

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

جامعة أمحمد بوقرة بومرداس



Université M'Hamed Bougara de Boumerdes

Faculté des sciences

Département de Biologie

**Mémoire de fin d'étude**

En vue de l'obtention du diplôme de Master en Biotechnologie

Domaine : Biologie

Spécialité Biotechnologie Microbienne (B.T.M)

**Thème :**

Etude de la biodiversité des moisissures utiles isolées à partir des margines issus des maâsras de trois régions : Boumerdès, Béjaia et Tizi Ouzou.

**Dirigé par :**

**Mme SAHIR-HALOUANE F.**

**Soutenu devant le jury : le 10/07/2018**

**Mme BENZINA F. MCA (UMBB)**

**Mme HELLADJ F. MCB (UMBB)**

**Mme HALOUANE F. Pr (UMBB)**

**Réalisé par :**

**-BERKAT Amina**

**-MEDELFEF Fatma Z.**

**Présidente.**

**Examinatrice.**

**Promotrice.**

**2017/2018**



# Dédicaces



*Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut...*

*Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude ...*

*L'amour, le respect, la reconnaissance...*

*Aussi, c'est tout simplement que je dédie ce modeste travail à celle qui m'a donné la vie; qui s'est sacrifiée pour ma réussite et mon bonheur, A celle qui attend chaleureusement ce jour à ma mère, Puisse Dieu de m'aider à la rendre plus fière de moi; merci maman **Fatma Zohra**.*

*A Mon père **Abdellah** symbole de tendresse, qui a veillé tout au long de ma vie à m'encourager; m'aider et me protéger.*

*A Mes adorables sœurs **Assia** et son époux **Ahmed**, A **Imen**, **Rima**, **Ouarda** et **Sabrina** à qui je souhaite tout le bonheur du monde*

*A mon chère frère **Adel** et son épouse **Lamia** et sa fille **Malek** et sa famille **Mahmoudi**, et A mes chères **Imed** et **Nadjib** à qui je souhaite beaucoup de succès.*

*À **Ali** qui m'a soutenu et encouragé dans mes moments le plus difficile merci d'être dans ma vie je te souhaite que bonheur et la joie dans ta vie seulement avec moi*

*A Toute la famille **Berkat** ainsi que la famille **Madjour** pour lesquelles j'éprouve beaucoup d'affection et de respect.*

*A tous mes chères amies **Ouardia**, **Razika**, **Amina**, **Houda**, **Ibtissem**, **Hassiba**, **Houda**, **Zineb**, **Rekaia**, **Merieme**, **Assma**, **Imen** et **Samah** pour leurs soutiens et leurs bénédictions.*

*A mon adorable intime et binôme **Medelfef Fatma Zohra** et toute sa famille. Sans oublier les membres de notre club scientifique **Bio-Best** surtout **Abdelaziz**, **Radouane**, **Hicheme**, **Rabeh**, **Marouane**, **Amine**, **Youssef**, **Afef**, **Sara**, **Fadoua** et **Abdelrazek**, **Ouahid**, **Farid Zakaria**.*

*A toute les personnes que j'aime*

**Berkat**



*Aux deux êtres les plus chères à ma vie qui ont su m'apporter amour, tendresse et qui m'ont inculqué, la droiture, la persévérance, la sérieuse honnêteté, à vous courageux père **Lounes** et à vous tendre mère **Baya***

*A tous les familles **Medelfaf** et **Meflah**.*

*A mes chers frère **Khalel** et **Boubakeur**.*

*A mes chères sœurs **Radia**, **Lila**, **Hassiba** et **Halima**.*

*A mes tantes, **Dalila**, **Karima** et **Djamila**.*

*A mes amiables neveux et nièces.*

*A mes adorables voisines **Kamelia**, **Amira** et **Mounia**.*

*A mon chère ami **Ilyes** merci d'être dans ma vie je te souhaite que bonheur et la joie dans ta vie seulement avec moi .*

*J'ai le grand plaisir de dédier ce travail à ma deuxième mère tante **Fatima** pour son amour et bienveillance encouragement et soutien continu mes proches qu'elles sont toujours en bonne santé et à côté de moi.*

*A tous ceux qui partagent avec moi cette réussite.*

***Medelfaf Fatma Zohra***

## *Remerciements*

*En premier lieu nous remercions ALLAH le tout puissant de nous avoir donné la volonté, la sante et le courage pour réaliser ce travail*

*Nous remercions Madame HALOUANE- SAHIR F. Professeur à l'université M'Hamed Bougara de Boumerdes, faculté des sciences, notre encadreur de mémoire pour l'important sujet qu'elle nous a proposée Nous vous devons le meilleur accueil que vous nous 'avez réservé dans votre laboratoire, Qu'elle trouve ici l'expression de nos vive reconnaissance pour son encadrement, sa disponibilité et son aide précieuse.*

*Au terme de ce travail nous tenons à exprimer nos remerciements et nos sincères gratitude à Monsieur REGHMIT N. doctorant en biologie à l'université M'Hamed Bougara de Boumerdes auquel nous réservons une attention toute particulière et la mise à notre disposition de tous les moyens pour nous permettre de réaliser nos travaux dans les meilleures conditions.*

*Vous nous 'avez fait bénéficier de vos conseils et suggestions pertinentes qui nous 'ont aidé à avancer dans ce travail, vous nous 'avez tant aidé et supporté au moment où nous 'en avions le plus besoin. Aucun mot ne pourrait exprimer nos remerciements et nos vive gratitude, et que le présent travail soit un faible témoignage de notre très haute reconnaissance et notre profond respect. Merci pour tout.*

*Nous voudrions exprimer notre gratitude à l'ensemble des membres du jury de ce mémoire Madame l'examinatrice HALLADJ F, et le président du jury Madame BEN ZINA F. pour l'honneur qu'ils nous 'ont fait en acceptant d'apporter leur jugement sur ce travail. Vos commentaires et vos critiques lors de soutenance nous seront précieuses.*

*Nous tenons à exprimer notre profonde reconnaissance à madame CHAHED F chef de département de contrôle de qualité microbiologique de la laiterie et fromagerie Boudouaou, ainsi que tout le personnel de la laiterie qui, sans leur collaboration et leur aide, nous n'aurions pu surmonter bon nombre de difficultés dans notre travail.*

*Nous tenons un immense Merci à tous les mètres de la spécialité et camarades de promotions de master 2018 pour l'ambiance et l'enthousiasme inoubliable. En particuliers Houda et Ibtissem pour*

*leur soutiens moral qu'elles nous ont offert toujours ainsi que leurs aide dans la rédaction de ce travail, malgré leur occupation elles étaient toujours présentes sans oublier Hassiba, Yasmine et Abelrazzak qui nous ont aidés à rédiger ce manuscrit et pour leur soutien moral et leur précieuse aide.*

*Un ENORME merci à tous ceux qui nous 'ont aidé, nous 'ont conseillé, nous 'ont ouvert leurs portes, parfois même avec un sourire, et qui se reconnaîtront sans que nous n'avons à citer leurs noms.*

*Enfin, nous 'adressons nos remerciements aux propriétaires des huileries qui nous 'ont fourni les margines, nous leur dois nos reconnaissances les plus sincères.*



Table des matières	
Remerciement	
Dédicaces	
Liste des abréviations	
Liste des Figures	
Liste des photos	
Liste des tableaux	
Introduction.....	1

## **Chapitre I : Synthèse bibliographique**

<b>Partie I.1. L'olivier.....</b>	<b>3</b>
I.1.1. Historique.....	3
I.1.2. Origine et expansion.....	3
I.1.3. Nomenclature.....	4
I.1.4. Systématique.....	5
I.1.5. L'oléiculture.....	5
I.1.5.1. Dans le monde.....	5
I.1.5.2. En Algérie.....	6
I.1.6. Profil variétal en Algérie .....	7
I.1.7. Description morphologique.....	8
I.1.8. Importance de l'olivier.....	9
I.1.9. Technologie de fabrication de l'huile d'olive.....	9
<b>I.2. Les sous-produits de l'olivier</b>	
I.2.1. Grignons ou tourteaux.....	13
I.2.2. Les margine.....	13

II.2.2.1. Définition.....	13
I.2.2.2.Appellations.....	14
I.2.2.3.Origine des margines.....	14
I.2.2.4. Caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques des margines.....	15
I.2.2.4.1.Caractéristiques physico-chimiques.....	15
I.2.2.4.1.1.Caractérisation physique des margines.....	15
I.2.2.4.1.2.Caractérisation chimique des margines.....	15
I.2.2.4.2.3.Caractérisation microbiologique des margines.....	18
I.2.2.4.2.4. Diversité bactérienne dans les margines.....	18
I.2.2.4.2.5. Diversité fongique dans les margines.....	19
I.2.2.5. Effets biologiques des margines.....	20
I.2.2.6.L'impact des margines.....	20
I.2.2.6.1.Pouvoir polluant des margines.....	21
I.2.2.6.2. Manque à gagner.....	22
I.2.2.7. Différentes filières de valorisation des margines.....	22
I.2.2.8. Procédées de traitement des margines.....	25
 <b>I.3. Les champignons : un règne diversifié et méconnu</b>	
I.3.1. Généralité.....	25
I.3.2. Méthodes d'identification des champignons filamenteux.....	26
I.3.2.1. Etude morphologique.....	26
I.3.2.2. Approche chimique.....	28
I.3.2.3. Analyse moléculaire.....	28
I.3.3. Les phylums fongiques.....	28

