \times 10^6$ UFC.ml⁻¹).

Les bactéries lactiques sont également présents dans les margines étudiées. La valeur trouvée est de 2,1.102 et 1,4.103 UFC/ml. Leur présence est un témoin de leur résistance en milieu acide. En effet, les BL peuvent se développer même à des pH inférieurs à 4. Cette résistance diminue en fonction du temps et par conséquent leur disparition devient normale avec le temps. Le facteur de disparition est probablement lié à la présence des composés phénoliques.

Le traitement des margines par les micro-organismes semblent être non seulement une solution écologique pour la protection de l'environnement, mais également une voie de leurs valorisations lorsqu'elles sont bio-transformées en produits d'intérêt.

La fonction acidifiante constitue la propriété métabolique la plus recherchée des bactéries lactiques utilisées dans les industries alimentaires. Dans ce contexte, l'identification des isolats lactiques a été effectuée en vue d'évaluer leurs capacités de produire de l'acide lactique sur le MMD10 sans ou supplémenté au lactosérum sous différentes concentrations dans des conditions aéroanaérobies, en tenant compte de l'agitation, la dilution des margines, et leurs immobilisations sur des supports solides à savoir la pouzzolane et l'os bovin.

Dans un premier temps, des tests sur les caractères phénotypiques, physiologiques et biochimiques des souches utilisées ont été effectués.

Les résultats ont montré l'apparition des colonies rondes blanchâtres et de contour régulier sur la surface des géloses MRS et M17. Ces colonies ont été repiquées dans les milieux suscités puis des observations macro et *microscopiques* ont été effectuées. Elles ont subi une coloration de Gram et un test de catalase. Les souches sélectionnées ont conservé le même aspect après plusieurs repiquages : forme ronde, couleur blanchâtre ou peu transparente, contour régulier, lisses et légèrement bombé (Figure III.29 et Figure III.30).

Cette étude, nous a permis d'isoler une flore lactique constituée de 42 souches réparties phénotypiquement comme suit : 17 souches de *Lactobacillus* sp. et de 14 souches de *lactocoques* réparti en 7 isolats de *Lactococcus* sp. et 11 souches de *Leuconostocs* sp. Les

lactobacilles représentent 40,47 % de la flore lactique, les *lactocoques* 33,33 % et 26,19 % de *leuconostocs*.

Puisque le genre *Lactobacillus* est quantitativement le plus important des genres constituant la flore totale des margines, nous avons sélectionné uniquement les *lactobacilles*.

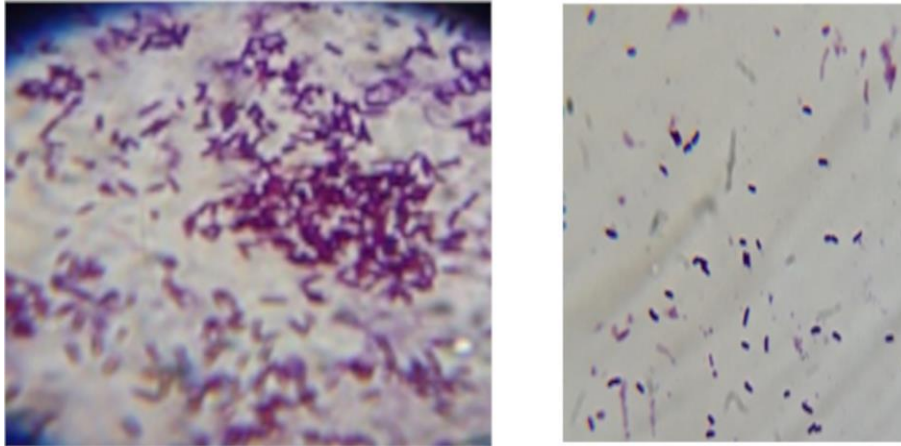


Figure III.29: Aspect microscopique de quelques souches de *lactobacilles* isolées (coloration de Gram) (G× 100)

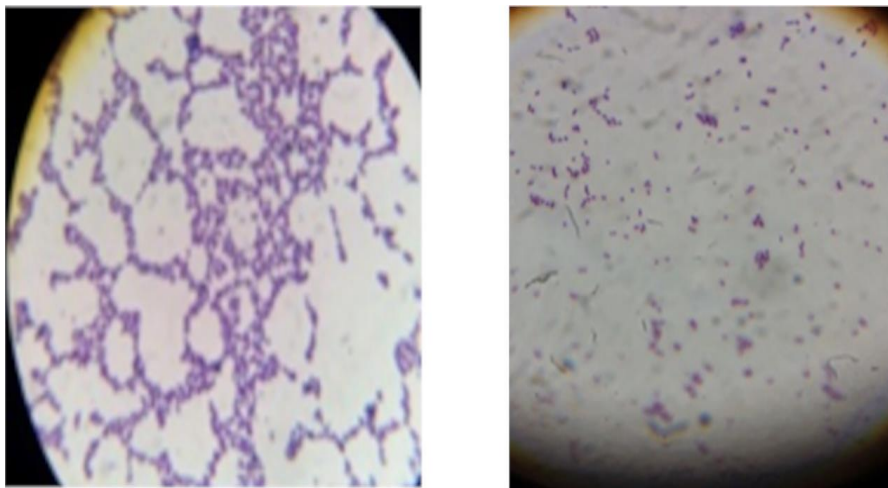


Figure III.30: Aspect microscopique de quelques souches de *lactococcus* isolées (coloration de Gram) (G× 100)

Le Tableau III.7 montre les caractéristiques biochimiques et physiologiques des souches de *Lactobacilles* isolées.

Tableau III.6: Caractéristiques biochimiques, physiologiques des souches de *Lactobacilles* isolées.

Souches	Lb ₁	Lb ₂	Lb ₃	Lb ₄	Lb ₅	Lb ₆	Lb ₇	Lb ₈	Lb ₉	Lb ₁₀	Lb ₁₁	Lb ₁₃	Lb ₁₄	Lb ₁₅	Lb ₁₆	Lb ₁₇
Gram	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxydase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ADH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Type fermentaire	HF	HF	HF	HF	HF	HF	HF	HF	HF	HF	HF	HF	HF	HF	HF	HF
Thermorésistance 15°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
37°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
45°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 4.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pH 9.6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
NaCl 2%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Na Cl 4%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Na Cl 6,5%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Test d'hémolyse	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
ADH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Production de dextrane	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Utilisation de citrate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Production d'acétoïne	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
Activité protéolytique	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Activité lipolytique	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Production d'acide à partir de sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Raffinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+/-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-maltose monohydrate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rhamnus	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
D-mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Acidité (°Dornic)	+	++	+	+	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++	+

(+) résultat positif ou croissance.

(-) résultat négatif ou pas de croissance.

D'après les résultats obtenus des tests biochimiques et physiologiques effectués (Tableau III.6), on a pu donc identifier les 17 souches lactobacilles isolées comme suit:

- *Lactobacilles manihotorans* pour les souches Lb₁, Lb₂, Lb₃, Lb₄, Lb₉, Lb₁₀.
- *Lactobacilles rhamnosus* pour les souches Lb₅, Lb₆, Lb₇, Lb₈, Lb₁₁, Lb₁₂, Lb₁₃, Lb₁₄, Lb₁₅, Lb₁₆, Lb₁₇.

Tous ces résultats concordent avec les conclusions de Chowdhury (Chowdhury, 2012).

III.4.4.3 Etude du pouvoir acidifiant des isolats sur MRS

L'activité acidifiante est l'une des principales fonctions des bactéries lactiques (Béal *et al.*, 2008). Elle a été déterminée en mesurant la quantité d'acide lactique produite par les 17 isolats et le pH du milieu chaque 2 heures (0, 2, 4, 6 24 heures et après 48 heures. Les résultats obtenus ont montré que Lb₂ (*Lactobacillus manihotorans*), Lb₅ et Lb₁₆ (*Lactobacillus rhamnosus*) produisent progressivement de l'acide lactique et que cela s'accompagne simultanément d'un abaissement du pH dans le bouillon MRS (Figure III.31).

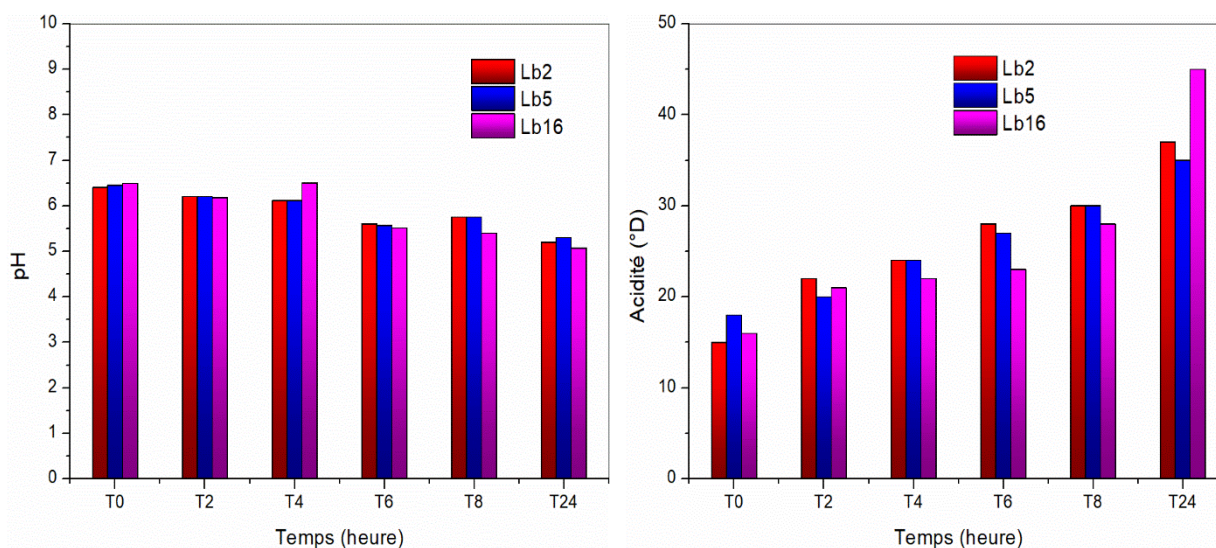


Figure III.31: Evolution du pH et de l'acidité pendant 24 heures à 37 ± 1 °C et à un pH_i 6,5 de trois isolats Lb₂, Lb₅ et Lb₁₆

III.4.4.4 Cinétique de croissance de la souche sélectionnée Lb₁₆ en mode statique

Pour évaluer l'influence de la supplémentation des margines par le lactosérum sur le développement de la souche Lb₁₆, nous avons testé cinq (05) milieux dont deux milieux supplémentés afin de sélectionner la meilleure supplémentation en fonction de l'évolution de la production de l'acide lactique, le pH, et la biomasse. Le Tableau III.7 illustre l'effet des milieux sur la croissance de la souche Lb₁₆, le pH et l'acidité des milieux.

Tableau III.7: Effet des milieux sur la croissance de la souche Lb₁₆, le pH et l'acidité des milieux sélectionnés.

		Croissance (UFC/ml) (x10 ⁷)	pH	Acidité (° Dornic)
MRS	t _{0h}	0.54	6.5	73
	t _{24h}	13	3.45	110
MMD10	t _{0h}	0,49	6,5	10
	t _{24h}	1	6,3	1
Lactosérum	t _{0h}	0,51	6,5	65
	t _{24h}	9	3,55	90
MMD10_{75%}/L_{25%}	t _{0h}	0,66	6,5	30
	t _{24h}	5	3,79	65
MMD10_{50%}/L_{50%}	t _{0h}	0,61	6,5	30
	t _{24h}	2	4,5	45

Selon la Figure III.31 et le Tableau III.7, la meilleure activité acidifiante a été observée chez la souche Lb₁₆ (*Lb. rhamnosus*) avec une acidité égale à 45 °D après 24 heures par rapport aux deux isolats et au milieu de culture composé de 75 % MMD10 et 25 % de lactosérum (MMD10_{75%}/L_{25%}). La croissance a atteint son maximum après 24 heures de fermentation pour les cultures pures. Cette souche mise en culture sur milieu (MRS, lactosérum et MMD10_{75%}/L_{25%}) a marqué des croissances importantes.

III.4.4.5 Cinétique de croissance de la souche sélectionnée Lb₁₆ en mode batch à cellules libres

- **Détermination de la courbe de croissance**

D'après De Roissart, le taux de croissance (μ) se définit comme la vitesse spécifique de croissance (en heure⁻¹), c'est à dire la vitesse de croissance (dx/dt) rapportée à l'unité de biomasse (X) (De Roissart, 1986). Les vitesses spécifiques de croissance et de la production de l'acide lactique en discontinue « batch » ont été déterminées au cours de la phase exponentielle de croissance dans le milieu supplémenté au lactosérum et 100 % MMD10 et MRS. Les conditions de fermentation sont fixées comme suit:

- Age d'inoculum : 18 et 24 heures ;
- Température d'incubation : 37 ± 1 °C ;
- Milieux d'essais : MMD10_{75%}/L_{25%}, 100 % MMD10 et MRS ;
- pH non contrôlé ;
- Durée de la fermentation : 96 heures.

Les résultats indiqués sur la Figure (III.32) montrent l'effet des milieux MRS, MMD10 et MMD10_{75%}/L_{25%} sur la croissance de Lb₁₆ en mode batch discontinu à cellules libres.

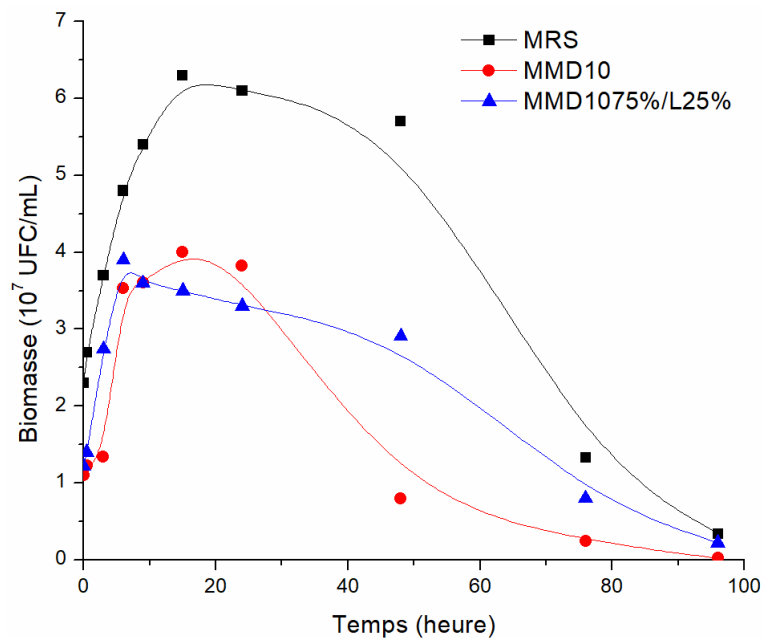


Figure III.32: Effet des milieux MRS, MMD10 et MMD10_{75%}/L_{25%} sur la croissance de Lb₁₆ à 37 ± 1 °C et pH_i 6,5 sous agitation de 100 trs/min en mode batch discontinu à cellules libres.

D'après la Figure III.32, les résultats montrent que la croissance de la souche isolée à partir des margines brutes et identifiée comme *Lactobacillus rhamnosus* était meilleure dans des conditions anaérobies facultatives dans le bouillon MRS par rapport à MMD10 sans ou avec supplément de lactosérum.

III.4.4.6 Evolution du pH et l'acidité Dornic (°D)

La Figure III.33 représente respectivement l'ensemble des résultats initiaux et après l'incubation de 24 heures, l'évolution du pH, de l'acidité Dornic (exprimée en acide lactique) pour les cinq types de cultures et pour une incubation à 37 ± 1 °C.

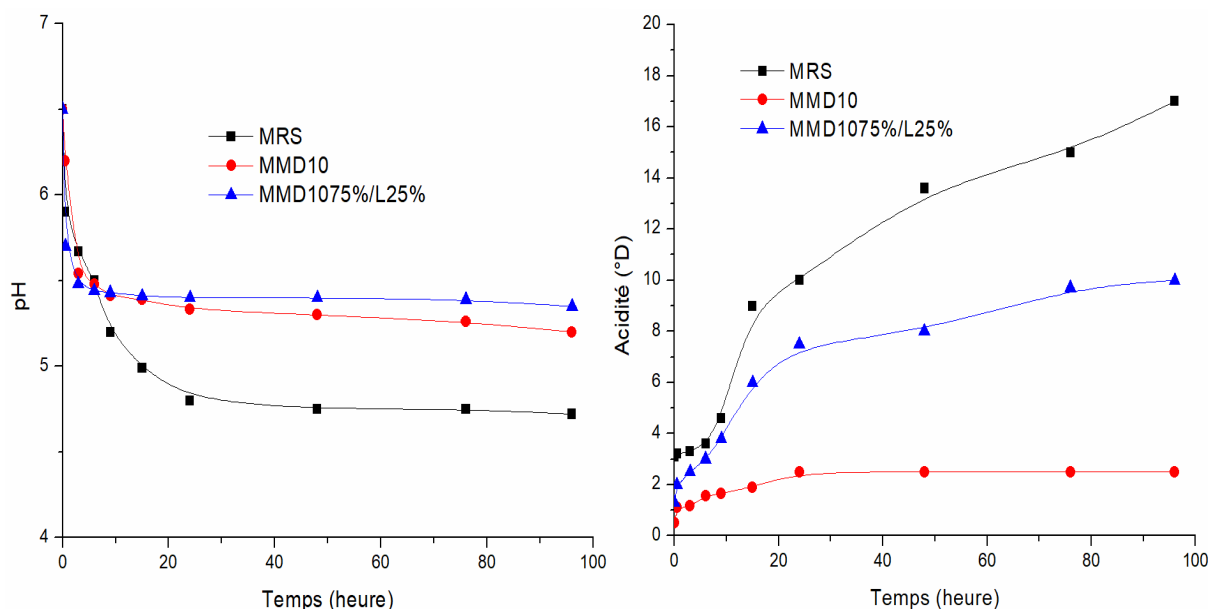


Figure III.33: Effet du milieu sur la production de l'acide lactique et le pH par Lb_{16} à 37 ± 1 °C et à un pH_i 6,5 sous agitation de 100 trs/min dans les milieux MRS, MMD10 et MMD10_{75%}/L_{25%} en mode batch discontinu à cellules libres.

Les courbes montrent les meilleures évolutions sur les milieux (MRS et MMD10_{75%}/L_{25%}.) indiquées dans la Figure III.33. Les résultats obtenus durant la fermentation discontinue à cellules libres en fonction du temps de fermentation et âge de l'inoculum pour les trois milieux montrent que la production élevée de la biomasse, l'acide lactique ont été maximales sur les deux milieux (170 g/L sur MRS et 100 g/L sur MMD10_{75%}/L_{25%}.) dans une zone de pH (4,5-6,5) par rapport au milieu 100% MMD10 (25 g/L).

De plus grandes quantités de cellules *L. rhamnosus* ont été obtenues à moindre coût en utilisant un milieu contenant du lactosérum (MMD10_{75%}/L_{25%}) (9,84 log UFC/ml) par rapport au bouillon MRS (9,63 log UFC/ml), un milieu spécifiquement développé pour la culture des bactéries *Lactobacillus*. Ainsi, le MMD10_{75%}/L_{25%} peut parfaitement remplacer le bouillon MRS pour la production de *L. rhamnosus*, sans affecter la production cellulaire (Bovo *et al.*, 2014).

III.4.5 Cinétique de croissance de la souche sélectionnée Lb_{16} en mode batch à cellules immobilisées

III.4.5.1 Vérification de l'adhésion de la souche Lb_{16} sur les deux supports

L'adhésion de l'isolat choisi sur les supports pouzzolane et l'os bovin sont différents d'un support à un autre (Figure III.34).

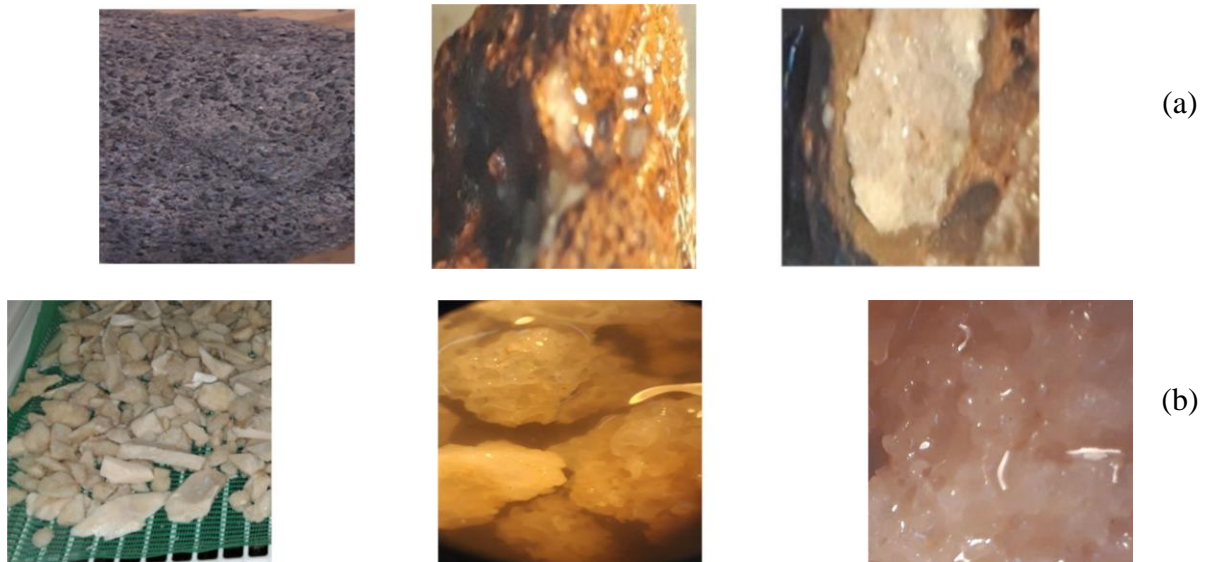


Figure III.34: Résultats de l'immobilisation de l'isolat Lb₁₆ sur la pouzzolane

(a) et de l'os bovin (b) durant 72 heures à 37 ± 1 °C et à un pH_i 6,5.

Les résultats obtenus sont représentés dans les Figures III.35 et III.36 Celle-ci montre l'évolution des biomasses des différentes cultures à 37 °C en fonction du temps de rétention cellulaire fixé à 18, 24, 48 et 72 heures sur granulométrie 0,4 et l'os bovin dans les trois milieux. Des prises photographiques ont été effectuées en parallèle.

III.4.5.2 Fermentation en batch discontinue à cellules immobilisées sur les trois milieux

Pour les cellules immobilisées sur support pouzzolane et os bovin, les conditions de fermentation sont fixées comme suit :

- Age d'inoculum : 18 et 24 heures ;
- Granulométrie des supports : 0,4- 0,6 mm ;
- Température d'incubation : 37 ± 1 °C ;
- Milieux d'essais : MMD10_{75%}/L_{25%}., 100 % MMD10 et MRS ;
- Agitation : 100 trs/min ;
- pH non contrôlé ;
- Durée de la fermentation : Entre 80 et 120 heures.

Les résultats indiqués sur les Figures III.35 et III.36 montrent les évolutions du pH, de la biomasse, la production de l'acide lactique de cette souche fixées sur la pouzzolane et l'os bovin.

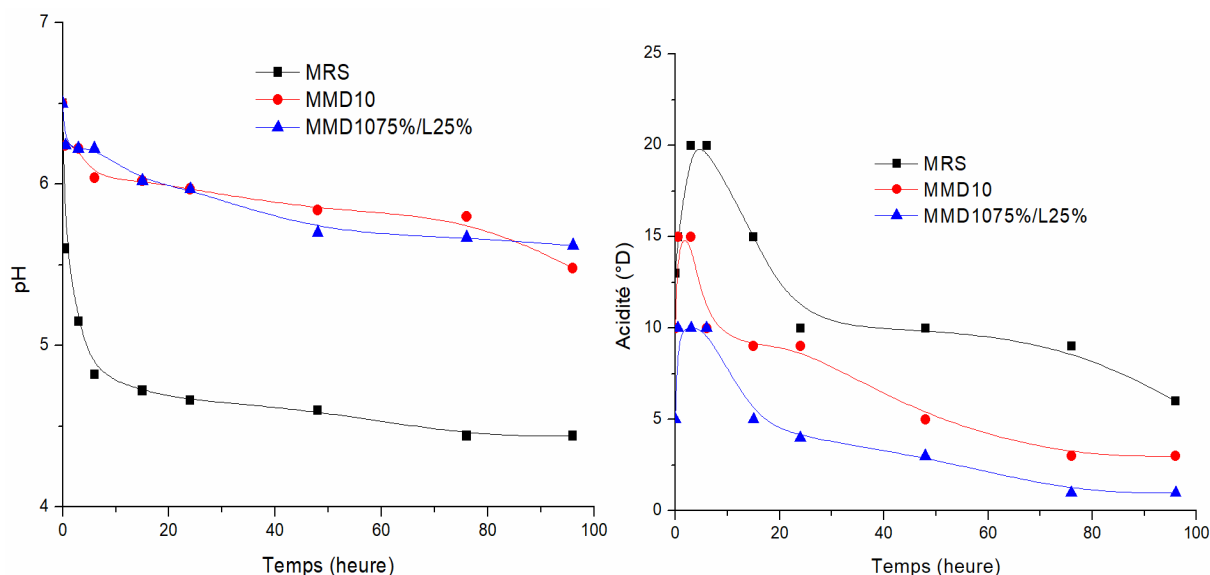


Figure III.35: Effet de l'immobilisation de l'isolat Lb_{16} sur la pouzzolane à 37 ± 1 °C et à un pH_i 6,5 sur la production de l'acide lactique et le pH dans les milieux MRS, MMD10 et MMD10_{75%}/L_{25%} en mode batch discontinue.

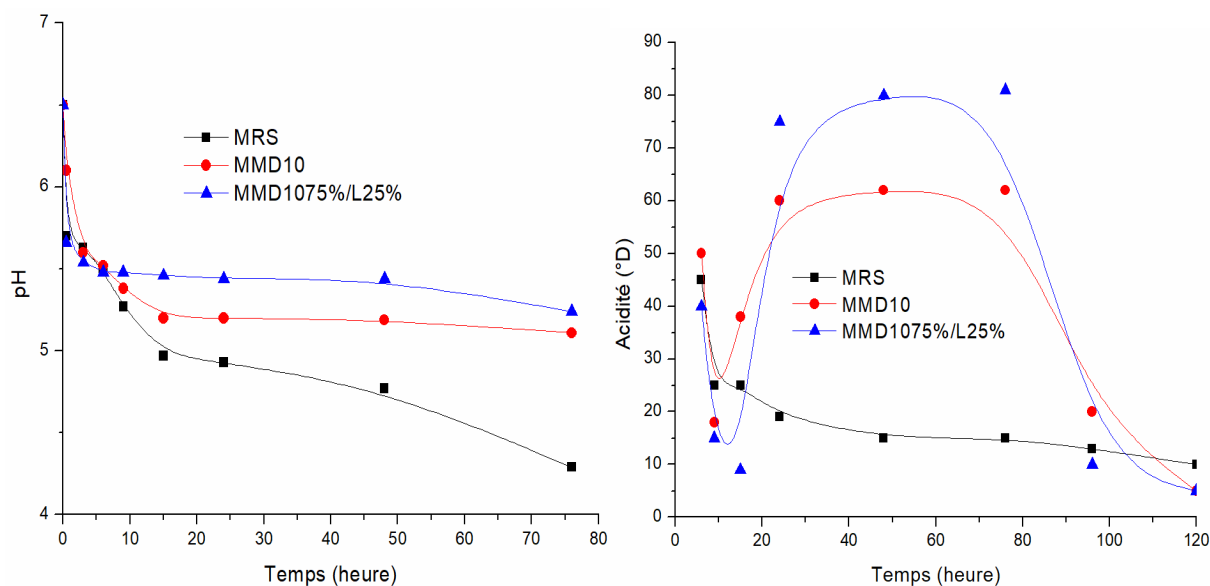


Figure III.36: Effet de l'immobilisation de l'isolat Lb_{16} sur l'os bovin à 37 ± 1 °C et à un pH_i 6,5 sur la production de l'acide lactique et le pH dans les milieux MRS, MMD10 et MMD10_{75%}/L_{25%} en mode batch discontinue.

D'après les Figures III.35 et III.36, la souche Lb_{16} présente des comportements similaires qu'elle soit en milieu composé seulement de MMD10 ou supplémenté au lactosérum. Pour les trois cultures, les courbes présentent des allures rapides pour toutes les évolutions en fonction de l'immobilisation de la souche sur la pouzzolane et l'os bovin.

Des essais ont été réalisés à partir d'un inoculum plus âgé de 24, 48 et 72 heures, puisque nous avons démontré précédemment que cela permettait d'augmenter le rendement de la production. Cependant, il a été noté qu'avec les cellules fixées sur l'os bovin ou la pouzzolane, la production de l'acide lactique a débuté par une faible valeur comparativement avec la fermentation en mode discontinu à cellules libres.

La souche testée individuellement présente un niveau final d'acidification exprimée en acide lactique sur le support pouzzolane compris entre 40 g/L sur MRS et 10 g/L sur 100% MMD10 et 9 g/L sur MMD10_{75%}/L_{25%}.

Par contre la fixation sur le support os compris entre 40 g/L sur MRS et 45 g/L sur 100% MMD10 et 8g /L sur MMD10_{75%}/L_{25%}. Après cette augmentation instantanée de la production, le *pH* a évolué entre 5 à 6,42 sur les deux supports et après 15 heures, la production a diminué par rapport au *pH* qui a augmenté puis il s'est stabilisé en parallèle avec la production par les cellules immobilisées sur la pouzzolane. Sur l'os et au cours des 24 heures, la production est stable et elle a diminué après 48 heures qui est disproportionnel au *pH*.

III.4.5.3 Fermentation en continu avec cellules immobilisées

Les cultures sont réalisées dans des colonnes de 500 ml dont les conditions sont citées dans le Tableau (III.4) avec un *pH* non contrôlé, à une température 37 ± 1 °C. Le schéma du montage expérimental et le protocole du travail sont présentés dans la partie «matériel et méthodes» (Figure III.17).