I.3.4. Développement des champignons filamenteux.....	29
I.3.5. Importance des moisissures.....	30

## **Chapitre II. Matériels et méthodes**

### II.1. Matériels

II.1.1. Matériel végétale.....	35
II.1.1.1. Prélèvement d'échantillons.....	36
II.1.1.2. Matériel non biologiques.....	36

### II.2. Méthode

II.2.1. Paramètres analytiques de base des margines.....	37
II.2.1.1. Etude physico-chimique des margines.....	38
II.2.1.1.1. Mesure de ph.....	38
II.2.1.1.2. Conductivité électrique et la salinité.....	39
II.2.1.1.3. Matière en suspension (MES).....	40
II.2.1.1.4. Détermination de la matière minérale en suspension (MMS) et la matière volatile en suspension (MVS).....	41
II.2.1.1.5. Spectroscopie infrarouge IR-TF.....	42
II.2.1.1.6. Détermination de la DCO selon la méthode de kit Hach LCK 114/314.....	43
II.2.1.1.7. Détermination de la DBO <sub>5</sub> .....	44
II.2.1.1.8. L'indice de la biodégradabilité (Ib).....	45
II.2.1.2. Etude microbiologiques des margines.....	45
II.2.1.2.1. Préparation des dilutions décimales.....	46
II.2.1.2.2. Recherche et dénombrement des souches.....	47
II.2.1.2.2.1. La flore totale aérobie mésophile (FMAT).....	47
II.2.1.2.2.2. Les coliformes totaux, les coliformes fécaux.....	49

II.2.1.2.2.3. Les Streptocoques fécaux .....	50
II.2.1.2.2.4. Staphylocoques .....	52
II.2.1.2.2.5. Les Salmonelles.....	54
II.2.1.2.2.6. Les bactéries lactiques mésophiles.....	55
II.2.1.2.2.7. Les Levures et moisissures.....	56
II.2.1.2.2.8. Conservation sur gélose inclinée.....	56
II.2.1.2.3. Identification des champignons filamenteux mésophiles.....	59
II.2.1.2.4. La mise en évidence de l'activité lipolytique de certaines souches.....	60

### **Chapitre III : Résultats et discussion**

#### **III.1.1. Les caractéristiques physico-chimiques**

<b>III.1.1.1.</b> Le pH.....	61
<b>III.1.1.2.</b> La conductivité électrique et la salinité.....	63
<b>III.1.1.3.</b> La matière en suspension (MES), La matière minérale (MMS) et la matière volatile (MVS) .....	65
<b>III.1.1.4.</b> La spectroscopie infra-rouge MIR-FTIR.....	67
<b>III.1.1.5.</b> Les DBO <sub>5</sub> et DCO.....	68
<b>III.1.1.6.</b> Les matières Oxydables (MO <sub>x</sub> ).....	69
<b>III.1.1.7.</b> L'indice de biodégradabilité (Ib) .....	69
<b>III.1.2.</b> Paramètres microbiologique des margines.....	60
<b>III.1.2.1.</b> Résultat de la recherche et dénombrement des germes	
III.1.2.1.1. Dénombrement de la flore totale aérobie mésophile (FMAT).....	71
III.1.2.1.1. Dénombrement des coliformes totaux, Coliformes et streptocoques fécaux.....	72
III.1.2.1.1. Recherche de la flore pathogène (Salmonelles et Staphylocoques)....	73

III.1.2.1.2. Dénombrement des Bactéries lactiques (BL) .....	74
III.1.2.1.3. Dénombrement des levures et des moisissures mésophiles.....	75
III.I.2.2. L'isolement et l'identification des souches fongiques.....	96
III.I.2.1.2. Le relevé de souches fongiques les plus abondantes.....	99
III.I.2.1.3. La mise en évidence de l'activité lipolytique.....	103
Conclusion.....	105

Annexe

Référence

Résumé

## Liste des abbreviations

---

- **AFNOR** : Association française de normalisation.
- **AOAC** : Association of Official Analytical Chemists.
- **C** : *Candida*.
- **COI** : Conseil Oléicole International.
- **CT** : Coliformes Totaux.
- **DBO**: Demande Biochimique en Oxygène.
- **DCL**: Désoxycholate Citrate lactose.
- **DCO**: Demande Chimique en Oxygène.
- **DSA**: Direction des Services Agricoles.
- **DSASI** : Direction des Statistiques Agricoles et des Systèmes d'Information.
- **EPEI** : Eau Peptonée Exempte d'Indol.
- **FAO**: Food and Agriculture Organization.
- **FMAT**: Flore Mesophile Aerobie Totale.
- **FMS**: Fermentation sur Milieu Solide.
- **G** : *Geotrichum*.
- **GN**: Gélose Nutritive.
- **Gr** : Grossissement.
- **HACCP** : Hazard Analysis Control Critical Point (analyses des risques et points critiques pour leur maîtrise).
- **HPLC**: High Performance Liquide Chromatography.
- **HR**: Humidité Relative.
- **IB**: Indice de Biodégradabilité.
- **INRA** : institut national de la recherche agronomique.
- **Ir-tf** : Infrarouge.
- **ISO**: organisation international de normalisation.
- **KBr**: Bromates de calcium.
- **K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>**: dichromate de potassium.
- **LFB**: Laiterie et fromagerie de Boudouaou.
- **MES** : Matière En Suspension.
- **MM** : Matière Minérale
- **Mox** : Matière organique oxydable.
- **MRS** : Man Rogosa et Sharpe.
- **MV** : Matière Volatile.

## Liste des abbreviations

---

- **N** : Normalité.
- **NA** : Norme Algérienne.
- **NCBI**: National Center for Biotechnology Information.
- **NFT**: Normal For Tiverton.
- **NM**: Norme Mondiale.
- **NPP** : Nombre le Plus Probable.
- **OMW**: olive mill waste water.
- **ONFAA**: Observation National des Filières Agricole et Agro-alimentaires.
- **P** : poids.
- **P**: Pichia.
- **PCA**: Plate Count Agar.
- **PCR**: Polymérase Chain Réaction.
- **PDA**: Potato Dextrose Agar.
- **R**: *Rhodotorula*.
- **RFLP**: Restriction Fragment Length Polymorphism.
- **S** : Salinité.
- **S**: Saccharomyces.
- **S/C**: Simple Concentration.
- **SF** : Streptocoques Fécaux.
- **SFB** : Bouillon au Sélénite de Sodium.
- **SH**: Substrat Hydrophobe.
- **SOS**: Substrat Oléicole Solide.
- **Sp** : Espèce non précise.
- **S-S** : Shigelle-Salmonelle.
- **Subsp** : Sous espèce.
- **Tab** : Tableau.
- **TGEA** : Tryptone Glucose Extrait d'Agar.
- **UE** : Union Européen.
- **UFC** : Unité Formant Colonie.
- **UI** : Unité Internationale.

## Liste des figures

---

<b>Figure 01 :</b> Localisation de l'olivier autour de bassin méditerranéen.....	11
<b>Figure 02 :</b> la composition physique de l'olive.....	13
<b>Figure 03 :</b> La cueillette des olives par les différentes méthodes.....	14
<b>Figure 04:</b> Operations préliminaires de l'olive.....	15
<b>Figure 05 :</b> Le broyage d'olive Avec des moulins en pierre traditionnelle ou Avec disques moderne.....	15
<b>Figure 06 :</b> Le malaxage d'olive Traditionnelle et Moderne.....	16
<b>Figure 07 :</b> Distribution de phylotypes bactériens les margines.....	23
<b>Figure 08 :</b> Distribution des champignons dans les margines.....	24
<b>Figure 09 :</b> Quelques genres des champignons filamenteux.....	25
<b>Figure 10:</b> Localisation géographique des régions concernées par la collecte des margines.....	35
<b>Figure 11:</b> Organigramme de la procédure expérimentale.....	37
<b>Figure 12:</b> Mesure de pH des margines.....	38
<b>Figure 13:</b> Les étapes de mesure de la matière en suspension des margines .....	40
<b>Figure 14:</b> Les étapes de mesure de la matière minérale des margines .....	41
<b>Figure 15 :</b> Les étapes de mesure au spectre Infrarouge des margines.....	42
<b>Figure 16:</b> Différente étapes de mesure de la DCO des margines.....	43
<b>Figure 17:</b> Différente étapes de mesure de la DBO <sub>5</sub> des margines.....	44
<b>Figure 18:</b> Préparation des dilutions décimales des margines des trois régions.....	45
<b>Figure 19:</b> Les étapes de la recherche et du dénombrement de la FMAT sur milieu TGEA.....	47
<b>Figure 20:</b> Les étapes de la recherche et de dénombrement des coliformes totaux et fécaux sut milieu DCL.....	48
<b>Figure 21:</b> Les étapes de la recherche des streptocoques fécaux dans le milieu Litsky.....	50
<b>Figure 22 :</b> Les étapes de la recherche des staphylocoques sur milieu Chapman .....	51

## Liste des figures

---

<b>Figure 23 :</b> Les différentes étapes de la recherche des Salmonelles sur milieu Heactoen.....	52
<b>Figure 24 :</b> Les différentes étapes de recherché et dénombrement des bactéries lactiques sur milieu MRS.....	53
<b>Figure 25:</b> Les différentes étapes de la recherche et de dénombrement des levures et moisissures.....	55
<b>Figure 26 :</b> Les différentes étapes de purification des moisissures isolées des margines sur milieu PDA .....	56
<b>Figure 27:</b> Les étapes de conservation des souches de moisissures isolées des margines sur milieu PDA.....	56
<b>Figure 28:</b> Différentes étapes d'identification des moisissures mésophiles isolées des margines par la méthode de Ruban adhésif.....	58
<b>Figure 29 :</b> Differentes etapes de test d'activité lipolytique des moisissures mesophiles isoées des margines sur milieu Tween 20. ....	59
<b>Figure 30:</b> Les résultats de pH des margines des 3 régions.....	60
<b>Figure 31 :</b> Les valeurs de conductivité et de salinité des 3 régions exprimées en $\text{ms.cm}^{-1}$ .....	61
<b>Figure 32 :</b> Les valeurs de MES, MMS et MVS des margines de 3 régions exprimées en $\text{g.l}^{-1}$ .....	63
<b>Figure 33 :</b> Le spectre infrarouge des trois échantillons des margines brutes.....	65
<b>Figure 34:</b> Formule chimique de dimères acides organique.....	66
<b>Figure 35:</b> A : Les valeurs de DCO des margines de trois régions exprimées en $\text{g.l}^{-1}$ .....	67
B : Les valeurs de $\text{DBO}_5$ des margines de trois régions exprimées en $\text{g.l}^{-1}$ .....	67
<b>Figure 36 :</b> Les valeurs de $\text{Ib}$ des margines de trois régions exprimées en $\text{g.l}^{-1}$ .....	68
<b>Figure 37:</b> Les résultats de dénombrement de la flore mésophiles aérobies totales sur milieu TGEA.....	70
<b>Figure 38:</b> Les résultats de dénombrement des bactéries lactiques des margines sur milieu MRS.....	73

## Liste des figures

---

<b>Figure 39</b> : Les résultats de dénombrement des moisissures dans les trois régions sur milieu PDA.....	74
<b>Figure 40</b> : Les résultats de dénombrement des levures dans les trois régions sur milieu Sabouraud.....	74
<b>Figure 41</b> : L'abondance des genres identifiés a partir de 3 échantillons de margines.....	96
<b>Figure 42</b> : Répartition des moisissures isolées de margine de la wilaya de A : Bedjaia, B : Boumerdès .....	97
<b>Figure 43</b> : Répartition des moisissures isolés de margine de la wilaya de Tizi-Ouzou.....	97

## Liste des photos

---

**Photo 01** : Les grignons en sortie de moulin.....34

**Photo 02** : Les margines en sortie de moulin au bassin de stockage .....47

## Liste des tableaux

---

<b>Tableau 01</b> : Comparaison entre les différents systèmes d'extraction de l'huile d'olive.....	16
<b>Tableau 02</b> : Caractéristiques physico-chimiques des margines.....	21
<b>Tableau 03</b> : Les principaux paramètres environnementaux des champignons .....	29
<b>Tableau 04</b> : Les différents caractères macroscopiques.....	29
<b>Tableau 05</b> : Résultats de la composition physico-chimique des margines des trois régions.....	60
<b>Tableau 06</b> : Dénombrement de la flore microbienne des margines.....	69
<b>Tableau 07</b> : Résultats de l'identification morphologique des moisissures mésophiles isolées à partir des margines de région de Bédjaia.....	76
<b>Tableau 08</b> : Résultats de l'identification morphologique des moisissures mésophiles isolées à partir des margines de région de Boumerdes .....	83
<b>Tableau 09</b> : Résultats de l'identification morphologique des moisissures mésophiles isolées à partir des margines de région de Tizi-Ouazou .....	89
<b>Tableau 10</b> : Résultats de la mesure de diamètre de la mise en évidence de l'activité lipolytique des souches.....	99

# Introduction

---

## Introduction

L'olivier c'est un arbre rustique d'exception qui opère une véritable fascination indifférent à la nature du sol. Il est considéré comme étant une plante aromatique et médicinale, réservoir de composés naturels aux effets bénéfiques (**Boudhioua et al., 2008 ; Djenane et al., 2012**).

Il constitue la principale espèce fruitière cultivée en méditerranée depuis très longtemps. Sa faculté à croître dans diverses situations de culture ainsi que son adaptation aux conditions climatiques les plus critiques ont permis son développement (**Iboukhoulef, 2014**). Cultivé en Algérie depuis plusieurs siècles, l'oléiculture représente la culture fruitière la plus répandue, elle couvre plus de 400 mille hectares de la surface agricole utilisée avec un nombre d'olivier atteignant les 6200000 arbres (**DSASI 2015**).

Le secteur oléicole génère en plus de l'huile comme produit principal, des grandes quantités de déchets lipophiles souvent non recyclés de nature solide (grignons d'olive, feuilles) et liquide (margines) (**Bataiche, 2014 ; Rizoun, 2013 ; Djadoun, Sd**) qui sont des eaux composées de mélange de l'eau de végétation, naturellement contenu dans les olives et l'eau ajoutée au cours du procédé d'extraction de l'huile d'olive vierge. Au cours de trituration seuls les systèmes de presse et de centrifugation à 3 phases génèrent des margines. Même si ces deux processus sont moins respectueux à l'environnement, ils sont encore largement utilisés (**El-Abbassi et al., 2012**).

Les margines sont des effluents riches en matière organique et en sels minéraux. Elles sont souvent épandues de manière incontrôlée sur les sols agricoles ou stockées dans les cuvettes, exposant ainsi les systèmes eau-sol-plante à une pollution inéluctable (**El-Abbassi et al., 2012**) notamment par leur toxicité (**El-Abbassi et al., 2012 ; Dermeche et al., 2013**). 10 millions de m<sup>3</sup> de cet effluent liquide correspondraient à une charge équivalente des eaux usées générées par environ 20 millions de personnes (**McNemara et al., 2008**). Ce qui nécessite des technologies différentes de leur traitement et de valorisation (**Bataiche, 2014**).

Ils sont riches en microorganismes principalement la flore fongique qui est caractérisée par la production d'une grande variété de métabolites secondaires, utilisés dans les processus biotechnologiques pour la synthèse des différents acides, comme l'acide citrique et l'acide gluconique ainsi que pour la production d'enzymes (protéase, pectinases et lipase). A cause de leur stabilité et leur efficacité, les lipases d'origine microbienne, y compris, celles issues des

# Introduction

---

champignons, représentent la classe d'enzymes la plus largement utilisées dans les applications biotechnologiques (**Treichel et al., 2010**.)

De nombreuses valorisations des margines ont été ou sont explorées actuellement visant à rendre les margines moins toxiques ou plus faciles à traiter : adsorbant des rejets de l'industrie textile (**Meski et al., 2012**), fongicide (**Yanguï et al., 2010**), source d'amendement des sols (**Mechri et al., 2010**), production de biogaz, de composte ou comme source d'énergie (**Mann et al., 2010**), de pectine (**Aouidi et al., 2009**) ou d'antioxydants (**Gerasopoulos et al., 2015**).

Divers procédés sont applicables aussi, tels que les traitements physico-chimiques (coagulation/floculation, filtration sur membrane,...) (**Sbai et Loukili, 2015**), les traitements thermiques (incinération, évaporation,...) (**Jail et al., 2010**) et le traitement par des bassins d'évaporation naturelle qui reste actuellement, la technique la plus utilisée en raison de sa simplicité (**Esmail et al., 2014**).

De nombreux travaux ont été consacré à l'analyse physicochimique et au dénombrement de la charge microbienne des margines, ils ont montré que ces effluent sont dotés d'un pH acide et sont riches en matière organique. Par ailleurs les champignons et les levures représentent la flore majoritaire des margines (**Zaier et al., 2017 ; Esmail et al., 2014**).

Dans le présent travail on s'intéresse à un produit dérivé de l'huile d'olive : les margines ou « Amoredj ». On a mené une étude microbiologique et physicochimique sur 3 échantillons provenant de différentes régions d'Algérie (Bejaia, Boumerdes et Tizi-Ouzou). Ainsi que l'isolement et l'identification des différents genres de moisissures mésophiles utiles à partir de ces derniers et l'évaluation de l'activité lipolytique de quelque souche fongique identifiée.