- Age d'inoculum : 18 et 24 heures ;
- Granulométrie de la pouzzolane : 0,4- 0,6 mm et l'os bovin 0,4 ;
- Température d'incubation : 37 ± 1 °C ;
- Milieux d'essais : MRS, MMD10 et MMD10_{75%}/L_{25%};
- *pH* non contrôlé ;
- Durée de la fermentation : Entre 80 à 120 heures

Suites aux résultats tirés des Figures (III.37, III.38), nous avons noté ce qui suit :

A t_{0h} , c'est-à-dire au début de la fermentation, la quantité d'acide lactique est aux alentours de 4 g/L sur les trois milieux des deux supports et de *pH* (4 - 6,5).

De t_{24h} à t_{48h} , nous avons enregistré une augmentation de la valeur de l'acide lactique dans le récupérât jusqu'à $t=76$ heures, les souches sont en pleine activité. A partir de t_{70h} jusqu'à t_{90h} , pour les 3 milieux, l'acide lactique tends à se stabiliser.

Il est à signaler qu'au démarrage du bioréacteur et durant les 48 heures, les valeurs de la production sont élevées pour la pouzzolane de granulométrie (0,4 à 0,6 mm). Elles sont meilleures que la même granulométrie de l'os bovin sur les mêmes milieux.

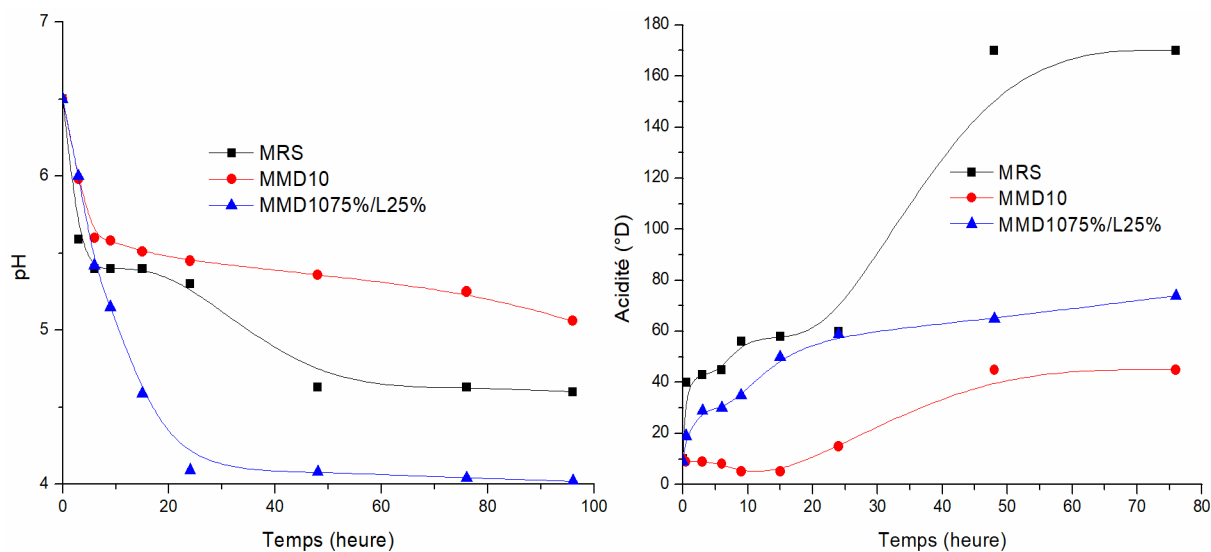


Figure III.37: Effet de l'immobilisation de l'isolat Lb_{16} sur la pouzzolane à 37 ± 1 °C et à un pH_i 6,5 sur la production de l'acide lactique et le pH dans les milieux MRS, MMD10 et MMD1075%/L25% en mode continu.

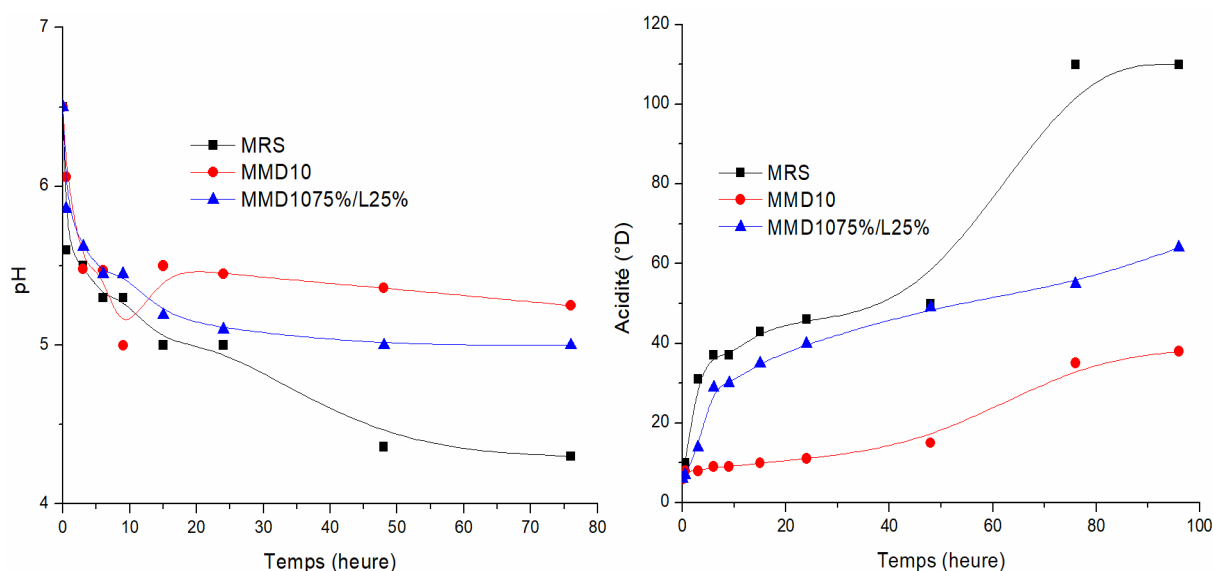


Figure III.38: Effet de l'immobilisation de l'isolat Lb_{16} sur l'os bovin à 37 ± 1 °C et à un pH_i 6,5 sur la production de l'acide lactique et le pH dans les milieux MRS, MMD10 et MMD1075%/L25% en mode continu.

Le processus conventionnel de fermentation en batch présente certains inconvénients tels que l'inhibition par le substrat ou le produit final. Pour éviter ces problèmes, cette étude s'est concentrée sur l'amélioration de la production d'acide lactique grâce à différentes stratégies d'alimentation utilisant le MMD10 supplémenté ou non supplémenté au lactosérum qui est un résidu de l'agro-industrie. Le processus est important car il n'existe pas de méthodes rentables pour produire de l'acide lactique de haute pureté. L'étude de différents modes de culture pour la production d'acide lactique était donc l'un des objectifs de ce travail.

L'acide lactique est un composé organique produit par fermentation par différents micro-organismes capables d'utiliser différentes sources d'hydrates de carbone. Les bactéries lactiques sont les principales bactéries utilisées pour produire de l'acide lactique et parmi elles, *Lactobacillus* sp qui a montré des capacités de fermentation intéressantes (Atfaoui *et al.*, 2021). Pendant 96 heures de fermentation à 37 °C, avec un pH initial de 6,5 et en anaérobiose facultative, les résultats des différentes fermentations ont été les suivants :

D'une manière générale, on constate que toutes les courbes relatives à l'immobilisation de *Lactobacillus rhamnosus* sur les deux supports, quels que soit le mode de culture et le substrat utilisés, présentent des profils entre 2 et 3 phases de production d'acide lactique. Ce qui signifie que durant la première phase, les cellules dégradent préférentiellement le sucre sur lequel elles peuvent se développer plus rapidement. Une fois le premier sucre épuisé, les cellules passent au second. Lors du passage à la deuxième phase, les cellules produisent les enzymes nécessaires au métabolisme du deuxième sucre et ainsi de suite pendant une période de latence. Ce phénomène est appelé diauxie. Ce phénomène a été décrit pour la première fois par Monod (Monod, 1949) sous le nom de croissance diauxique glucose-lactose, ce qui a conduit à un changement de paradigme dans la compréhension de la régulation des gènes (Jacob *et al.*, 1961).

Pour le bouillon MRS, le profil de la courbe en mode de culture continue à cellules immobilisées a montré une production d'acide lactique par *Lactobacillus rhamnosus* en trois phases : de 1 à 4,5 g/L, de 4,5 à 5,8 g/L et de 5,8 à 17 g/L puis la production reste constante pour le support pouzzolane. En ce qui concerne le support os bovin, la production de l'acide lactique a été notée de 0,8 à 3,7 g/L, de 3,7 à 5 g/L et de 5 à 11 g/L.

Pour le MMD10 non supplémenté, la meilleure production d'acide lactique par *Lactobacillus rhamnosus* a été notée sur le support os bovin en mode batch avec 6,2 g/L, suivi du mode continu avec 4,5 g/L sur le support pouzzolane et 3,8 g/L sur le support os bovin.

Pour le MMD10_{75%}/L_{25%}, la meilleure production d'acide lactique par *Lactobacillus rhamnosus* a été notée en discontinu avec 8,1 g/L sur le support os de bovin, suivi de 7,4 et 6,4 g/L respectivement sur le support pouzzolane et os de bovin en mode continu.

La comparaison des résultats obtenus dans ce travail avec ceux de la littérature révèle la dépendance du type de bactéries sur la conversion des sucres et la production d'acide lactique.

L'acide lactique a été produit dans des processus de fermentation batch et fed batch en utilisant la souche *L. rhamnosus* ATCC 10863 et aucune inhibition cellulaire n'a été détectée. 16,5 g/L d'acide lactique ont été produits en batch et 22,0 g/L en fed batch (Senedese *et al.*, 2015).

Srivastava *et al.* ont rapporté une fermentation de *L. rhamnosus* ATCC 10863 (appelé *L. casei* subsp. *rhamnosus* NRRL B-445) à 39 °C en utilisant du saccharose (105,75 g/L) comme substrat complété par 30,0 g/L d'extrait de levure et d'autres composés (Srivastava *et al.*, 1992). La production d'acide lactique a été de 80,0 g/L et la durée de fermentation par lots a été de ~220 heures. Il a été observé que, jusqu'à ~40 heures de fermentation, la production d'acide lactique était de ~20,0 g/L.

L'intérêt pour l'immobilisation de cellules naturelles ou les biofilms pour la fermentation de l'acide lactique s'est considérablement développé au cours des dernières décennies. De nombreuses études font état des avantages associés aux biofilms en tant que méthodes industrielles pour la production alimentaire et le traitement des eaux usées, étant donné que la formation représente un moyen de protection de la croissance microbienne offrant des avantages de survie aux cellules dans des environnements toxiques. La formation de biofilms est un processus naturel dans lequel les cellules microbiennes s'adsorbent sur un support sans produits chimiques ou polymères qui piègent les cellules et qui dépend de l'environnement du réacteur, du micro-organisme et des caractéristiques du support (Bovo *et al.*, 2014).

La valorisation d'un déchet solide de caroube provenant de l'industrie libanaise a été étudiée en optimisant la production d'acide lactique à l'aide de *Lactobacillus rhamnosus* immobilisés dans des billes d'alginate et de la méthodologie de la surface de réponse. La concentration d'acide lactique obtenue sous une vitesse d'agitation de 80 rpm et un pH de 6,4 était de 22 g/L et une productivité de 1,22 g/L/heure. Les cellules immobilisées dans des billes d'alginate peuvent être utilisées pendant au moins cinq cycles successifs (Ducom *et al.*, 2020).

III.5 Conclusion

A la lumière des résultats obtenus, notre étude a atteint l'objectif principal qui était que l'utilisation de la technologie des cellules immobilisées sur support pouzzolane et os bovin pour produire de l'acide lactique en quantité importante en vue de valoriser les margines. Un milieu de culture plus économique et potentiellement moins favorable pour la croissance des lactobacilles sp. nécessite un enrichissement pour remplacer le milieu MRS. Le comportement de la souche lactobacilles sp. sur les différents milieux supplémentée par le lactosérum enrichi en batch et en continu libres ou immobilisées a été étudié.

Nous avons noté qu'en:

-batch à cellules libres :

- ✓ Les résultats obtenus durant la fermentation discontinue à cellules libres en fonction du temps de fermentation et âge de l'inoculum pour les trois milieux montrent que la production élevée de la biomasse, l'acide lactique ont été maximales sur les deux milieux (17 g/L sur MRS et 10 g/L sur MMD10_{75%/L25%}.) dans une zone de pH (4,5-6,5) par rapport au milieu 100% MMD10 (2,5 g/L).

-En batch à cellules immobilisée sur les trois milieux :

- ✓ La souche testée individuellement présentent un niveau final d'acidification exprimée en acide lactique sur le support pouzzolane compris entre 4 g/L sur MRS et 10g/L sur 100% MMD10 et 0,9g /L sur MMD10_{75%/L25%}.
- ✓ Par contre la fixation sur le support d'os bovin compris entre 4 g/L sur MRS et 4,5 g/L sur 100% MMD10 et 8g /L sur MMD10_{75%/L25%}.

-En continu à cellules immobilisées

- ✓ Pour le bouillon MRS, le profil de la courbe en mode de culture continue à cellules immobilisées a montré une production d'acide lactique par *Lactobacillus rhamnosus* en trois phases : de 1 à 4,5 g/L, de 4,5 à 5,8 g/L et de 5,8 à 17 g/L puis la production reste constante pour le support pouzzolane. En ce qui concerne le support os bovin, la production de l'acide lactique a été notée de 0,8 à 3,7 g/L, de 3,7 à 5 g/L et de 5 à 11 g/L.
- ✓ Pour le MMD10 non supplémenté, la meilleure production d'acide lactique par *Lactobacillus rhamnosus* a été notée sur le support os bovin en mode batch avec 6,2 g/L, suivi du mode continu avec 4,5 g/L sur le support pouzzolane et 3,8 g/L sur le support os bovin.

- ✓ Pour le MMD10_{75%}/L_{25%}, la meilleure production d'acide lactique par *Lactobacillus rhamnosus* a été notée en discontinu avec 8,1 g/L sur le support os de bovin, suivi de 7,4 et 6,4 g/L respectivement sur le support pouzzolane et os bovin en mode continu.
- ✓ La supplémentation du milieu en lactosérum permet à la fois une stimulation globale de la fermentation lactique, mais également l'obtention d'un meilleur taux de survie des souches utilisées. L'adhésion des souches a nécessité quelques jours, après 2 à 4 jours de contact entre la suspension bactérienne et le substrat pour les différentes hauteurs dans le système continu. En ce qui concerne la productivité en acide lactique en mode batch à cellules libres, il a été noté une valeur entre 10 et 17 g.L⁻¹. Par contre, elle est estimée 6 à 9 g/L en discontinu à cellules fixées. Le choix de la technologie ainsi que la nature du substrat à utiliser permettent de préciser les meilleures conditions opératoires à appliquer. Ainsi, il serait important d'étudier la production à l'aide de cellules immobilisées d'une culture mixte plus complexe que la culture modèle utilisée lors de ce travail, avec un intérêt industriel. L'importance de certains paramètres sur le meilleur fonctionnement du bioréacteur pourra être confirmée au cours des études, notamment :

→ L'effet du temps de séjour sur la vitesse de colonisation et la stabilité de l'activité du consortium bactérien anaérobie ;

→ L'importance de la surface disponible pour la colonisation.