## I.1.L'olivier

### I.1.1.Historique

L'olivier a été cité dans des livres à plusieurs reprises, dans le Coran, l'olivier a été mentionnée six fois dans différents endroits parmi lesquels un versé coranique cité au début de la sourate de Al tine. Ce produit est aussi cité au niveau de la Bible et l'Evangile (**Labdaoui, 2016**). C'est un arbre spécifique du bassin méditerranéen, il a été considéré depuis la nuit des temps comme symbole de la sagesse, de la paix, de la richesse et de la gloire (**Benlemlih et Ghanam, 2012 ; Sekour, 2012**). Ainsi que c'est un symbole de puissance et de force dont la massue d'Hercule était en bois d'olivier (**Brahimi, 2015**).

### I.1.2. Origine et expansion

Plusieurs vestiges ont été trouvés à titre d'exemples au nord de la Syrie à d'Alep. Des tablettes datant du milieu du 3<sup>ème</sup> millénaires av. J-C mentionnent l'existence d'une forte production d'huile d'olive dans le monde Mycénien en Grèce. Dès 1550 av. J-C, des traces ont mentionné la présence de l'olivier, il s'agissait à la fois de l'olivier sauvage et de l'olivier cultivé. Pendant le nouvel empire du XIV<sup>ème</sup> siècle av. J-C, les phéniciens diffusent l'olivier dans les îles grecques. Au XII<sup>ème</sup> siècle av. J-C, dans la péninsule hellénique, cette culture est devenue importante (**Labdaoui, 2016**). Sa présence, selon le linguiste Mohand Akli Haddadou, est attestée au Sahara où il est désigné par Ahatim (du phénicien : Zeytim) comme témoigne des oliviers fossilisés de Hoggar (**Mokdad, 2015**).

À partir de VI siècle avant J-C, sa culture s'est étendue dans tout le bassin méditerranéen en passant par la Lybie, la Tunisie, la Sicile puis en Italie. Les romains, les grecs et les arabes lors de leurs conquêtes, ont poursuivi la propagation de l'olivier dans tous les pays côtiers de la méditerranée (**Benrachou, 2013**) (**Fig.01. Annexe 01**). Plus tard, la culture de l'olivier fait un bon en d'hors du bassin méditerranéen (**Garcia Verdugo et al., 2010**) pour s'introduire au nouveau monde (Pérou, Chili, Mexique, Argentine, Brésil, les Etats unis) (**Civantos, 2008**), à l'Inde, au Caucase, au sud de l'Asie, en Chine et en Malaisie. Elle s'est propagée également en Afrique du sud, en Australie, au Japon et plus récemment en Nouvelle Calédonie (**Leroy, 2011**).

### I.1.3. Nomenclature

La première appellation de l'olivier daté du 13<sup>ème</sup> siècle avant J-C en Grèce est trouvée sur une table en argile. D'ailleurs le terme olive et les autres noms communs, dérivent des termes grecs *elaa*

et *elam*. Selon la bibliographie consultée (**Ghedira, 2008 ; Gigon et le Jeune, 2010 ; Sidhoum, 2011 ; Boukhtil, 2012**) les différents noms vernaculaires attribués à l'olivier sont les suivants :

**Arabe:** Zeitoun (Olivier cultivée), **Berbères:** Azemmour, **Français:** Olivier, **Anglais:** Olive-tree, **Espagnol:** Oliva, **Italien:** Olivo, **Latin:** Oliva, oléum, Olivum, **Vieux Scandinavie:** Olia, **Portugais:** Oliveira, **Turque:** Zeytim, **Hongrois:** Olay, **Flandre Hollandais:** Oliifbroom, **Allemand :** Oliven.

Scientifiquement, l'olivier est appelé *Olea europea* Linne (**Linne, 1764**).

#### I.1.4. Systématique

D'après **Chase et Reval, (2009) ; Dupont et Guinard, (2012) et kadereit et Bresinsky, (2013)** l'olivier présente la classification suivante :

- **Règne :** Plantae
- **Embranchement :** Embryophytes
- **Sous embranchement :** Trachéophytes (plantes vasculaires)
- **Super classe :** Spermatophytes (plantes à graines)
- **Classe :** Magnoliopsida (angiospermes)
- **Sous classe :** Lamiids
- **Ordre :** Lamiales
- **Famille :** *Oléaceae*
- **Genre :** *Olea*
- **Espèce :** *Olea europaea* L.

La famille des *Oléaceae* comporte 24 genres et 615 espèces (**kadereit et Bresinsky, 2013**). Le genre *Olea* est répartis sur tous les continents comme plantes ornementales, il est lui-même composé de plus de 40 espèces différentes parmi les quelles on trouve : *Olea europea* L. avec six sous espèces (**Rugini et al., 2011; Diaz, 2012; Murphy, 2014**) (**Fig.01. Annexe 01**)

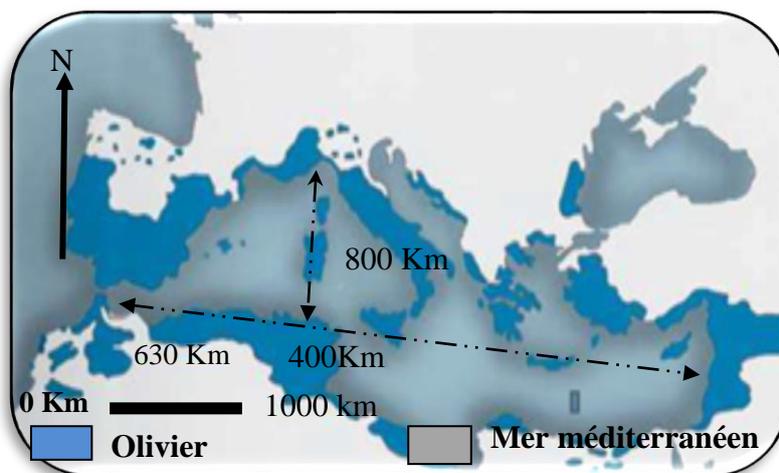
#### I.1.5.L'oléiculture

##### I.1.5.1. Dans le monde

###### ➤ Répartition géographique

Dans le cadre agro-climatique, la culture de l'olivier est circonscrit à 30-45° de nord et sud du monde cette limite rend le climat méditerranéen relativement sec typique à l'olivier La superficie

cultivée en olivier n'a cessé d'augmenter depuis 1961, encore plus au cours des 15 dernières années (Haddam *et al.*, 2014) (Fig. 01) .



**Figure 01** : Localisation de l'olivier autour de bassin méditerranéen (Ghedira, 2008).

#### ➤ Production et consommation

Le Vieux Continent compte toujours pour une part de lion dans le tonnage global (plus de 60%). La production en zone euro serait en hausse de 3% arrivant à 1 805 000 tonnes avec successivement de la première à la quatrième place l'Espagne (1 090 500 tonnes et -15%), l'Italie (320 000 tonnes et +76%), la Grèce (300 000 tonnes et +54%) et le Portugal (78 800 tonnes et +14%) (COI, 2017).

La consommation mondiale d'huile d'olive connaît pour sa part, une croissance modeste de 5% en s'établissant à  $2\,954 \times 10^3$  tonnes. Elle sera notamment tirée par l'UE, l'Égypte et la Turquie (COI, 2017).

#### I.1.5.2. En Algérie

##### ➤ Répartition géographique

La production d'huile d'olives est une activité traditionnelle en Algérie. Elle compte près de 1650 huileries, dont seulement 165 huileries modernes (Vossen, 2013). Le potentiel oléicole est concentré dans les régions montagneuses et se répartit principalement dans trois régions :

- Le Centre nord principalement Tizi-Ouzou, Brouira et Bejaia avec 54,3 % de la surface totale.
- L'Est (Jijel, Guelma, Skikda, et Mila) avec 28,3 %.
- L'Ouest qui occupe à peine 17% (Tlemcen, Sig et Mascara).

La wilaya de Bejaïa est placée en tête à l'échelle nationale présentant une superficie oléicole de 58059,38 Ha (DSA, 2017).

#### ➤ Production et consommation

La production d'huile d'olive en Algérie a atteint les 80000 tonnes durant la campagne 2017/2018, en enregistrant une hausse de 27 % par rapport à la période précédente. Au cours de la même période, la consommation de l'huile d'olive est passée de 14 000 à 244 000 tonne (COI, 2017).

#### I.1.6. Profil variétal en Algérie

L'Algérie grâce à sa situation géographique et à sa diversité pédoclimatique dispose d'un assortiment assez riche de variétés, marquant chacune des traits édaphiques et climatiques qui caractérisent sa zone d'implantation. Plus de 150 variétés d'olives autochtones ont été dénombrées par Chaux en (1955) et 173 variétés entre autochtones et introduites ont été collectionnées par l'INRA (Boukhtil, 2012) (Fig. 02. Annexe 01). De ce nombre 48 variétés sont autorisées, dont 11 font actuellement la réputation de l'oléiculture Algérienne (Douzane *et al.*, 2010). Les variétés Chemlal et Segoise, constituent le profil variétal dominant (Sahli, 2009) (Tab. I. Annexe 01).

#### I.1.7. Description morphologique

L'olivier est un arbre originaire d'un climat subtropical sec. Il s'adapte bien à des conditions d'environnement extrêmes (Murphy, 2014 ; Ghedira, 2008), c'est un arbre vivace généralement âgé de plus de 500 ans (Murphy, 2014). Il est composée principalement de :

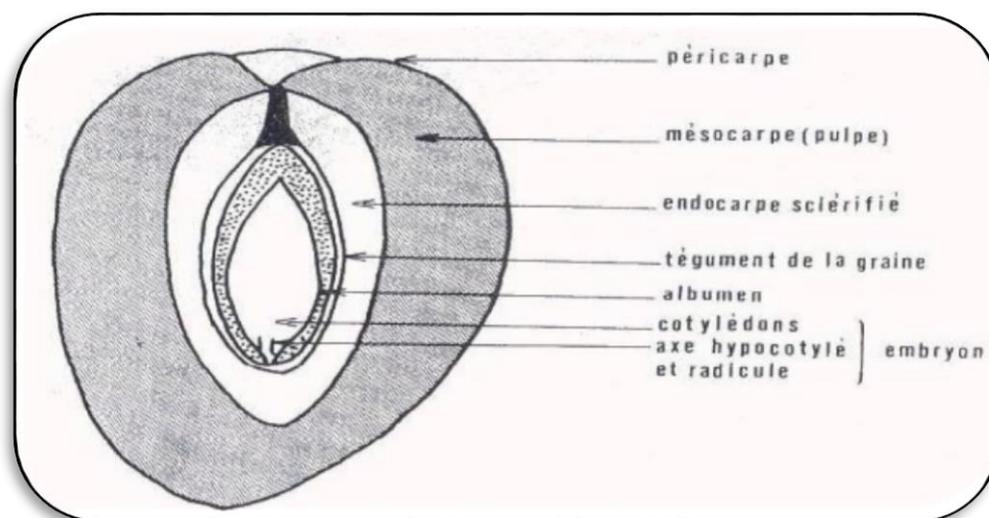
**Tronc :** l'olivier se caractérise par un tronc bas, de couleur grise. C'est un arbre à croissance lente qui peut atteindre 15 à 20 m (Ghedira, 2008 ; Gigon et Le jeune, 2010).

**Feuilles :** Les feuilles de l'olivier sont persistantes et d'une durée de vie de 3ans. La face supérieure est luisante de couleur vert foncé, tandis que la face inférieure présente un aspect argenté dû à une pruine (Ghedira, 2008).

**Fleurs :** Elles sont petites, blanches et odorantes, regroupées en grappe dressées à l'aisselle des feuilles. L'olivier produit deux sortes de fleurs, une parfaite qui contient les deux sexes mâle et femelle et une staminée (Ghedira, 2008 ; Fabbri *et al.*, 2009).

**Fruit :** L'olive, fruit de l'olivier est une drupe à mésocarpe charnu, indéhiscente, à noyau, sa forme est ovoïde ou ellipsoïde (Ghedira, 2008 ; Gigon et le Jeune, 2010 ; Aparicio et Harwood, 2013 ; Murphy, 2014). Constituée d'un péricarpe et d'un endocarpe. Elle pèse de 2 à 12 g, bien que certaines variétés puissent peser jusqu'à 20g. L'épicarpe est couvert de cire et passe du vert clair au noir quand le fruit mûrit (Fig.02). Cependant la composition chimique moyenne de l'olive est 50 % ;

d'eau, 22 % d'huiles ; 1,5 % de polyphénols ; 1,5 % de protéines ; 18 % de sucres ; 5,5 % de cellulose et 1,5 % de minéraux (**Henri, Non daté**) (**Fig.3: Annexe 01 ; Tab.III. Annexe 01**).



**Figure 02** : Coupe schématique du fruit (drupe) (**Loussert et Brousse, 1978**).

### I.1.8.Importance de l'olivier

L'une des nourritures sur laquelle le Coran attire l'attention est l'olive. Le coran souligne l'importance de l'huile extraite de l'olivier dans plusieurs versets tel que l'expression «zaytounatin moubaarakatin » ou se décrit l'olivier comme étant une plante abondante, sacrée favorable, fournissant des bienfaits innombrables (**Lebdaoui, 2016**). Toutes les études démontrent que les régimes alimentaires à base d'huile d'olive sont bénéfiques pour la santé humaine en diminuant le risque de plusieurs maladies tels que les pathologies cardiovasculaires, les désordres neurologiques, les cancers du sein et du colon, ainsi qu'aux propriétés antioxydants (**Ghedira, 2008**).

### I.1.9.Technologie de fabrication de l'huile d'olive

La production de l'huile d'olive a toujours été le principal objectif de la culture de l'olivier. Les méthodes d'extraction ont évolué mais le processus d'extraction de l'huile reste toujours le même (**Benlemlih et Ghanam, 2012**). Ces évolutions peuvent être regroupées en deux grandes catégories : les évolutions relatives au broyage des olives et les évolutions relatives à la séparation des différentes phases (**Veillet, 2010**).

#### I.1.9.1. La récolte des olives

La période de récolte des olives va de septembre à février en fonction de l'utilisation et de la variété d'olives. Les conditions climatiques ainsi que la région de production ont également un impact sur la vitesse de maturation des olives et donc sur la période optimale de récolte. Il existe de

nombreuses techniques de récolte des olives (**Fig.03**) (**Tab. II: I 'annexe 01**) (**Lamrani, 2009 ; Veillet, 2010**).



**Figure 03** : La cueillette des olives par les différentes méthodes : **A-** À La main, **B-** À la pigne manuelle, **C-** À la pigne mécanique, **D-**Vibration des branches (**Brahimi, 2015**).

#### I.1.9.2. Opérations préliminaires

Les olives sont pesées puis passent dans un système laveuse-effeuilleuse qui va les nettoyer et retirer les impuretés. Celles-ci peuvent altérer les propriétés organoleptiques de l'huile en utilisant les broyeurs métalliques(**Fig.04**) (**Aggoun, 2016**).

#### I.1.9.3. Le broyage

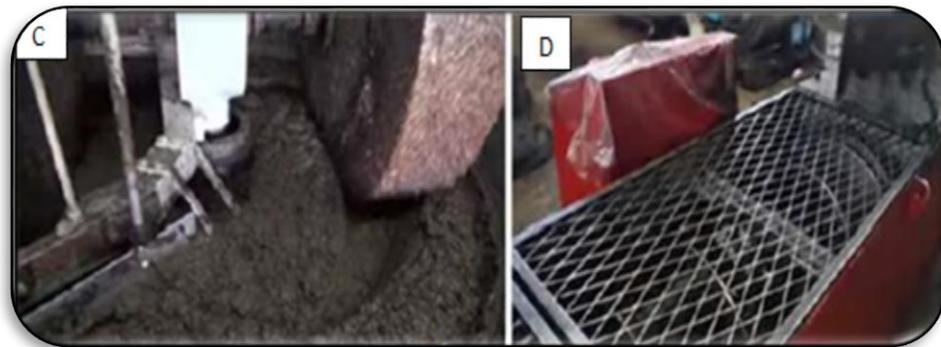
Le broyage des olives a pour but de détruire et de dilacérer les tissus et les cellules des olives afin de libérer les gouttelettes d'huile. À ce stade du procédé, les olives sont réduites en une pâte plus ou moins homogène(**Fig.05**) (**Benlemlih et Ghanam, 2012 ; Aggoun, 2016**).

#### I.1.9.4. Le malaxage

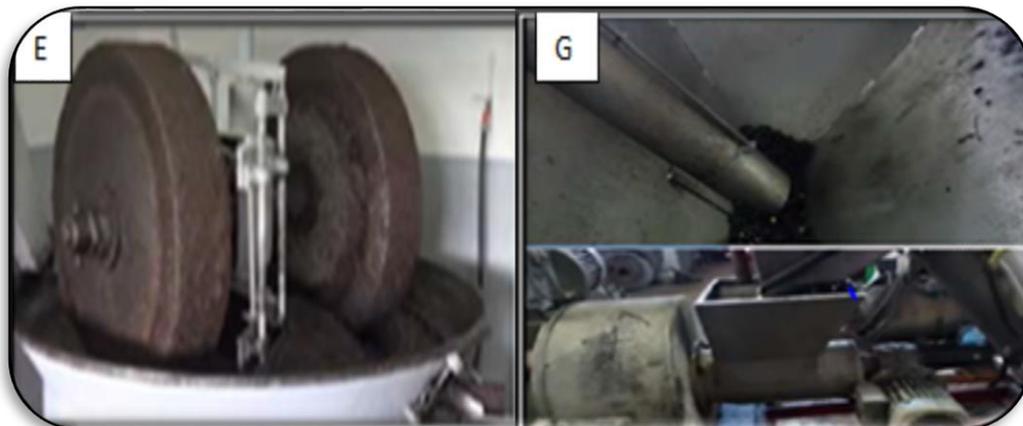
Le malaxage permet de donner à la pâte une bonne régularité et homogénéité. Il consiste à un broyage lent et continu de la pâte d'olive préalablement chauffée afin de libérer le maximum d'huile en brisant les vacuoles qui sont restées entières durant la phase précédente(**Fig.06**) (**Sifoun, 2008 ; Veillet, 2010 ; Ghezlaoui, 2011 ; Aggoun, 2016**).