Avec le support pouzzolane et le milieu margines, nous avons noté un relargage cellulaire suivant une tendance exponentielle avec une vitesse lente. Cette observation probablement est liée à l'inertie du support pouzzolane et présence de polyphénols totaux.

Conclusion générale

Conclusion générale

De nombreuses recherches ont été menées pour développer des procédés de production biologiques d'éthanol et d'acide lactique, en utilisant des souches telles que *Saccharomyces cerevisiae* et lactobacilles sp. et en travaillant sur leurs métabolismes pour améliorer les rendements de production.

Au cours de ce travail, les margines issues de l'huilerie d'Ennakhla-Chlef Algérie ont été caractérisés. Les propriétés physico-chimiques révèlent une faible biodégradabilité de cet effluent, suggérant son impact négatif sur les sols et les cours d'eau.

Cependant, la teneur importante en minéraux et composés phénoliques permettrait l'utilisation des margines comme source de produits de valeur. La caractérisation microbiologique a identifié la présence de levures et de bactéries lactiques, ce qui pourrait avoir un intérêt pratique.

Les résultats de la valorisation des margines d'Ennakhla et la production des molécules d'intérêt (éthanol et acide lactique) par la méthode d'immobilisation des levures et des bactéries lactiques sur supports pouzzolane et os bovin ont été encourageants avec un procédé simple, rapide, efficace, performant et peu coûteux. Il n'y a aucun effet négatif sur la physiologie des cellules (rendement et bioconversion élevés).

Pour la production de bioéthanol :

- ***En discontinu ou batch à cellules libres :***

Dans le bouillon Sabouraud (BS)

- La production de l'éthanol a atteint son optimum 21 ml.

Dans le milieu margines diluées 10 fois (MMD10)

- Une faible évolution de concentration en éthanol produit a été notée à partir d'1 heure de fermentation jusqu'à 40 heures d'où une quantité de 8 ml/L a été enregistrée.

- ***Fermentation en discontinue batch à cellules immobilisées***

- Une forte production en éthanol dans la fermentation à cellule immobilisé par rapport à la fermentation à cellules libres dans les deux milieux.

- ✓ *Sur le support pouzzolane :*

Dans le milieu de référence BS

- Une forte production d'éthanol est notée $23,61 \pm 0,45$ ml/L après 24 heures de fermentation.

Par contre dans le MMD10

- Une production de $6,96 \pm 0,10$ ml/L d'éthanol atteint à son optimum après 48 heures avec une valeur de $14,19 \pm 0,80$ ml/L d'éthanol.

✓ *Sur le support os bovin :*

- La production d'éthanol atteint son optimum soit $23,59 \pm 0,45$ ml/L dans le BS.
- Dans le milieu MMD10, la production de $13,56 \pm 0,45$ ml/L d'éthanol se stabilise.

- **Mode continu à cellules immobilisés**

Les résultats ont montré que les meilleurs taux ont été donnés par le mode continu à cellules immobilisées sur pouzzolane dans le BS d'où il a été noté $58,66 \pm 0,35$ ml/L contre $32,92 \pm 0,10$ ml/L dans le MMD10 en mode continu à cellules immobilisées sur pouzzolane après 24 heures de fermentation.

Pour la production de l'acide lactique :

- **En batch a cellules libres**

Les résultats montrent que la croissance de la souche isolée à partir des margines brutes et identifiée comme *Lactobacillus rhamnosus* était meilleure dans des conditions anaérobies facultatives dans le bouillon MRS par rapport à MMD10 sans ou avec supplément de lactosérum.

Les résultats obtenus durant la fermentation discontinue à cellules libres en fonction du temps de fermentation et âge de l'inoculum pour les trois milieux montrent que la production élevée de la biomasse, l'acide lactique ont été maximales sur les deux milieux (17 g/L sur MRS et 10 g/L sur MMD10_{75%/L25%}.) dans une zone de pH (4,5-6,5) par rapport au milieu 100% MMD10 ($2,5$ g/L).

- **En batch discontinue à cellules immobilisée sur les trois milieux**

La souche testée individuellement présentent un niveau final d'acidification exprimée en acide lactique sur le support pouzzolane compris entre 4 g/L sur MRS et 1 g/L sur 100% MMD10 et $0,9$ g/L sur MMD10_{75%/L25%}.

Par contre la fixation sur le support d'os a donné une production comprise entre 4 g/L sur MRS et $4,5$ g/L sur 100% MMD10 et $0,8$ g/L sur MMD10_{75%/L25%}. Après cette augmentation instantanée de la production, le pH a évolué de 5 à $6,42$ sur les deux supports et après 15 heures, la production a diminué par rapport au pH qui a augmenté puis il s'est stabilisé en parallèle avec la production par les cellules immobilisées sur la

pouzzolane. Sur l'os et au cours des 24 heures, la production est stable et elle a diminué après 48 heures qui est disproportionnel au pH.

- ***En continu à cellules immobilisées***

Pour le bouillon MRS, le profil de la courbe en mode de culture continue à cellules immobilisées a montré une production d'acide lactique par *Lactobacillus rhamnosus* en trois phases : de 1 à 4,5 g/L, de 4,5 à 5,8 g/L et de 5,8 à 17 g/L puis la production reste constante pour le support pouzzolane. En ce qui concerne le support os bovin, la production notée de l'acide lactique était de 0,8 à 3,7 g/L, de 3,7 à 5 g/L et de 5 à 11 g/L.

Pour le MMD10 non supplémenté, la meilleure production d'acide lactique par *Lactobacillus rhamnosus* a été notée sur le support os bovin en mode batch avec 6,2 g/L, suivi du mode continu avec 4,5 g/L sur le support pouzzolane et 3,8 g/L sur le support os bovin.

Pour le MMD10_{75%}/L_{25%}, la meilleure production d'acide lactique par *Lactobacillus rhamnosus* a été notée en discontinu avec 8,1 g/L sur le support os de bovin, suivi de 7,4 et 6,4 g/L respectivement sur le support pouzzolane et os de bovin en mode continu.

Nous pouvons en déduire que le meilleur rendement et la meilleure productivité ont été trouvés en utilisant la pouzzolane à cellules immobilisées dans le milieu de référence.

Notre étude a atteint l'objectif principal qui était la production de biomolécules par utilisation des cellules immobilisée sur des supports solides (pouzzolane et os bovin) en vue de valoriser les marges par une fermentation (en batch à cellules libres, batch à cellules immobilisées et en continu à cellules immobilisées). Cette valorisation a un aspect économique et environnemental.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Abedi, E. et Hashemi, S.M.B. (2020)** ‘Lactic acid production – producing microorganisms and substrates sources-state of art’, *Heliyon*, 6(10), p. e04974. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04974>.
- Afilal, M.E. et al. (2019)** ‘Energetic valorization of olive waste water (liquid waste) by methanic fermentation in North of Morocco’, *Environ. Water Sci. Public Heath Territ. Intell.*, 3(1), pp. 53–59.
- Aguilar, M.J. (2010)** ‘Fixation of ammonium-N and nitrate-N with olive oil mill wastewaters’, *Environ. Technol.*, 31(4), pp. 395–398. <https://doi.org/10.1080/09593330903501836>.
- Akretche, H. et al. (2019)** ‘Valorization of olive mill wastewater for the development of biobased polymer films with antioxidant properties using eco-friendly processes’, *Green Chem.*, 21(11), pp. 3065–3073. <https://doi.org/10.1039/c9gc00828d>.
- Al-Bsoul, A. et al. (2020)** ‘Optimal conditions for olive mill wastewater treatment using ultrasound and advanced oxidation processes’, *Sci. Total Environ.*, 700. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134576>.
- Alburquerque, J.A. et al. (2004)** ‘Agrochemical characterisation of “alperujo”, a solid by-product of the two-phase centrifugation method for olive oil extraction’, *Bioresour. Technol.*, 91(2), pp. 195–200. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(03\)00177-9](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(03)00177-9).
- Alburquerque, J.A. et al. (2007)** ‘Effects of a compost made from the solid by-product (“alperujo”) of the two-phase centrifugation system for olive oil extraction and cotton gin waste on growth and nutrient content of ryegrass (*Lolium perenne* L.)’, *Bioresour. Technol.*, 98(4), pp. 940–945. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.04.014>.
- Altieri, R. et al. (2011)** ‘Novel static composting method for bioremediation of olive mill waste’, *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 65(6), pp. 786–789. <https://doi.org/10.1016/J.IBIOD.2011.05.002>.
- Amaral, C. et al. (2008)** ‘Microbiological and physicochemical characterization of olive mill wastewaters from a continuous olive mill in Northeastern Portugal’, *Bioresour. Technol.*, 99(15), pp. 7215–7223. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.12.058>.
- Aouidi, F. et al. (2010)** ‘Use of cheese whey to enhance *Geotrichum candidum* biomass production in olive mill wastewater’, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 37(8), pp. 877–882. <https://doi.org/10.1007/s10295-010-0752-3>.

- Assemany, P. et al. (2019)** ‘Complementarity of Substrates in Anaerobic Digestion of Wastewater Grown Algal Biomass’, *Waste and Biomass Valorization* [Preprint]. <https://doi.org/10.1007/s12649-019-00875-8>.
- Atfaoui, K. et al. (2021)** ‘Controlled fermentation of food industrial wastes to develop a bioorganic fertilizer by using experimental design methodology’, *J. Saudi Soc. Agric. Sci.*, 20(8), pp. 544–552. <https://doi.org/10.1016/J.JSSAS.2021.06.003>.
- Ayadi, K., Bounedjar, K., et al. (2022)** ‘Lactic acid production by immobilization of *Lactobacillus* sp. isolated from olive mill wastewater’, *Desalin. WATER Treat.*, 255(May 2021), pp. 83–93. <https://doi.org/10.5004/dwt.2022.28324>.
- Ayadi, K., Meziane, M., et al. (2022)** ‘Olive Mill Wastewater for Bioethanol Production using Immobilised Cells’, *Kem. u Ind.*, (1–2), pp. 1–16. <https://doi.org/10.15255/kui.2021.015>.
- Azbar, N. et al. (2004)** ‘A review of waste management options in olive oil production’, *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.*, 34(3), pp. 209–247. <https://doi.org/10.1080/10643380490279932>.
- Babić, S. et al. (2019)** ‘Toxicity evaluation of olive oil mill wastewater and its polar fraction using multiple whole-organism bioassays’, *Sci. Total Environ.*, 686, pp. 903–914. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.046>.
- Bai, F.W. et al. (2008)** ‘Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks’, *Biotechnol. Adv.*, 26(1), pp. 89–105. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.09.002>.
- Ballerini, D. (2006)** *Biocarburants (Les)*. Technip. Edited by Technip. Paris.
- Barje, F. et al. (2012)** ‘Molecular behaviour of humic acid-like substances during co-composting of olive mill waste and the organic part of municipal solid waste’, *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 74, pp. 17–23. <https://doi.org/10.1016/J.IBIOD.2012.07.004>.
- Barrera-Díaz, C.E. et al. (2018)** ‘Electrocoagulation: Fundamentals and perspectives’, in *Electrochem. Water Wastewater Treat.* Elsevier, pp. 61–76. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813160-2.00003-1>.
- Béal, C. et al. (2008)** *Bactéries lactiques, de la génétique aux ferments*. Paris: Lavoisier.
- Belaqziz, M. et al. (2016)** ‘Agronomic application of olive mill wastewater: Effects on maize production and soil properties’, *J. Environ. Manage.*, 171, pp. 158–165. <https://doi.org/10.1016/J.JENVMAN.2016.02.006>.
- Bellumori, M. et al. (2018)** ‘Recovery and stability over time of phenolic fractions by an industrial filtration system of olive mill wastewaters: a three-year study’, *J. Sci. Food Agric.*, 98(7), pp. 2761–2769. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8772>.

- Di Bene, C. et al. (2013)** ‘Short- and long-term effects of olive mill wastewater land spreading on soil chemical and biological properties’, *Soil Biol. Biochem.*, 56, pp. 21–30. <https://doi.org/10.1016/J.SOILBIO.2012.02.019>.
- Boran, F. and Yeşilada, O. (2011)** ‘Enhanced production of laccase by fungi under solid substrate fermentation condition’, *BioResources*, 6(4), pp. 4404–4416.
- Bougarne, L. et al. (2019)** ‘Consequences of surface water eutrophication: remedy and environmental interest’, *Mater. Today Proc.* Edited by E. M. et al., 13, pp. 654–662. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2019.04.025>.
- Bouharat, D. et al. (2018)** ‘Physico-chemical characterization of olive-oil mill wastewaters of Ben Karrich area (Tetouan province, North of Morocco) and optimization study of their treatment using activated carbon’, *Mediterr. J. Chem.*, 7(4), pp. 253–258. <https://doi.org/10.13171/MJC74181101-BOUHARAT>.
- Boukhalfa-Lezazar, H. (2020)** *Biomolécules microbiennes Les biomolécules produites par fermentation. Editions universitaires europeennes.*
- Bouknana, D. et al. (2014)** ‘Physicochemical characterization of olive oil mill wastewaters in the eastern region of Morocco’, *J. Mater. Environ. Sci.*, 5(4), pp. 1039–1058.
- Bovo, F. et al. (2014)** ‘Ability of a *Lactobacillus rhamnosus* strain cultured in milk whey based medium to bind aflatoxin B1’, *Food Sci. Technol.*, 34(3), pp. 566–570. <https://doi.org/10.1590/1678-457x.6373>.
- Brunetti, G. et al. (2005)** ‘Olive pomace amendment in Mediterranean conditions: Effect on soil and humic acid properties and wheat (*Triticum turgidum* L.) yield’, *J. Agric. Food Chem.*, 53(17), pp. 6730–6737. <https://doi.org/10.1021/jf050152j>.
- Calabrò, P.S. et al. (2018)** ‘Increasing the tolerance to polyphenols of the anaerobic digestion of olive wastewater through microbial adaptation’, *Biosyst. Eng.*, 172, pp. 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2018.05.010>.
- Carrara, M. et al. (2021)** ‘Potential of Olive Oil Mill Wastewater as a Source of Polyphenols for the Treatment of Skin Disorders: A Review’, *J. Agric. Food Chem.*, 69(26), pp. 7268–7284. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c00296>.
- Chowdhury, A. (2012)** ‘Screening of *Lactobacillus* spp. from Buffalo Yoghurt for Probiotic and Antibacterial Activity’, *J. Bacteriol. Parasitol.*, 03(08). <https://doi.org/10.4172/2155-9597.1000156>.
- Chowdhury, A.K.M. et al. (2013)** ‘Olive mill waste composting: A review’, *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 85, pp. 108–119. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.06.019>.
- Coskun, T. et al. (2010)** ‘Treatment of olive mill wastewaters by nanofiltration and reverse