**Figure 04** : Operations préliminaires dans l'extraction de l'huile d'olive: **A**-L'effeuillage ; **B**-Lavage (Brahimi, 2015).



**Figure 05** :Le processus de broyage au cours de l'extraction de l'huile d'olive; **C**-Avec des moulins en pierre traditionnelle ; **D**-Avec disques moderne (Brahimi, 2015).



**Figure 06** : Le processus de malaxage au cours de l'extraction de l'huile d'olive ; **E**-Traditionnelle ; **G**- Moderne (Brahimi, 2015).

### 1.1.9.5. Séparation des phases

#### 1.1.9.5.1. Séparation des phases liquides-solides

La pâte malaxée va ensuite être pressée ou centrifugée horizontalement afin de séparer les phases solides et liquides. La phase solide s'appelle "grignons" et constitue l'un des deux principaux coproduits de la fabrication de l'huile d'olive (Aggoun, 2016).

#### 1.1.9.5.2. Séparation des phases liquides-liquides

La phase liquide est un mélange d'eau et d'huile qu'il faut séparer. Cela se fait soit par simple décantation gravitationnelle, soit par centrifugation. Dans les deux cas la phase aqueuse est appelée "margines" (Benlemlih et Ghanam, 2012 ; Aggoun, 2016).

### 1.1.9.6. Le stockage

L'huile d'olive est immédiatement stockée dans des cuves en inox afin d'éviter l'oxydation. L'huile peut alors être filtrée pour la rendre limpide et brillante ou bien être mise en bouteille. Une fois embouteillée, l'huile d'olive doit être conservée à l'abri de la chaleur et de la lumière (Benabid, 2009).

### 1.1.10. Les systèmes d'extraction

Trois systèmes d'extraction sont à présent utilisés : procédé discontinu et procédé continu ou système à centrifugation, ce dernier se déroule soit selon un procédé continu à trois phases ou en un procédé continu à deux phases (Tab. 01) (Morillo *et al.*, 2009). Ces trois principaux procédés d'extraction sont résumés dans une figure (Fig.04 ; Annexe 01).

**Tableau 01** : Comparaison entre les différents systèmes d'extraction de l'huile d'olive  
(Chouchene, 2010 ; Veillet, 2010 ; Benlemlih et Ghanam, 2012 ; Aggoun, 2016).

	Système d'extraction		
	Discontinu	Continu à deux phases	Continu à trois phases
<b>Opérations préliminaires</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Nettoyage.</li> <li>-Broyage (meules de granit légèrement décentrées par rapport à l'axe de rotation)</li> <li>- Malaxage (Des raclettes).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Nettoyage.</li> <li>-Broyage (des broyeurs mécaniques à marteaux, couteaux ou disques placés sur un axe entraîné par un moteur-électrique).</li> <li>- Malaxage (dans un bac en inox).</li> </ul>	
<b>Séparation des phases</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Séparation (disques en fibre de nylon, empilés les uns sur les autres autour d'un pivot central.</li> <li>-Décantation(naturelle, développé en centrifugeuses verticales à assiettes).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Deux centrifugation. - Séparation (centrifugeuse ou décanteur horizontale).</li> <li>-Décantation. (centrifugeuse verticale à assiettes)</li> <li>-Trois fractions .</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Une seule centrifugation</li> <li>-Séparation et décantaion par un décanteur à deux phases.</li> <li>- Deux fractions.</li> </ul>
<b>Avantages</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Faible consommation d'eau et d'énergie.</li> <li>- Huile riche en polyphénols.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Margines à faible charge polluante.</li> <li>- Huile moins acide.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Rendements en huile légèrement plus élevés.</li> <li>- Huile riche en polyphénols totaux et en ortho diphénols et donc plus stable.</li> <li>-Faibles quantités de margines.</li> </ul>
<b>Inconvénients</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-La lenteur et la difficulté pour bien séparer l'huile de l'eau. au voisinage de l'interface entre les deux fluides.</li> <li>-Margines les plus concentrées.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Consommation d'eau et d'énergie.</li> <li>-Quantités importantes de margines.</li> <li>-Huile pauvre en composés phénoliques.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Grignons trop humides.</li> <li>-Grande consommation d'énergie.</li> </ul>

## I.2. Les sous-produits de l'olivier

L'industrie oléicole, en plus de sa production principale qui est de l'huile (l'huile d'olive vierge et l'huile de grignon), engendre la production de deux résidus : margines et grignons (Galanakis *et al.*, 2010).

### I.2.1. Grignons ou tourteaux

Les grignons sont les résidus solides obtenus après le premier pressage des olives, ils contiennent encore de l'huile appelée huile secondaire. Ils sont composés de peaux, de résidus de pulpe et de fragments des noyaux (Phot.01) (Amic et Dalmasso, 2013).



**Photo 01** : grignons en sortie de moulin (Amic et Dalmasso, 2013).

### I.2.2. Les margines

#### II.2.2.1. Définition

Les margines sont des eaux de végétation qui se représentent comme un liquide résiduel aqueux caractérisées par une intense couleur brun-violet ou brun-rouge sombre. Cette couleur est dû au processus enzymatique, à l'état de dégradation des composants phénoliques et au olives dont elles proviennent,. Le liquide noir ou margines se caractérise par une odeur spécifique qui peut devenir gênante lors des phénomènes de rancissement ou de fermentation anaérobie. Ils présentent un aspect trouble et un goût amer (Boudoukhana, 2008; Eroglu *et al.*, 2008; Hachicha *et al.*, 2009 ; Yaakoubi *et al.*, 2009; Dermeche *et al.*, 2013 ; Zahari *et al.*, 2014 ; Ochando *et al.*, 2016; Djadoun, non daté).

La qualité et la quantité des margines dépendent de l'opération d'extraction d'huile d'olive. Elles sont aussi influencées par la variété d'olive, l'eau utilisée, la saison de cueillette, la situation

géographique, le taux de maturation des fruits, les conditions climatiques, les techniques, le temps et le lieu de stockage des olives avant la trituration (Boudoukhana, 2008; Kapellakis *et al.*, 2008; Yaakoubi *et al.*, 2009 ; Hanafi *et al.*, 2009; Hachicha *et al.*, 2009 ;Chouchene, 2010; Yalcuck *et al.*, 2010 ; Achak *et al.*, 2011; Celine *et al.*, 2012 ;Daassi *et al.*, 2014 ; Djadoun, non daté).

### I.2.2.2.Appellations

Les margines ou eaux de végétation, parfois nommés Alpechine en Espagne, Aqua reflue en Italie, Katsigaros en Grèce, Zebar dans les pays arabes, aussi appelés « Olive Oil Mill Waste Water (OMW)» en Anglais (Kapellakis *et al.*, 2008).

### I.2.2.3.Origine des margines

Les margines sont composées de 40 à 50 % de la fraction liquide contenue dans le fruit d'olive et de l'eau de fabrication, éventuellement rajoutée en cours du processus mécanique, essentiellement au cours des procédés de centrifugation à 3 phases ou de presse de l'huile d'olive (Phot.02) (Kapellakis *et al.*, 2008 ; Achak *et al.*, 2009; Galanakis *et al.*, 2010; El Abbassi *et al.*, 2011 ;Daassi *et al.*, 2014 ).



**Photo 02** : Les margines (Anonyme, 2018c).

### I.2.2.4. Caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques des margines

#### I.2.2.4.1.Caractéristiques physico-chimiques

La caractérisation physicochimique des margines est généralement tributaire des techniques et des systèmes d'extraction de l'huile d'olives, elle diffère d'un pays à l'autre (Blika *et al.*, 2011). Les principales caractéristiques sont représentées dans (Tab. III et Tab. IV : voir l'annexe).

#### I.2.2.4.1.1. Caractérisation physique des margines

Les margines sont des sous-produits qui présentent un pH acides, une conductivité électrique très élevée et une toxicité saline considérable (**Hachicha et al., 2009; Yalcuck et al., 2010 ; El Abbassi., 2012 ; Dermeche et al., 2013; Ochando et al., 2016**).

#### I.2.2.4.1.2. Caractérisation chimique des margines

Les margines contiennent la majorité des groupes chimiques solubles dans l'eau présentes dans l'olive (**Morillo et al., 2009**). La majorité des travaux effectués montrent que la composition pondérale typique est caractérisée par leur richesse en eau (83% -94% ), en éléments minéraux (1,5%-6%) en composés organiques (4%-16), des petites quantités d'huile d'olive émulsionnée et un rapport C/N élevé (**Eroglu et al., 2008; Yaakoubi et al., 2009; Morillo et al., 2009 ; Moussaoui et al., 2010 ; Celine et al., 2012**).

##### ➤ Fraction minérale

La fraction minérale est comprise entre 0,61 et 39 g/l (**Aggoun, 2016**) et comporte :

- **Une fraction insoluble (80%)** : constituée essentiellement de phosphate et de chlorure.
- **Une fraction soluble (20%)** : constituée essentiellement de carbonate et de silicate.

Les éléments les plus représentatifs sont le potassium (47%), les phosphates (14%) et le sodium (7%) (**Azbar et al., 2008**) ce qui a conduit plusieurs chercheurs à tester leur pouvoir fertilisant. Les métaux lourds, tels que l'arsenic (As), le cuivre 14% (Cu), le cadmium (Cd), le chrome (Cr), le sélénium (Se), le mercure (Hg) et le nickel (Ni) sont présents la plupart de temps à l'état de traces (**Aggoun, 2016**).

##### ➤ Fraction organique

La concentration de matière organique des margines est comprise entre (20 à 129,93 g/l) et comporte :

- **Une fraction insoluble** : constituée essentiellement de pulpes d'olives, matières en suspension et colloïdales.
- **Une fraction soluble**: dans la phase aqueuse qui est très riche en substances organiques composées essentiellement des sucres, lipides, protéines (facilement fermentescibles), acides organiques (acides acétique, fumarique, glycérique et oxalique), pectines, composés azotés, composés phénoliques, vitamines et traces de pesticides. Cette composition résulte de la

dégradation des tissus de l'olive au cours de la trituration et de l'extraction (**Kapellakis *et al.*, 2008 ; Marco Lucas *et al.*, 2009**).

✓ **Les sucres**

Ils représentent environ 0,6 % du poids de la pulpe d'olive fraîche d'après les études menées par **Galanakis et ses collègues (2010)**. Les glucides sont essentiellement représentés par les composants pariétaux, en particulier la cellulose et les pectines, ces dernières jouent un rôle important dans la texture des olives. Récemment, de nombreux travaux ont montré que les margines sont très riches en sucres simples, en particulier : le raffinose, le saccharose, l'arabinose, le xylose, le mannose et le fructose (**Fezzeni et Ben Cheikh, 2009 ; Garcia-Castello *et al.*, 2010 ; Leulmi, 2011**) et en fibres pectiques (**Nadour *et al.*, 2012**). **Dermeche et ses collègues (2013)** mentionnent que les sucres représentent entre 4,1 et 4,8% du poids total des margines pouvant se répartir comme suit : glucose (1%), arabinose (62 à 71 %), galactose (17 à 25%), rhamnose (2 à 3%) et xylose (1 à 2 %).

✓ **La fraction azotée**

La fraction azotée est représentée principalement par les protéines avec une concentration variable. Tous les acides aminés ont été identifiés, les plus abondants sont l'acide aspartique, l'acide glutamique, proline et la glycine (**Jail *et al.*, 2010**).

✓ **Les composés phénoliques**

Le fruit de l'olivier est très riche en composés phénoliques mais seulement 2% du son contenu total passe dans la phase huileuse. Le reste se trouve dans la phase liquide (margines) 53% et la phase solide (grignons), les composés phénoliques sont très variable et sont le groupe le plus vaste et le plus répandus. Plus de 50 composés phénoliques et plusieurs alcools phénoliques ont été identifiés dans les margines (**Seraphim *et al.*, 2008; Gonçalves *et al.*, 2009; Dermeche *et al.*, 2013**). Ils proviennent de l'hydrolyse enzymatique des glucides et des esters de la pulpe d'olive au cours du processus d'extraction (**Tab.02**) (**Achak *et al.*, 2008; Yaakoubi *et al.*, 2009; Lafka *et al.*, 2010; El Abbassi et Zbakh *et al.*, 2012; Celine *et al.*, 2012**).

Tableau 02 : Caractéristiques physico-chimiques des margines (Celine *et al.*, 2012)

Paramètre	Unité	Asses <i>et al.</i> , 2009	Karpouzas <i>et al.</i> , 2010	El Abbassi <i>et al.</i> , 2011	Mekki <i>et al.</i> , 2013	Ben Rouina <i>et al.</i> , 2014	Ouabou <i>et al.</i> ,2014	Khoufi <i>et al.</i> , 2015
pH	-	5,1	5,7	5,3	5	4,17- 5,56	4,75	4,8
Conductivité	Ms/cm	-	11	24	81	12,83- 18,61	24	175
DCO	g/L	95	48	156	53	-	340	150
DBO	g/L	-	-	-	13,42	-	-	37,5
DBO <sub>5</sub>	g/L	-	-	-	-	-	1250	-
Matière sèche	g/L	84,2	-	90	39,4	44,6-121	240	53,16
Lipides	g/L	-	-	7	-	3,18-4,5	-	-
Polyphénols	g/L	4,82	8,8	4,1	8,6	0,99-5,8	2,05	8,9
Sucres	g/L	-	-	4,3	-	-	26,87	-
Azote totale	g/L	-	0,9	-	0,5	0,44-1,4	-	-
Teneur n eau	%	-	-	-	-	87,9- 95,4	-	-
Matière organique	g/L	-	-	-	-	32,55- 107	-	-
Matière volatile	g/L	-	-	-	-	-	212	-
Matière en suspension	g/L	-	-	-	-	-	10	-
Taux d'humidité	%	-	-	-	-	-	86	-
Masse volumique	g/cm <sup>3</sup>	-	-	-	-	-	1,05	-

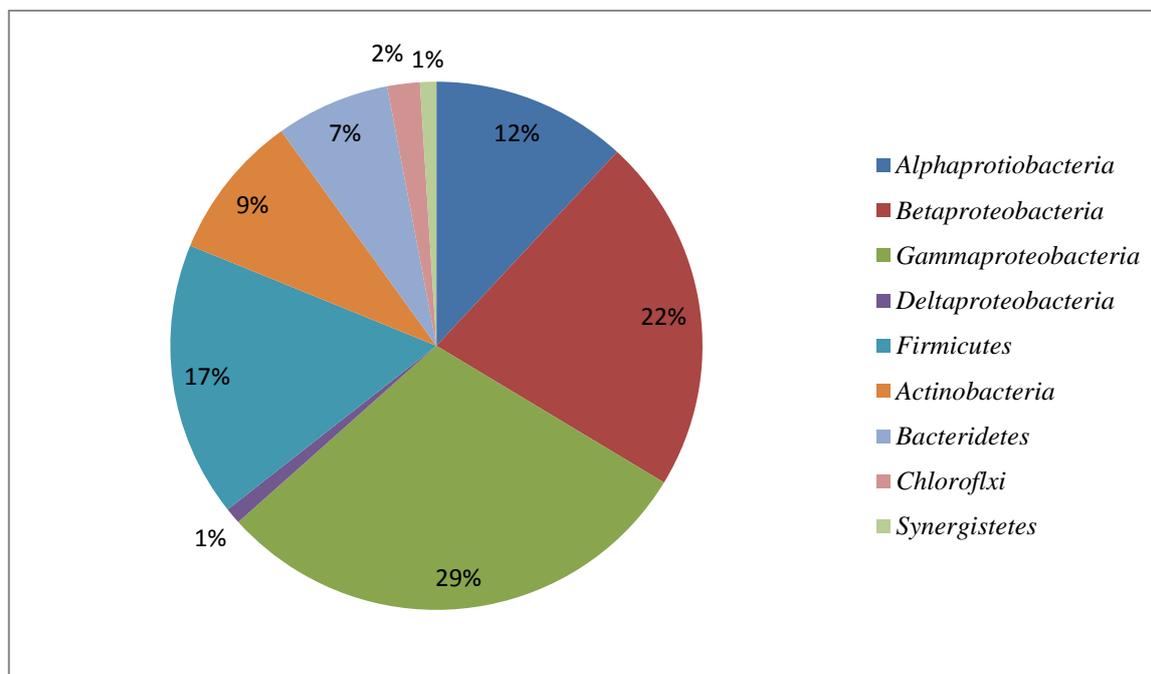
#### I.2.2.4.2. Caractérisation microbiologique des margines

Les bactéries, les levures et les moisissures sont les principaux microorganismes trouvés dans les margines avec la prédominance des deux dernières. La plupart d'entre eux proviennent d'environnements de sols et d'eau douce. La structure de la communauté bactérienne est fortement influencée par la culture et la pratique de la récolte, ainsi que la variété spécifique à partir de laquelle des margines ont été produites (Tsiamis *et al.*, 2012). Dans la plupart des cas, il y a absence de microorganismes pathogènes et ils ne posent alors aucun problème du point de vue sanitaire (Vagelas *et al.*, 2010 ; Senani et Moulti-Mati, 2011; Zbakh et El-Abbassi, 2012 ; Ntougias *et al.*, 2013).