- osmosis membranes’, *Desalination*, 259(1–3), pp. 65–70.
<https://doi.org/10.1016/j.desal.2010.04.034>.
- Crognale, S. et al. (2003)** ‘ β -Glucan production by *Botryosphaeria rhodina* on undiluted olive-mill wastewaters’, *Biotechnol. Lett.*, 25(23), pp. 2013–2015.
<https://doi.org/10.1023/B:BILE.00000004394.66478.05>.
- Dakhli, R. et al. (2021)** ‘Agricultural valorization of olive mill wastewater in arid regions of tunisia: Short-term impact on soil biochemical properties and faba bean growth’, *Polish J. Environ. Stud.*, 30(2), pp. 1117–1128. <https://doi.org/10.15244/pjoes/123903>.
- Dashti, N. et al. (2015)** ‘Olive-pomace harbors bacteria with the potential for hydrocarbon-biodegradation, nitrogen-fixation and mercury-resistance: Promising material for waste-oil-bioremediation’, *J. Environ. Manage.* 2015/03/17, 155, pp. 49–57.
<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.03.010>.
- Domingues, E. et al. (2019)** ‘Catalytic efficiency of red mud for the degradation of Olive mill wastewater through heterogeneous Fenton’s process’, *Water (Switzerland)*, 11(6).
<https://doi.org/10.3390/w11061183>.
- Ducom, G. et al. (2020)** ‘Comparative analyses of three olive mill solid residues from different countries and processes for energy recovery by gasification’, *Renew. Energy*, 145, pp. 180–189. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.05.116>.
- Ebich, F. et al. (2016)** ‘Physicochemical study of olive mill wastewaters of Meknes: Effect of the extraction method of olive oil on the physicochemical quality of olive mill wastewaters’, *Der Pharma Chem.*, 8(8), pp. 146–149.
- Elkacmi, R. and Bennajah, M. (2019)** ‘Advanced oxidation technologies for the treatment and detoxification of olive mill wastewater: A general review’, *J. Water Reuse Desalin.*, 9(4), pp. 463–505. <https://doi.org/10.2166/wrd.2019.033>.
- Esmail, A. et al. (2014)** ‘Physico-chemical and microbiological study of oil mill wastewater (OMW) from three different regions of Morocco (Ouazzane, Fes Boulman and Béni Mellal)’, *J. Mater. Environ. Sci.*, 5(1), pp. 121–126.
- Frasconi, D. et al. (2016)** ‘Olive mill wastewater valorisation through phenolic compounds adsorption in a continuous flow column’, *Chem. Eng. J.*, 283, pp. 293–303.
<https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.07.048>.
- Frasconi, D. et al. (2019)** ‘Valorisation of olive mill wastewater by phenolic compounds adsorption: Development and application of a procedure for adsorbent selection’, *Chem. Eng. J.*, 360, pp. 124–138. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.11.188>.
- García, G.B. et al. (2014)** ‘Characterization and modeling of pyrolysis of the two-phase olive

- mill solid waste', *Fuel Process. Technol.*, 126, pp. 104–111.
<https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2014.04.020>.
- Di Giacomo, G. and Romano, P. (2022)** 'Evolution of the Olive Oil Industry along the Entire Production Chain and Related Waste Management', *Energies*, 15(2), p. 465.
<https://doi.org/10.3390/en15020465>.
- Giannattasio, S. et al. (2005)** 'Acid stress adaptation protects *Saccharomyces cerevisiae* from acetic acid-induced programmed cell death', *Gene*, 354, pp. 93–98.
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2005.03.030>.
- Di Gioia, D. et al. (2002)** 'Characterization of four olive-mill-wastewater indigenous bacterial strains capable of aerobically degrading hydroxylated and methoxylated monocyclic aromatic compounds', *Arch. Microbiol.*, 178(3), pp. 208–217.
<https://doi.org/10.1007/s00203-002-0445-z>.
- Gómez-Caravaca, A.M. et al. (2014)** 'From Wastes To Added Value By-Products: An Overview On Chemical Composition And Healthy Properties Of Bioactive Compounds Of Olive Oil Chain By-Products', in *Virgin Olive Oil Prod. Compos. Uses Benefits Man.* Department of Analytical Chemistry, University of Granada, C/Fuentenueva s/n, Granada, Spain: Nova Science Publishers, Inc., pp. 301–334.
- Gonçalves, C. et al. (2010)** 'Olive mill wastewater as a renewable resource', *Environ. Eng. Manag. J.*, 9(3), pp. 319–325. <https://doi.org/10.30638/eemj.2010.045>.
- Gueboudji, Z. et al. (2021)** 'Effect of storage time on the biodegradability of olive oil mill wastewater from the cold extraction of olive oil system', *Eurobiotech J.*, 5(3), pp. 142–154. <https://doi.org/10.2478/ebtj-2021-0023>.
- Gueham, S. (2019)** Vérification d'un système de traitement des margines. Université de Jijel.
- Guiraud, J.-P. (2012)** Microbiologie alimentaire, Biofutur. Dunod.
[https://doi.org/10.1016/s0294-3506\(99\)80417-7](https://doi.org/10.1016/s0294-3506(99)80417-7).
- Haddad, K. et al. (2017)** 'Olive Mill Wastewater: From a Pollutant to Green Fuels, Agricultural Water Source and Biofertilizer', *ACS Sustain. Chem. Eng.*, 5(10), pp. 8988–8996. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b01786>.
- Hanafi, F. et al. (2009)** 'Olive oil mill wastewater treatment by means of electrocoagulation with punts aluminium electrodes', *Rev. des Sci. l'Eau*, 22(4), pp. 473–485.
- El Hassani, F.Z. et al. (2009)** 'Characterization of the harmful effect of olive mill wastewater on spearmint', *J. Hazard. Mater.*, 170(2–3), pp. 779–785.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.05.033>.
- Hissein, O. et al. (2019)** 'Isolement Et Caractérisation De Souches Fongiques a Partir De

- Poissons Fumes / Seches Du Lac Fitri Au Tchad', *Am. J. Innov. Res. Appl. Sci.*, (April), pp. 155–160.
- IOC (2022)** Available at: <https://www.internationaloliveoil.org> (Accessed: 13 March 2022).
- Jacob, F. and Monod, J. (1961)** 'Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins', *J. Mol. Biol.*, 3(3), pp. 318–356. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(61\)80072-7](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(61)80072-7).
- Jean-Paul, L. (1997)** *Microbiologie alimentaire*. Lavoisier.
- Kapellakis, I. et al. (2015)** 'Land application-based olive mill wastewater management', *Water (Switzerland)*, 7(2), pp. 362–376. <https://doi.org/10.3390/w7020362>.
- Khatib, A. et al. (2009)** 'Environnemental pollution resulting from olive oil production in palestine', *South. Brazilian J. Chem.*, 17(17), pp. 7–20. https://doi.org/10.48141/sbjchem.v17.n17.209.9_2009.pdf.
- Khdair, A. and Abu-Rumman, G. (2020)** 'Sustainable Environmental Management and Valorization Options for Olive Mill Byproducts in the Middle East and North Africa (MENA) Region', *Processes*, 8(6), p. 671. <https://doi.org/10.3390/pr8060671>.
- Khdair, A.I., Abu-Rumman, G., et al. (2019)** 'Pollution estimation from olive mills wastewater in Jordan', *Heliyon*, 5(8), p. e02386. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02386>.
- Khdair, A.I., Khdair, S.I., et al. (2019)** 'Dataset on some soil properties improvement by the addition of olive pomace', *Data Br.*, 24. <https://doi.org/10.1016/J.DIB.2019.103878>.
- Koller, E. (2009)** *Traitement des pollutions industrielles*.
- Kraiem, N. et al. (2014)** 'Impregnation of olive mill wastewater on dry biomasses: Impact on chemical properties and combustion performances', *Energy*, 78, pp. 479–489. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2014.10.035>.
- Kurtz, M.P. et al. (2021)** 'Toward Balancing the Pros and Cons of Spreading Olive Mill Wastewater in Irrigated Olive Orchards', *Processes*, 9(5), p. 780. <https://doi.org/10.3390/pr9050780>.
- Lambolely, L. et al. (1997)** 'Continuous mixed strain mesophilic lactic starter production in supplemented whey permeate medium using immobilized cell technology', *Biotechnol. Bioeng.*, 56(5), pp. 502–516. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19971205\)56:5<502::AID-BIT4>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19971205)56:5<502::AID-BIT4>3.0.CO;2-M).
- Lanza, B. et al. (2020)** 'Olive pâté by multi-phase decanter as potential source of bioactive compounds of both nutraceutical and anticancer effects', *Molecules*, 25(24). <https://doi.org/10.3390/molecules25245967>.

- Lin, H.-T.V. et al. (2020)** 'Production of Lactic Acid from Seaweed Hydrolysates via Lactic Acid Bacteria Fermentation', *Fermentation*, 6(1), p. 37. <https://doi.org/10.3390/fermentation6010037>.
- Lin, Y. and Tanaka, S. (2006)** 'Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects', *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2005 696, 69(6), pp. 627–642. <https://doi.org/10.1007/S00253-005-0229-X>.
- Marchal, N. et al. (1982)** Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bacteries. Paris: O. Doin.
- Mattonai, M. et al. (2019)** 'Olive mill wastewaters: quantitation of the phenolic content and profiling of elenolic acid derivatives using HPLC-DAD and HPLC/MS2 with an embedded polar group stationary phase', *Nat. Prod. Res.*, 33(21), pp. 3171–3175. <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1522632>.
- Di Mauro, M.D. et al. (2017)** 'Sugars and minerals enriched fraction from olive mill wastewater for promising cosmeceutical application: Characterization, in vitro and in vivo studies', *Food Funct.*, 8(12), pp. 4713–4722. <https://doi.org/10.1039/C7FO01363A>.
- Mebirouk, M. et al. (2006)** 'Olive oil mill wastewaters pollution abatement by physical treatments and biodegradation with phanerochaetae chrysosporium', *Environ. Technol.*, 27(12), pp. 1351–1356. <https://doi.org/10.1080/09593332708618749>.
- Mebirouk, M. et al. (2007)** 'The biodegradation of Olive Oil Mill Wastewaters by Sawdust and by a Phanerochaetae chrysosporium', *Grasas y Aceites*, 58(4). <https://doi.org/10.3989/gya.2007.v58.i4.448>.
- Mekki, A. et al. (2006)** 'Changes in microbial and soil properties following amendment with treated and untreated olive mill wastewater', *Microbiol. Res.*, 161(2), pp. 93–101. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2005.06.001>.
- Mekki, A. et al. (2013)** 'Review: Effects of olive mill wastewater application on soil properties and plants growth', *Int. J. Recycl. Org. Waste Agric.*, 2(1), p. 15. <https://doi.org/10.1186/2251-7715-2-15>.
- Menoret, C. (2001)** Traitement d'effluents concentrés par cultures fixées sur gravier ou pouzzolane. l'Universite des Sciences du Languedoc, Montpellier II.
- Messineo, A. et al. (2020)** 'Biomethane recovery from olive mill residues through anaerobic digestion: A review of the state of the art technology', *Sci. Total Environ.*, 703, p. 135508. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135508>.
- Minussi, R.C. et al. (2007)** 'Purification, characterization and application of laccase from *Trametes versicolor* for colour and phenolic removal of olive mill wastewater in the

- presence of 1-hydroxybenzotriazole', *African J. Biotechnol.*, 6(10), pp. 1248–1254.
- Molina Alcaide, E. et al. (2003)** 'Ruminal degradability and in vitro intestinal digestibility of sunflower meal and in vitro digestibility of olive by-products supplemented with urea or sunflower meal Comparison between goats and sheep', *Anim. Feed Sci. Technol.*, 110(1–4), pp. 3–15. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2003.08.002>.
- Monod, J. (1949)** 'the Growth of Bacterial Cultures', *Annu. Rev. Microbiol.*, 3(1), pp. 371–394. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.03.100149.002103>.
- Morillo, J.A. et al. (2009)** 'Bioremediation and biovalorisation of olive-mill wastes', *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 82(1), pp. 25–39. <https://doi.org/10.1007/S00253-008-1801-Y>.
- El Mouden, H. et al. (2019)** 'Effect of filtration of olive mill wastewater on the phenolic composition and its influence on antioxidant activity', *Pharmacologyonline*, 2, pp. 161–176.
- Mouncif, M. et al. (1993)** 'A study of chemical and microbiological characteristics of olive mill waste water in Morocco', *Grasas y Aceites*, 44(6), pp. 335–338. <https://doi.org/10.3989/gya.1993.v44.i6.1059>.
- Moussaoui, R. et al. (2010)** 'Antioxidant effect of phenolic compounds recovered from olive mill wastewater of Chemlal variety cultivated in Kabylia (Algeria) on the oxidative stability of virgin olive oil', *J. Food, Agric. Environ.*, 8(3-4 PART 1), pp. 86–89.
- Nanis, I. et al. (2020)** 'Microbiological and physicochemical changes during fermentation of solid residue of olive mill wastewaters: Exploitation towards the production of an olive paste – type product', *Lwt*, 117. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108671>.
- Nawal Mekersi et al. (2021)** 'Effects of single and combined olive mill wastewater and olive mill pomace on the growth, reproduction, and survival of two earthworm species (*Aporrectodea trapezoides*, *Eisenia fetida*)', *Appl. Soil Ecol.*, 168. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.104123>.
- Negro, M.J. et al. (2017)** 'The biorefinery concept for the industrial valorization of residues from olive oil industry', in *Olive Mill Waste Recent Adv. Sustain. Manag. Biofuels Unit, Energy Department-CIEMAT, Madrid, Spain: Elsevier Inc.*, pp. 57–78. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805314-0.00003-0>.
- Nguyen, T.D. (2016)** Protection de la levure *Saccharomyces cerevisiae* par un système biopolymérique multicouche : effet sur son activité métabolique en réponse aux conditions de l'environnement.
- Novidzro, M.K. et al. (2013)** 'Etude de la performance de quatre souches de *saccharomyces cerevisiae* au cours de la production d'éthanol à partir des moûts de sucrose enrichis.', *J.*

- la Société Ouest-Africaine Chim., 35(January), pp. 1–7.
- Ntaikou, I. et al. (2020)** ‘Assessment of electrocoagulation as a pretreatment method of olive mill wastewater towards alternative processes for biofuels production’, *Renew. Energy*, 154, pp. 1252–1262. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.03.108>.
- Ntougias, S. et al. (2013)** ‘The microbiology of olive mill wastes’, *Biomed Res. Int.* 2013/11/08, 2013, pp. 1–16. <https://doi.org/10.1155/2013/784591>.
- Otterstedt, K. et al. (2004)** ‘Switching the mode of metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*’, *EMBO Rep.*, 5(5), pp. 532–537. <https://doi.org/10.1038/SJ.EMBOR.7400132>.
- Ouabou, E. et al. (2014)** ‘Traitement de la margine brute d’huile d’olive par distillation suivi de neutralisation par la chaux’, *J. Appl. Biosci.*, 79(1), p. 6867. <https://doi.org/10.4314/jab.v79i1.12>.
- Ouédraogo, N. et al. (2012)** ‘Essai de production de protéines d ’ organismes unicellulaires par des souches de levures à partir de résidus de tubercules de patate douce et d ’ igname’, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 16(4), pp. 463–467. Available at: <https://popups.uliege.be/1780-4507/index.php?id=9119&gathStatIcon=true&lang=en> (Accessed: 7 May 2023).
- Papazi, A. et al. (2019)** ‘Combinational system for biodegradation of olive oil mill wastewater phenolics and high yield of bio-hydrogen production’, *J. Biotechnol.*, 306(September), pp. 47–53. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.09.009>.
- Paredes, M.J. et al. (1987)** ‘Characteristics of soil after pollution with waste waters from olive oil extraction plants’, *Chemosphere*, 16(7), pp. 1557–1564. [https://doi.org/10.1016/0045-6535\(87\)90096-8](https://doi.org/10.1016/0045-6535(87)90096-8).
- Petrakis, C. (2006)** ‘Olive Oil Extraction’, *Olive Oil Chem. Technol. Second Ed.*, pp. 191–223. <https://doi.org/10.1016/B978-1-893997-88-2.50013-4>.
- Pourkhanali, K. et al. (2020)** ‘Isolation , identification and optimization of enhanced production of laccase from *Galactomyces geotrichum* under solid-state fermentation’, *Prep. Biochem. Biotechnol.*, 0(0), pp. 1–10. <https://doi.org/10.1080/10826068.2020.1848867>.
- Rajhi, H. et al. (2018)** ‘Assessment and valorization of treated and non-treated olive mill wastewater (OMW) in the dry region’, *Int. J. Recycl. Org. Waste Agric.*, 7(3), pp. 199–210. <https://doi.org/10.1007/s40093-018-0206-x>.
- Rigane, M.K. and Medhioub, K. (2011)** ‘Assessment of properties of Tunisian agricultural waste composts: Application as components in reconstituted anthropic soils and their

- effects on tomato yield and quality’, *Resour. Conserv. Recycl.*, 55(8), pp. 785–792.
<https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2011.03.012>.
- Rocha, C. et al. (2022)** ‘Olive Mill Wastewater Valorization through Steam Reforming Using Multifunctional Reactors: Challenges of the Process Intensification’, *Energies*, 15(3).
<https://doi.org/10.3390/en15030920>.
- Rodier, J. et al. (2009)** *L’analyse de l’eau*. 9th edn. Paris: Dunod.
- Roig, A. et al. (2006)** ‘An overview on olive mill wastes and their valorisation methods’, *Waste Manag.*, 26(9), pp. 960–969. <https://doi.org/10.1016/J.WASMAN.2005.07.024>.
- De Roissart, H. (1986)** ‘Bactérie lactiques’, in *Lait Prod. Lait. (Vache, Brebis, Chevre)*. Paris: Lavoisier.
- Romo-Buchelly, J. et al. (2019)** ‘Biotechnological valorization of agro industrial and household wastes for lactic acid production’, *Rev. Colomb. Biotechnol.*, 21(1), pp. 113–127. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v21n1.69284>.
- Sampaio, M.A. et al. (2011)** ‘Anaerobic digestion challenge of raw olive mill wastewater’, *Bioresour. Technol.*, 102(23), pp. 10810–10818.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.09.001>.
- Sánchez-Martínez, J.D. and Garrido-Almonacid, A. (2019)** ‘Olive cultivation in the era of globalization’, *Sci. Technol. Dev. J. - Soc. Sci. Humanit.*, 2(1), pp. 60–71.
<https://doi.org/10.32508/stdjssh.v2i1.478>.
- Sarris, D. et al. (2013)** ‘Conversions of olive mill wastewater-based media by *Saccharomyces cerevisiae* through sterile and non-sterile bioprocesses’, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 88(5), pp. 958–969. <https://doi.org/10.1002/jctb.3931>.
- Sarris, D. et al. (2019)** ‘Production of added-value chemical compounds through bioconversions of olive-mill wastewaters blended with Crude glycerol by a *Yarrowia lipolytica* strain’, *Molecules*, 24(2), pp. 1–26.
<https://doi.org/10.3390/molecules24020222>.
- Sarris, D. and Papanikolaou, S. (2016)** ‘Biotechnological production of ethanol: Biochemistry, processes and technologies’, *Eng. Life Sci.*, 16(4), pp. 307–329.
<https://doi.org/10.1002/elsc.201400199>.
- Sayadi, S. et al. (2000)** ‘Detrimental effects of high molecular-mass polyphenols on olive mill wastewater biotreatment’, *Process Biochem.*, 35(7), pp. 725–735.
[https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(99\)00134-X](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(99)00134-X).
- Sciancalepore, V. et al. (1996)** ‘Composting of effluent from a new two-phases centrifuge olive mill. Microbial characterization of the compost’, *Toxicol. Environ. Chem.*, 55(1–

- 4), pp. 145–158. <https://doi.org/10.1080/02772249609358331>.
- Sciubba, F. et al. (2020)** ‘Olive Mill Wastes: A Source of Bioactive Molecules for Plant Growth and Protection against Pathogens’, *Biology (Basel)*, 9(12), p. 450. <https://doi.org/10.3390/biology9120450>.
- Senedese, A.L.C. et al. (2015)** ‘L-Lactic acid production by lactobacillus rhamnosus ATCC 10863’, *Sci. World J.*, 2015, pp. 1–6. <https://doi.org/10.1155/2015/501029>.
- Sierra, J. et al. (2007)** ‘Effects of the agronomic use of olive oil mill wastewater: Field experiment’, *Sci. Total Environ.*, 378(1–2), pp. 90–94. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.01.009>.
- Singleton, V.L. et al. (1999)** ‘[14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent’, in, pp. 152–178. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1).
- Sottiez, P. (1990)** *Produits dérivés des fabrications fromagères*. Paris: Lavoisier.
- Souilem, S. et al. (2017)** ‘Olive oil production sector: Environmental effects and sustainability challenges’, in *Olive Mill Waste Recent Adv. Sustain. Manag. Laboratory of Environmental Bioprocesses, Centre of Biotechnology of Sfax, University of Sfax, Sfax, Tunisia: Elsevier Inc.*, pp. 1–28. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805314-0.00001-7>.
- Sounni, F. et al. (2018)** ‘Electrocoagulation of olive mill wastewaters to enhance biogas production’, *Biotechnol. Lett.*, 40(2), pp. 297–301. <https://doi.org/10.1007/s10529-017-2464-5>.
- Srivastava, A. et al. (1992)** ‘Extractive lactic acid fermentation using ion-exchange resin’, *Biotechnol. Bioeng.*, 39(6), pp. 607–613. <https://doi.org/10.1002/bit.260390604>.
- Šuranská, H. et al. (2016)** ‘Isolation, identification and characterization of regional indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains’, *Brazilian J. Microbiol.*, 47(1), pp. 181–190. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2015.11.010>.
- Tamborrino, A. et al. (2021)** ‘A real case study of a full-scale anaerobic digestion plant powered by olive by-products’, *Foods*, 10(8). <https://doi.org/10.3390/FOODS10081946>.
- Thompson, R.B. and Nogales, R. (1999)** ‘Nitrogen and carbon mineralization in soil of vermi-composted and unprocessed dry olive cake (‘orujo seco’) produced from two-stage centrifugation for olive oil extraction’, *J. Environ. Sci. Heal. - Part B Pestic. Food Contam. Agric. Wastes*, 34(5), pp. 917–928. <https://doi.org/10.1080/03601239909373235>.
- Tra Bi, C.Y. et al. (2019)** ‘Genetic diversity and population structure of *Saccharomyces*

- cerevisiae strains isolated from traditional alcoholic beverages of Côte d'Ivoire', *Int. J. Food Microbiol.*, 297, pp. 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.03.001>.
- Tsiamis, G. et al. (2012)** 'Olive-mill wastewater bacterial communities display a cultivar specific profile', *Curr. Microbiol.*, 64(2), pp. 197–203. <https://doi.org/10.1007/s00284-011-0049-4>.
- Tsigkou, K. et al. (2019)** 'Inoculum origin and waste solid content influence the biochemical methane potential of olive mill wastewater under mesophilic and thermophilic conditions', *Biochem. Eng. J.*, 151. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.107301>.
- Tundis, R. et al. (2020)** 'Olive mill wastewater polyphenol-enriched fractions by integrated membrane process: A promising source of antioxidant, hypolipidemic and hypoglycaemic compounds', *Antioxidants*, 9(7), pp. 1–15. <https://doi.org/10.3390/antiox9070602>.
- Vaz, T. et al. (2022)** 'Evaluation of the Activation Procedure on Oxone Efficiency for Synthetic Olive Mill Wastewater Treatment', *Catalysts*, 12(3). <https://doi.org/10.3390/catal12030291>.
- Ventura, G. et al. (2019)** 'Characterization of bioactive and nutraceutical compounds occurring in olive oil processing wastes', *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 33(21), pp. 1670–1681. <https://doi.org/10.1002/rcm.8514>.
- Vlyssides, A.G. et al. (2004)** 'Integrated strategic approach for reusing olive oil extraction by-products', *J. Clean. Prod.*, 12(6), pp. 603–611. [https://doi.org/10.1016/S0959-6526\(03\)00078-7](https://doi.org/10.1016/S0959-6526(03)00078-7).
- Vossen, P. (2007)** 'Olive Oil: History, Production, and Characteristics of the World's Classic Oils', *HortScience*, 42(5), pp. 1093–1100. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.42.5.1093>.
- Vuppala, S. et al. (2021)** 'Multi-response optimization of coagulation and flocculation of olive mill wastewater: Statistical approach', *Appl. Sci.*, 11(5), pp. 1–10. <https://doi.org/10.3390/app11052344>.
- Yahia, Z. et al. (2019)** 'Effect of the olive mill wastewater on corrosion behaviour of carbon steel', *Nat. Environ. Pollut. Technol.*, 18(3), pp. 995–1000.
- El Yamani, M. et al. (2017)** 'Olive oil wastewaters from northern Morocco: Physicochemical characterization and antibacterial activity of polyphenols', *J. Mater. Environ. Sci.*, 8(8), pp. 2378–2667.
- El Yamani, M. et al. (2020)** 'Physicochemical and microbiological characterization of olive mill wastewater (OMW) from different regions of northern Morocco', *Environ. Technol.*

(United Kingdom), 41(23), pp. 3081–3093.
<https://doi.org/10.1080/09593330.2019.1597926>.

Yoo, I.K. et al. (1996) ‘Effect of pH on the production of lactic acid and secondary products in batch cultures of *Lactobacillus casei*’, *J. Microbiol. Biotechnol.*, 6(6), pp. 482–486.

Zbakh, H. and El Abbassi, A. (2012) ‘Potential use of olive mill wastewater in the preparation of functional beverages: A review’, *J. Funct. Foods*, 4(1), pp. 53–65.
<https://doi.org/10.1016/j.jff.2012.01.002>.

Zerva, A. et al. (2017) ‘Valorization of Olive Mill Wastewater for the Production of β -glucans from Selected Basidiomycetes’, *Waste and Biomass Valorization*, 8(5), pp. 1721–1731. <https://doi.org/10.1007/s12649-017-9839-7>.

Zirehpour, A. et al. (2015) ‘The filtration performance and efficiency of olive mill wastewater treatment by integrated membrane process’, *Desalin. Water Treat.*, 53(5), pp. 1254–1262. <https://doi.org/10.1080/19443994.2013.855884>.

Annexes

Annexes

Annexe I

Analyses physicochimiques

1. Mesure du pH, CE, salinité

Ces paramètres sont mesurés à l'aide d'un multi paramètre modèle WTW 340i.4.

Mode opératoire

Mettre l'échantillon à analyser dans un bécher ;

- Rincer l'électrode avec de l'eau distillée.
- Plonger l'électrode du multi paramètre dans le bécher ;
- Lire ensuite les valeurs des : Salinité (PSU), pH, CE ($\mu\text{S}/\text{cm}$).

2. Mesure de la turbidité

Réduction de la transparence d'un liquide due à la présence de matière non dissout ; donc la turbidité est mesurée à l'aide d'un turbidimètre modèle WTW 430IR.

Mode opératoire

- Mettre l'échantillon à analyser dans un flacon du turbidimètre de 25 ml ;
- Nettoyer avec le papier hygiénique, homogénéiser bien et placer dans le turbidimètre ;
- Presse entrée pour lire la valeur en NTU.

3. Mesure du résidu sec (MS)

Mode opératoire

- Pesée la capsule. Soit P_1 ;
- Evaporation progressivement au bain de sable dans une capsule tarée 100 ml d'eau ;
- Une fois toute l'eau évaporée, porte la capsule à l'étuve à 180 °C pendant 4 heures et laisser refroidir 1/4 d'heure au dessiccateur ;
- Peser immédiatement et rapidement. Soit P_2 . Calcule expression des résultats :
 ϖP_1 : Poids de la capsule avant filtration (mg). ϖP_2 : Poids de la capsule après filtration (mg). ϖV : Volume filtré (L). La concentration des résidus secs est donnée par l'expression :

$$[\text{R sec}] \text{ mg/L} = \frac{p_1 - p_2}{V} * 100$$

4. Mesure de la matière en suspension (MES)

Mode opératoire

Les matières en suspension (MES) sont déterminées par filtration sur des membranes à 0,45 µm de diamètre de pore. La teneur en MES est déterminée par différence de poids du filtre avant et après filtration et séchage à l'étuve à 105 °C pendant 4 heures (AFNOR T 90-105).

5. Mesure de la Demande Chimique en Oxygène (DCO)

Mode opératoire

La méthode ST-DCO utilise moins de réactifs que la méthode DCO traditionnelle. Elle s'avère donc moins polluante. Pour préparer en laboratoire des tubes contenant le mélange réactionnel dans la gamme de mesure de 0 à 1000 mg/L, on introduira successivement avec précautions : 0,05 ml ± 0,01 ml d'une solution de dichromate de potassium à 0,1 mol/L. 0,20 ± 0,01 ml d'une solution de sulfate de mercure (II) à une concentration de 1,35 mol/L. 2,50 ± 0,01 ml d'une solution de sulfate d'agent à 12g/L dans de l'acide sulfurique concentré (d=1,83). Après avoir agité avec précautions, les tubes seront fermés puis stockés. Ils pourront être conservés pendant environ 1 an à l'obscurité. Ajoutez 2 ml de l'échantillon brute dans chaque tube.

Chauffer les tubes dans un réacteur pendant 2 heures à 148 °C Thèrmoréacteur modèle WTW.CR2200. Après laisser refroidir dans le réacteur jusqu'à la diminution de la température à 50 °C. La mesure de concentration s'effectué à l'aide d'un spectrophotomètre modèle WTW.

Résultat : Les échantillons contenant de faible teneurs en matières organiques et donc ayant une DCO faible pourront être analysée plus précisément, toujours par colorimètre, mais en mesurant la couleur jaune du chrome (VI) résiduel (dichromate de potassium non consommé pour l'oxydation) et non plus la couleur verte du chrome (III) formé par réduction. Le Cr (VI) absorbe à 440 nm, alors que le Cr (III) est dosé à 600 nm.

6. Mesure de la DBO₅

La demande biologique en oxygène (DBO₅) est mesurée à l'aide d'un DBO mètre model OXI TOP SI 12 WTW.

Mode opératoire

- Rincer le flacon avec l'échantillon. Remplir avec précaution ;
- Mesurer exactement la quantité souhaitée d'échantillon ;
- Mettre le barreau magnétique dans le flacon ;
- Insérer le godet caoutchouc dans le goulot du flacon ;
- Mettre deux pastilles de soude dans le godet caoutchouc à l'aide d'une pince. (Attention les pastilles ne doivent jamais aller dans l'échantillon) ;
- Visser l'OXI TOP directement sur le flacon échantillon (de manière étanche) ;
- Lancer la mesure appuyée sur S et M simultanément (2 secondes) jusqu'à ce que l'afficheur indique 00 ;
- Maintenir le flacon de mesure avec l'OXI TOP à 20 °C pendant 5 jours (l'échantillon est agité en continu pendant 5 jours). Pour connaître la valeur courante appuyée sur la touche M ;
- Lecture des valeurs mémorisée à la fin des 5 jours. Rappel des valeurs mémorisées : Presser S jusqu'à la valeur mesurée s'affiche (1 seconde). Passer au jour suivant en pressant à nouveau la touche S (5 seconde).

7. Dosage des graisses et des huiles

Réactif :

1. Trichloréthylène chimiquement pur.
2. Acide chlorhydrique pur.

Mode opératoire:

- Minéralisation dans les matras Distillateur La burette ;
- Dans une ampoule à décanter, prélever 1 L d'eau et acidifier à $pH = 5$ pour hydrolyser les savons et casser les émulsions éventuelles ;
- Ajouter 100 ml CCl_4 dont 25 ml servira au rinçage du flacon ayant contenu l'échantillon ;
- Agiter pendant 20 mn, puis laisser les couches se séparer ;
- Soutirer la fraction aqueuse et faire couler la phase CCl_4 dans un Erlenmeyer ;
- Ajouter 100 ml de CCl_4 dans la phase aqueuse et ajouter 20 ml, récupérer la phase aqueuse et mettre le CCl_4 avec le 1er mélange ;
- Agiter pendant 20 mn.

- Séparer les deux phases en récupérant la phase organique dans un Erlenmeyer de 500ml ;
- Recommencer l'extraction sur la phase aqueuse avec 100 ml de solvant en opérant comme ci-dessus :
 - Réunir la nouvelle phase organique avec la précédente ;
 - Effectuer la 3ème extraction avec 50 ml de solvant en agitant seulement pdt 10 mn ;
 - Procéder à l'évaporation (le chauffage ne doit pas dépasser 70 °C) ;
 - Arrêter l'évaporation une fois le volume de 20 ml atteint ;
 - Transvaser les 20 ml dans un petit erlenmeyer préalablement taré ;
 - Rincer le grand erlenmeyer avec quelques ml de solvant ;
 - Réchauffer de nouveau pendant quelques minutes ;
 - Laisser refroidir au dessiccateur ;
 - Peser erlenmeyer ;
 - Expression des résultats ;
 - La différence de poids entre erlenmeyer taré et après ajout du solvant donne la teneur en matières grasses exprimée en mg/L.

8. Dosage de l'ortho phosphates PO_4^{3-}

Réactifs

1. Solution de molybdate d'ammonium.
2. Acide sulfurique 2,5 mol/L.
3. Solution d'acide ascorbique.
4. Solution d'oxotartrate de potassium et d'antimoine.
5. Mélange des réactifs :
 - ✓ 100 ml de solution de molybdate d'ammonium.
 - ✓ 250 ml acide sulfurique 2,5 mol/L.
 - ✓ 100 ml solution d'acide ascorbique.
 - ✓ 50 ml solution d'oxotartrate de potassium et d'antimoine.

Mode opératoire

- Préparer le mélange réactif ;
- Mesurer 100 ml d'échantillon ;
- Ajouter 10 ml de mélange réactif et homogénéiser aussitôt ;

- Attendre 5 mn et mesurer l'absorbance à 885 nm par rapport à l'eau distillée ;
- Les résultats sont exprimés en mg/L à partir de la courbe d'étalonnage.

9. Dosage de l'azote total

Réactifs

1. Solution de minéralisation.
2. Solution tampon.
3. Solution de chlorure d'ammonium concentré.
4. Solution de chlorure d'ammonium dilué (g.L^{-1}).

Réactif 1 : Solution de sulfanilamide.

Réactif 2 : Solution de n-naphtyl-éthylène diamine.

Mode opératoire

- Dans un flacon, mettre 10 ml de l'échantillon (effectuer une dilution : 5 ml de l'échantillon brut + 5 ml d'eau distillée) ;
- Ajouter 15 ml de la solution de minéralisation ;
- Boucher les flacons et chauffer dans un bain de sable à 120 °C pendant 30 min ;
- Laisser l'échantillon se refroidir ;
- Après refroidissement, prélever 5 ml de l'échantillon et le mettre dans une fiole de 200 ml ;
- Ajouter 5 ml de la solution tampon ;
- Compléter le volume à 200 ml avec de l'eau distillée et homogénéiser ;
- Prendre 50 ml et ajouter 1 ml de la solution de chlorure d'ammonium concentré ;
- Verser environ 15 ml de la solution de chlorure d'ammonium dilué dans la colonne et laisser écouler ;
- Verser alors l'échantillon dans la colonne ;
- Rincer une éprouvette graduée et recueillir 25 ml de l'effluent sortant de la colonne ;
- Ajouter aussitôt 0.5 ml de réactif 1 et homogénéiser ;
- Laisser reposer entre 2 et 8 min ;
- Ajouter 0.5 ml du réactif 2 et homogénéiser ;
- Attendre au moins 10 min mais pas plus de 2 heures ;
- Mesurer l'absorbance en cuves de 1cm à 543 nm par rapport à l'eau distillée .soit A cette mesure ;
- Les résultats sont exprimés en mg.L^{-1} à partir de la courbe d'étalonnage.

10. Dosage de l'ammonium

Réactifs

1. Solution de phénol nitroprussiate ;
2. Solution alcaline d'hypochlorite.

Mode opératoire

- Prendre 100 ± 5 ml d'échantillon directement dans le flacon à réaction ;
- Ajouter 3,0 ml du réactif 1 ;
- Boucher et agiter pour bien homogénéiser ;
- Ajouter sans attendre 3,0 ml du réactif 2 ;
- Boucher et agiter à nouveau ;
- Placer immédiatement à l'abri de la lumière pendant 6 à 8 heures (ou mieux pendant une nuit) à température ambiante ;
- Mesurer l'absorbance à 630 nm en prenant de l'eau distillée comme référence ;
- Les résultats sont exprimés en mg.L^{-1} à partir de la courbe d'étalonnage.

11. Dosage des chlorures (Cl^-)

Titration au nitrate d'argent avec du chromate comme indicateur (méthode de Mohr).

Réactifs

- ❖ Nitrate d'argent 0,1 N ;
- ❖ Chromate de potassium 10 % :
 - 5g Chromate de potassium (K_2CrO_4) ;
 - 100 ml Eau distillée.

Mode opératoire

A l'aide d'une pipette, introduire 100 ml de l'échantillon préparé dans une fiole conique de 250 ml. Ajouter 1 ml d'indicateur chromate de potassium et titrer la solution par addition de goutte de solution nitrate d'argent jusqu'à ce que la solution prenne une couleur brun rougeâtre. Expression des résultats Pour une prise d'essai de 100 ml : $\text{Cl}^- = V \times 10 \times 3,55$ donne la teneur en chlorure, exprime en milligrammes de Cl par litre d'eau.

12. Dosage des nitrites

Réactifs

1. Solution de sulfanilamide.
2. Solution de N-naphtyl-éthylènediamine (NED).

Mode opératoire

- Rincer une éprouvette de 50 ml avec l'eau à analyser et y introduire 50 ± 1 ml de l'échantillon ;
- Ajouter 1,0 ml réactif 1 mélangé. Laisser reposer 2 à 8 min ;
- Ajouter 1,0 ml réactif 2 mélangé à nouveau ;
- Attendre au moins pas plus de 2 heures ;
- Mesure l'absorbance en cuve de 10 cm de trajet optique à longueur d'onde de 543 nm en prenant de l'eau distillée comme référence : soit A cette valeur ;
- Les résultats sont exprimés en mg/L à partir de la courbe d'étalonnage.

13. Dosage des nitrates

Réactifs

1. Solution de sulfanilamide.
2. Solution de N-naphtyl-éthylènediamine (NED).
3. Solution concentrée de chlorure d'ammonium (250 g/l).

Mode opératoire

- Prendre 100 ± 2 ml d'échantillon, ajouter 2,0 ml de la solution concentrée de chlorure d'ammonium et mélanger correctement ;
- Verser environ 5 ml cette solution dans la colonne et les laisser écouler : cette procédure diminue considérablement les risques d'interférences entre échantillon successifs ;
- Verser alors le reste de l'échantillon ;
- Rejeter les 30 premiers millilitres ;
- Rincer une éprouvette graduée de 50 ml avec quelques millilitres de la solution sortant de la colonne et recueillir 50 ml de l'effluent ;
- Ajouter aussitôt 1.0 ml de réactif 1 et mélanger ;
- Laisser reposer 2 à 8 min ;

- Ajouter 1 ml du réactif 2 et mélanger ;
- Attendre au moins 10 min mais pas plus de 2 heures ;
- Mesuré l'absorbance en cuves de 1cm à 543 nm par rapport à l'eau distillée ;
- Les résultats sont exprimés en mg.L^{-1} à partir de la courbe d'étalonnage.

14. Dosage du Calcium (Ca^{2+})

Réactifs :

1. EDTA Na^2 ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}8\text{Na}2\text{H}_2\text{O}$).
2. NaOH à 2 N.
3. Murexide (puparate d'ammonium).

Mode opératoire

- Prélever 50 ml de solution à doser ;
- Ajouter 3 ml de NaOH à 2 N (si l'échantillon est acidifié avec 2 ml de HNO_3 , ajouter 6 ml) ;
- Ajouter la murexide (quelques grains), on obtient une couleur rose bonbon ;
- Titrer l'EDTA à N/50 jusqu'à passage à une couleur violet pourpre soit V cette mesure. Expression des résultats Pour une prise d'essais de 50 ml : $[\text{Ca}^{2+}]$ $\text{még/l} = 0,02 \times V \times 1000 \times 5/50$ V : Volume d'EDTA titré.

15. Dosage de Mg^{2+}

Le manganèse est oxydé en permanganate à l'aide de persulfate d'ammonium en présence de nitrate d'argent. Le permanganate ainsi formé est dosé colorimétriquement.

- ❖ On a effectué le dosage de ($\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$) ;
- ❖ Les concentrations de Mg^{2+} sont calculées par la formule suivante : $[\text{Mg}^{2+}] \text{ még/L} = [\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}] - [\text{Ca}^{2+}]$.

16. Dosage de $\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$

Réactifs :

1. EDTA Na^2 ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}8\text{Na}2\text{H}_2\text{O}$).
2. Tampon ammoniacal.
3. Noir Eriochrome T (NET).

Mode opératoire

- Prélever 50 ml de solution à doser ;

- Faire chauffer à 60 °C ;
- Ajouter tampon ammoniacal ;
- Ajouter Noir d'Eriochrome (quelques grains) ;
- Titrer l'EDTA à N/50 jusqu'à passage à une couleur bleu cobalt. Soit V cette mesure.

Pour une prise d'essais de 50 ml : $[Ca^{2+} + Mg^{2+}] \text{ m\acute{e}q/L} = 0,02 \times V \times 1000 \times 5/50$.

17. Dosage des sulfates (SO_4^{2-})

Réactifs

1. Solution d'acide chlorhydrique au 1/10 ;
2. Solution de Tween 20 à 25 ;
3. Solution sulfate de baryum stabilisé : 10 g chlorure de baryum. 20 ml Tween 20. 100 ml l'eau distillé.

Mode opératoire

- Dans une fiole, introduire successivement ;
- 50 ml de l'échantillon à analyser ;
- Ajouter 1 ml d'acide chlorhydrique à 1/10 ;
- Ajouter 5 ml de la solution sulfate de baryum stabilisé ;
- Agiter et laisser reposer pendant 15 mn ;
- Agiter à nouveau et passer au spectrophotomètre à la longueur d'onde 680 nm.

Remarque : La mesure de l'absorbance s'effectué à l'aide d'un spectrophotomètre modèle WTW.

Annexe II

Analyse microbiologique

Recherche et dénombrement des Coliformes :

Cette méthode de routine -la technique du nombre le plus probable (NPP)-, consiste à la recherche et le dénombrement des bactéries coliformes, coliformes thermo tolérants et des *Escherichia coli* dans les eaux destinées à la consommation humaine, et en milieu liquide en générale.

Mode opératoire

La recherche et le dénombrement des bactéries coliformes, coliformes thermo tolérants et des *Escherichia coli* dans les eaux, en milieu liquide par la technique du NPP, se fait en deux étapes consécutives :

- ✓ le test de présomption: réservé à la recherche des Coliformes ;
- ✓ le test de confirmation : réservé à la recherche des Coliformes thermo tolérants et *Escherichia coli*.

➤ Test de présomption

A partir de l'eau à analyser, porter aseptiquement :

- 50 ml dans un flacon contenant 50 ml de milieu BCPL D/C muni d'une cloche de Durham ;
- 5 fois 10 ml dans 5 tubes contenant 10 ml de milieu BCPL D/C muni d'une cloche de Durham ;
- 5 fois 1 ml dans 5 tubes contenant 10 ml de milieu BCPL S/C muni d'une cloche de Durham.

-Chassez l'air éventuellement présent dans les cloches de Durham et bien mélangé le milieu et l'inoculum. L'incubation se fait à 37 °C pendant 24 à 48 heures.

Lecture

Seront considérés comme positifs, les tubes présentant à la fois : Un dégagement de gaz (supérieur au 1/10^e de la hauteur de la cloche), Un trouble microbien accompagné d'un virage du milieu au jaune (ce qui constitue le témoin de la fermentation du lactose présent dans le milieu). Ces deux caractères étant témoins de la fermentation du lactose dans les conditions opératoires décrites. La lecture finale se fait selon les prescriptions de la table du NPP qui Figure en annexe.

Illustration

Inoculum	Test de présomption	Nombre Caractéristique
1 X 50 ml	+	1
5 X 10 ml	+	3
	+	
	+	
	-	
	-	
5 X 1 ml	+	2
	+	
	-	
	-	
	-	

Le nombre caractéristique est donc « 132 » ; ce qui correspond sur la table NPP au nombre 14. On considère alors qu'il y a 14 Coliformes par 100 ml d'eau à analyser.

➤ **Test de confirmation**

Le test de confirmation est basé sur la recherche de Coliformes thermo tolérants parmi lesquels on redoute surtout la présence d'Escherichia coli. Les coliformes thermo tolérants ont les mêmes propriétés de fermentation que les coliformes mais à 44°C. Escherichia coli est un coliforme thermo tolérant qui entre autre : produit de l'indole à partir du tryptophane présent dans le milieu à 44°C, donne un résultat positif à l'essai au rouge de méthyl, ne produit pas de l'acétyl méthyl carbinol, n'utilise pas le citrate comme source unique de carbone. Les tubes de BCPL trouvés positifs lors du dénombrement des Coliformes feront l'objet d'un repiquage à l'aide d'une öse bouclée dans tube contenant le milieu Schubert muni d'une cloche de Durham. Chasser l'air éventuellement présent dans les Cloches de Durham et bien mélanger le milieu et l'inoculum. L'incubation se fait cette fois-ci au bain marie à 44°C pendant 24 heures.

Seront considérés comme positifs, les tubes présentant à la fois :

- ✓ Un dégagement gazeux ;
- ✓ Un anneau rouge en surface, témoin de la production d'indole par Escherichia coli après adjonction de 2 à 3 gouttes du réactif de Kowacs.

La lecture finale s'effectue également selon les prescriptions de la table du NPP en tenant compte du fait qu'Escherichia Coli est à la fois producteur de gaz et d'indole à 44°C.

Illustration

En reprenant l'exemple précédent relatif au dénombrement des Coliformes, cela suppose que nous avons 6 tubes à repiquer à savoir :

- ❖ le flacon de BCPL D/C ;
- ❖ 3 tubes sur 5 de BCPL D/C ;
- ❖ 2 tubes sur 5 de BCPL S/C.

Inoculum	Test de présomption	Nombre Caractéristique	Test de confirmation		Nombre Caractéristique
			Gaz	indole	
1 X 50 ml	+	1	+	+	1
5 X 10 ml	+	3	+	-	1
	+		+		
	+		+		
	-		+		
	-				
5 X 1 ml	+	2	-	+	1
	+		+		
	-				
	-				
	-				

Tableau Récapitulatif Le nombre caractéristique relatif au dénombrement des Coliformes fécaux est donc «111», ce qui correspond sur la table du NPP au chiffre 5.

Le résultat final sera donc de :

- ❖ 14 Coliformes totaux dans 100 ml d'eau à analyser.
- ❖ 5 Coliformes fécaux dans 100 ml d'eau à analyser.

Remarque :

Etant donné que les Coliformes fécaux font partie des Coliformes totaux, il est pratiquement impossible de trouver plus de Coliformes fécaux que de Coliformes totaux.

Tableau 02 : Critères microbiologiques d'analyses des aliments de l'association, française de normalisation (AFNOR).

Paramètres microbiologique	Unités	Valeurs maximales
Germe aérobies mésophiles (GAME)	germes/g	< 3 -105
Coliformes totaux (CT)	germes/g	< 103
Coliformes Fécaux (CF)	germes/g	< 103
Germes anaérobies sulfite réducteurs (GASR)	germes/g	< 30
Salmonella Shigella	germes/g	absence dans 25 g
Levures et moisissures	germes/g	absence
Streptocoque Fécaux	germes/g	absence

Annexe III**Milieux de cultures****● Milieu Oxytétracycline Glucose Agar (O.G.A)**

-Extrait de levure	5g
-Glucose	20 g
-Agar	16g
-Eau distillée	1000ml
-pH	6,8-7

Stériliser 20 min à 120°C

Ajouter au milieu refroidi à 50°C une solution d'Oxytétracycline (terramycine). La concentration en Oxytétracycline doit être de 0,10 mg/ml de milieu de culture. Incubation ; 20 à 25 °C pendant 2 à 5 jours.

Milieu d'identification de levure**● Milieu eau de levure**

-Extrait de levure	5g
-Eau distillée	1000 ml
Ajuster à pH	7

Stériliser 20min à 120 °C.

● Eau physiologique

-Chlorure de sodium	8,5g
-Eau distillée	1000 ml

Stériliser après mélanger à l'autoclave pendant 15 minutes à 120 °C.

● Eau peptone exempte d'indole

-Chlorure de sodium	5g
-Peptone exempte	10g
-pH	7,2

● Gélose nutritive ordinaire

- Peptone	10 g/L
- Extrait de viande	5 g/L
- Chlorure de sodium	5 g/L
- Agar-agar	15 g/L
- pH	7,2

Le milieu est stérilisé à 120 °C pendant 20 min

● Gélose Chapman

- Tryptone	5g/L
- Extrait de levure	3g/L
- Extrait de viande	3g/L
- Chlorure de sodium	70g/L
- Peptone Bactériologique	10g/L
- Mannitol	10g/L
- Rouge de Phénol	0,05g/L
- Agar	7,4±0,1

Stérilisé à 120 °C pendant 20 min.

● Milieu mannitol mobilité

- Peptone	20g
- Gélose	4g
- Mannitol	2g
- Rouge de phénol	0,04g
- Nitrate de potassium	1g
- pH	8,1

Le milieu est réparti dans des tubes à essais, stérilisé à 120 °C durant 15 min.

● Milieu Clarck et Lubs

- Peptone thropsine de caséine	5g/L
- Glucose	5g/L
- Phosphate bipotassique	5g/L

Répartir en tube à raison de 5 ml par tube. Stériliser à 115 °C pendant 20 mn.

● Bouillon Nitrate réductase

- Infusion coeur-cervelle	25,0 g/L
- Nitrate de sodium	10,0 g/L

● Milieu TSI

- Agar	12g/L
- Extrait de boeuf	3g/L
- Extrait de levure	3g/L
- Peptone	20g/L
- Lactose	10g/L
- Saccharose	10g/L
- NaCl	5g/L

- Glucose 1g/L
- Citrate ferrique 3g/L
- Thiosulfate de sodium 3g/L
- Rouge de phénol 0,025g/L
- pH 7,4

Stériliser à 120 °C pendant 20min.

● Citrate de Simmons

- Chlorure de sodium 5g/L
- Sulfate de magnésium 7420 0,2 g/L
- Phosphate d'ammonium PO_2H_2 1g/L
- Phosphate dipotassique PO_4HK_2 2g/L
- Citrate trisodique 2g/L
- Solution de bleu bromothymol 8g/L
- Agar 15 g/l
- pH 7-7,2.

Répartir en tube à raison de 7 ml par tube et Stériliser à 120 °C pendant 30 min.

● Muller Hinton

- Extrait de viande 3g/L
- Hydrolysate acide de caséine 17,5g/l
- Amidon 1,5g/l
- Agar 16g/l
- pH 7,3

Stérilisé à 120 °C pendant 20 min.

Milieu d'isolement

Milieu MRS (Man Rogosa et Sharpe, 1960)

composants	g/L
peptone	10
Extrait de viande	8
Extrait de levure	4
glucose	20
Acétates de sodium trihydraté	5
Citrates d'ammonium	2
Tween 80	1ml
Hydrogénophosphate de potassium	2
Sulphate de magnésium heptahydraté	0,2
Sulfate de manganèse tétrahydraté	0,05
Agar	

Production Scientifique

Production Scientifique

Publications internationales

Classe A :

- ✓ Lactic acid production by immobilization of *Lactobacillus* sp. Isolated from olive mill wastewater doi:10.5004/dwt.2022.28324 Desalination and Water Treatment www.deswater.com

Khadidja Ayadi^{a*}, Malika Meziane^b, Khadidja Bounedjar^b, Djamila Tahraoui Douma^b, Souhila Bensouna^b, Mohammed Fellah^b, Khaled El-Miloudi^c.

Classe B:

- ✓ Olive Mill Wastewater for Bioethanol Production using Immobilised Cells <https://doi.org/10.15255/KUI.2021.015> KUI-3/2022.

K. Ayadi^{a*} M. Meziane^b D. Rouam^b M. N. Bouziane^b and K. El-Miloudi^c.

Communications internationales

- SIEE 20, 21, 22 Novembre 2018 ;
- FRACT'4 26-29 Novembre 2018 ;
- International Workshop on applied chemistry 12-14 Décembre 2018;
- 3e journées méditerranéennes sur l'Agrumiculture 21 au 23 Janvier 2019;
- International Conference on Water and Energy (ICWE'2021) 25-27 Mai 2021;
- Eskisehir Technical University 02-16 Janvier 2023.

Communication nationales

- Water and Energy 21 May 2012;
- SNEE'2014 26 et 27 Novembre 2014;
- Journée scientifique sur les biotechnologies 01 Mars 2018 ;
- DST'01-2019 13-14 Novembre 2019;
- The first national seminar of nutrition and health 16-17 Décembre 2019;
- DST'02-2022 26-27 Octobre 2022.
- CNEDD'2020 : Conférence nationale sur l'environnement et le développement durable 22-23 Janvier 2020 Mascara.
- The second national seminar of nutrition and health SNSN'2023: 30-31 Mai 2023.

Activités scientifiques

- Stage Scientifique Eskesehir Turquie 2023.

Olive Mill Wastewater for Bioethanol Production using Immobilised Cells

K. Ayadi,^{1*} M. Meziane,² D. Rouam,³
M. N. Bouziane,³ and K. El-Miloudi²

¹Laboratoire Eau et Environnement, Faculté de Technologie, Université Hassiba Benbouali de Chlef, Algérie

²Laboratoire Bio-Ressources Naturelles, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Hassiba Benbouali de Chlef, Algérie

³Laboratoire Physique Théorique et Physique des Matériaux, Faculté de Technologie, Université Hassiba Benbouali de Chlef, Algérie

<https://doi.org/10.15255/KUI.2021.315>

KUI-3/2022

Original scientific paper

Received March 13, 2021

Accepted October 13, 2021

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License



Abstract

Physicochemical and microbiological characteristics of a local traditional olive mill wastewater, at Ermaakria-Chlef in northern Algeria, were evaluated. The olive mill wastewater samples had slight acidity of 0.65 % with a pH = 4.88, and electrical conductivity of 34 mS cm⁻¹. The chemical oxygen demand (COD) and the biological oxygen demand (BOD₅) reached up to 183 g l⁻¹ and 7 g l⁻¹, respectively. In addition, the samples showed 1.72 g l⁻¹ of total phenolic compounds. Preliminary microbiological analysis of the wastewater showed the presence of various microorganisms represented especially by lactic acid bacteria and *Enterococcus* sp. In the aim of this work was to investigate the possibility of using yeast strains isolated from olive mill wastewater in the fermentation of the latter. The results shown that fermentation with yeast can produce ethanol at an extent of 1.4 % (v/v). This can constitute a strategy for treating mentioned wastewater and transforming it into valuable biomolecules.

Keywords

Olive mill wastewater, physicochemical parameters, microbial composition, immobilised cells fermentation, bioethanol

1 Introduction

Many Mediterranean countries are facing the problem of eliminating effluents from the olive oil production industry.^{1,2} Olive mill wastewater (OMW) is highly polluting, heavily loaded with organic matter, and particularly affects the quality of the natural environment in which it is discharged.³ The high organic load of OMW requires a high oxygen consumption, expressed in terms of chemical oxygen demand (COD) and biological oxygen demand (BOD), leading to eutrophication of surface water.⁴ OMW also reduces soil quality by increasing its water repellence due to the presence of aliphatic compounds in addition to the presence of polyphenols known for their phytotoxic effect preventing seed germination and plant growth.^{5,6}

The literature shows a variety of approaches for the treatment of OMW before disposal in nature.⁷ The wide variety of components found in OMW requires different treatment technologies to eliminate pollutants with harmful effects on the environment. Various processes are applicable, such as biological,⁷ physicochemical,⁸ and heat treatments.⁹ Membrane filtration, electrochemical treatment, and osmotic distillation are also reported for the treatment of OMW, among other methods.^{10,11}

Proper management of industrial, agricultural, and food residues should reduce their negative impact on the envi-

ronment. In the last decade, the valorisation of OMW has attracted much attention from research teams. It has been shown that an environmental issue could be turned into valuable products¹² such as biofuel,¹³ bioactive and nutraceutical compounds,¹⁴ antibacterial and anti-inflammatory compounds,¹⁵ anti-oxidant compounds¹⁶ along with the common polyphenols.^{15,16}

In the fermentation process of biofuel production, the use of cell immobilisation has many benefits. It avoids the washing effect of microorganisms, stabilises the pH of the medium, and prolongs microbial activity during continuous processes. Cellular immobilisation technology allows multiple uses of the cellular system and reduces the inhibitory effect of metabolic products. In addition, the undesirable competition between different microorganisms may be reduced after immobilisation and the synergistic effect would be favoured.¹⁷

The purpose of this study was to investigate the possibility of producing bioethanol from OMW fermented by immobilised cells. Granulated puzozolan or bovine bones were chosen as immobilisation supports because of their high porosity and surface roughness promoting cell adhesion, as well as availability and very low cost. The working microorganisms used in the fermentation process were yeast strains isolated and grown from the same OMW. The effectiveness of the proposed anaerobic fermentation was investigated in the light of bioethanol production.

*Corresponding author: Dr Khoulilqa Ayadi
Email: kayadi@univ-chlef.dz

Lactic acid production by immobilization of *Lactobacillus* sp. isolated from olive mill wastewater

Khadidja Ayadi^{a,b,*}, Malika Meziane^b, Khadidja Bounedjar^b, Djamila Tahraoui Douma^b, Souhila Bensouina^b, Mohammed Fellah^b, Khaled El-Miloudi^c

^aLaboratoire Eau et Environnement, Faculté de Technologie, Université Hassiba Benbouali de Chlef, Algérie, email: k.ayadi@univ-chlef.dz (K. Ayadi)

^bLaboratoire Bio-Ressources Naturelles, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Hassiba Benbouali de Chlef, Algérie

^cLaboratoire Physique Théorique et Physique des Matériaux, Faculté de Technologie, Université Hassiba Benbouali de Chlef, Algérie

Received 30 July 2021; Accepted 13 December 2021

ABSTRACT

The aim was to investigate the production of lactic acid by *Lactobacillus* sp. isolated from olive mill wastewater (OMW). The bacterial strains were immobilized on bovine bone and pozzolan supports. The best acidifying activity was detected in the strain Lb16 (*Lb. rhamnosus*) with an acidity equal to 45°D. All fermentations exhibited a biphasic growth (diastase). The best lactic acid production was noted in MRS (de Man, Rogosa and Sharpe) broth with the strain immobilized in continuous culture on pozzolan (17 g L⁻¹) and bovine bone (11 g L⁻¹), in non-supplemented OMW medium with bovine bone support in batch mode (6.2 g L⁻¹), 4.5 g L⁻¹ on the pozzolan support and 3.8 g L⁻¹ on the bovine bone support at continuous mode. For OMW medium supplemented with 25% whey, the best lactic acid production by *Lb. rhamnosus* was seen in a discontinuous batch with 8.1 g L⁻¹ on bovine bone support, followed by 7.4 and 6.4 g L⁻¹ respectively on the pozzolan and bovine bone in continuous mode. The study has demonstrated that it is possible for an agri-food effluent (i.e., olive mill wastewater) to produce a valuable biochemical product (i.e., lactic acid). Further work is needed to optimize process parameters such as the optimal OMW/whey ratio and nutrient supplementation.

Keywords: Lactic acid; *Lb. rhamnosus*; Olive mill wastewater; Physicochemical parameter; Microbial composition; Immobilized cells fermentation

1. Introduction

Lactic acid is a naturally occurring organic acid that can be used in a wide variety of applications, such as cosmetics, pharmaceuticals, chemicals, food, and medicine [1]. It can be obtained eco-friendly by the fermentation of sugars found in renewable resources [1,2]. Furthermore,

Lactobacillus, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, and *Pediococcus* have been employed as starter cultures in industrial food fermentations. Among these, *Lactobacillus* strains are of great commercial importance due to their high acid tolerance, high yield, and high productivity [3]. They can be engineered for the selective production of L/D-lactic acid [1,2]. Many studies have been reported on

* Corresponding author.

Presented at the International Virtual Conference on Water and Energy (ICWE 11), Hassiba Benbouali University of Chlef, Algeria, 25–27 May 2021
1844-3994/2044-2086 © 2022 Desalination Publications. All rights reserved.