##### I.2.2.4.2.1. Diversité bactérienne dans les margines

D'après des études réalisées par Venieri et ces collègues (2010) consistant à la mise en œuvre d'une puce à ADN à haute densité ont révélé une grande diversité bactérienne, dominée par des

membres de toutes les classes de *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Cyanobacteria*, *Planctomycetes*, *Gemmatimonadetes*, et *Verrucomicrobie*. En outre, un nombre élevé d'agents infectieux sont présents tels que : *Acinetobacter*, *Enterobacter spp* et *Pseudomonas* ont également été détectés dans les margines. Les principales classes bactériennes sont représentées dans la figure (Fig. 07) (Vivas *et al.*, 2009; Tsiamis *et al.*,2012).



**Figure 07** : Distribution de phylotypes bactériens les margines (Ntougias *et al.*, 2013).

#### I.2.2.4.2.2. Diversité fongique dans les margines

##### ➤ Les levures

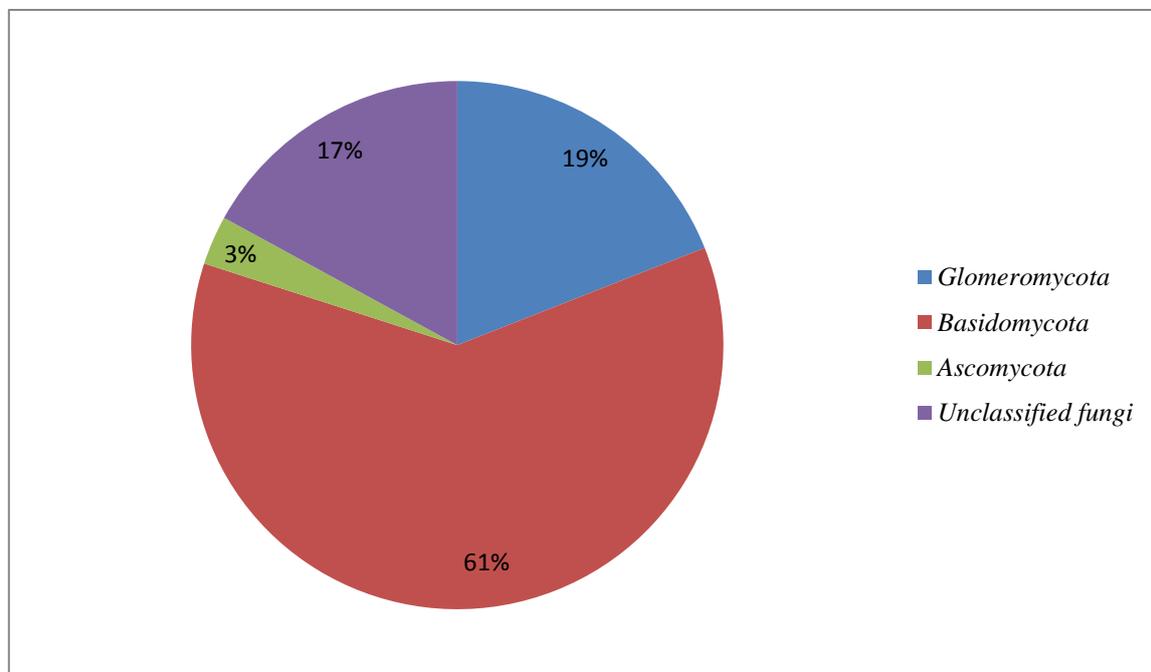
La population de levures semble être abondante dans les margines. Les principales espèces présentes sont *Geotrichum candidum*, *Pichi .fermentans* et *P. holstii*, *Candida membranifaciens*, *C. michaelii*, *C. inconspicua* et *C. tropicalis* et *Rhodotorula mucilaginosa*, et les espèces apparentées à *Saccharomyces cerevisiae* qui ont été récemment isolés de margines (Ben-Sassi *et al.*, 2008 ; Blevé *et al.*,2011).

Ces isolats de levures présentent une haute activité pectolytique et xylanolytique renfermant les enzymes : cellulase,  $\beta$ -glucanase,  $\beta$ -glucosidase, peroxydase, et les polygalacturonase qui pourraient efficacement dégrader les composés phénoliques responsables de la toxicité des margines (Romo-Sanchez *et al.*, 2010; Sinigaglia *et al.*, 2010).

##### ➤ Les champignons

Une étude de Centre National d'Information sur la Biotechnologie (NCBI) a révélé la présence de 106 séquences de champignons identifiées dans les margines (Fig.08).La plupart d'entre eux

appartiennent aux genres : *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Bionectria*, *Byssochlamys*, *Chalara*, *Cerrena*, *Fusarium*, *Lasiodiplodia*, *Lecythophora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phycomyces*, *Phoma*, *Rhinoctadiella* et *Scopulariopsis* (Ntougias *et al.*, 2013). La plupart des genres fongiques possédaient la capacité de dégrader ses composés phénoliques (Mann *et al.*, 2010).



**Figure 08:** Distribution des champignons dans les margines (Ntougias *et al.*, 2013).

#### I.2.2.5. Effets biologiques des margines

Les margines sont riches en polyphénols, l'activité antioxydante est celle qui les caractérise le mieux et avec la plus grande fréquence. En effet, de nombreuses revues leur confèrent le rôle d'excellents pièges d'espèces réactives directement issues de l'oxygène. L'étude de l'effet cytoprotecteur des polyphénols de margine (hydroxytyrosol) sur des neurones de rat a révélé que cette molécule est fortement corrélée à la protection des cellules nerveuses par piégeage de l'ion métallique ( $Fe^{2+}$ ). Cette faculté, tant étudiée et si reconnue est fréquemment citée comme étant une clé pour la prévention et/ou la réduction du stress oxydatif en lien direct avec des maladies chroniques (Schaffer *et al.*, 2010).

Les polyphénols sont des substances partiellement toxiques et inhibent le développement des microorganismes aussi bien en présence ou en l'absence d'oxygène (Larif *et al.*, 2013 ; Esmail *et al.*, 2015). Elles peuvent inhiber également l'activité des bactéries symbiotiques fixatrices d'azote dans le tube digestif des ruminants en inhibant leur activité enzymatique (Yahiaoui, 2012).

### I.2.2.6.L'impact des margines

Les effluents oléicoles génèrent un grand impact sur l'environnement, en raison de la production élevée de résidus les plus polluants (**Bataiche, 2014 ; M'sadak et al., 2015**). On peut supposersans risque que les margines sont entièrement biodégradables (**Kapellakis et al., 2008 ; Yaakoubi et al., 2009**). Ils ont une forte charge polluante, 2kg d'olives pressées correspondent à la pollution rejetée par une personne (**Boudoukhana, 2008**).

Cette situation est aggravée par le caractère saisonnier de la production de l'huile d'olive et les volumes importants de margines approchant les 30 millions de m<sup>3</sup>/an, dont 98% sont concentrés dans les pays du pourtour méditerranéen (**Koutrotsios et Zervakis, 2014**).

#### I.2.2.6.1.Pouvoir polluant des margines

- Les margines sont caractérisés par une très grande variabilité de leur composants qui définissent leur propriétés. Notamment le pouvoir de pollution du produit (**Kapellakis et al., 2008**). Il s'agit :
  - De la DBO 20000 à 55000 mg/l.
  - De la DCO 60000 à 180000 mg/l.
  - Des résidus solides (3 à 10 %).
  - Des résidus insolubles (0.04 à 0.5 %) , les phénols et les lipides se décomposent à des vitesses de réactions beaucoup plus lentes que d'autres constituants, tels que les sucres ou les acides volatils à chaîne courte (**Kapellakis et al.,2008**). La toxicité des margines est due essentiellement à la présence des acides gras libres à longue chaîne et des composés phénoliques à fortes concentrations (4 à 15g/L) (**Zahari et al., 2014**).La résistance à la biodégradation, avec un taux de matière organique élevé, un pH acide sont à l'origine de plusieurs impacts environnementaux (**Ouzounidou et al.,2010**)

Par ailleurs, des études de toxicité et de biodégradabilité ont montré que les composés phénoliques qui sont de nature humiques et responsables de la coloration noire sont très peu toxiques et très difficilement biodégradables, par contre, les composés tanniques sont très toxiques mais biodégradables (**Boudoukhana, 2008**).

#### ➤ Pollution de l'eau

Généralement, le secteur oléicole se caractérise par des procédés mettant en jeu, la plupart du temps, la qualité de l'eau ce qui provoque une pollution hydrique. Le volume annuel des eaux usées rejetées, y compris ceux des huileries est estimé à environ 1400hm<sup>3</sup>/an et passera à plus de deux

milliard de m<sup>3</sup>/an à l'horizon 2020 (**Rizoun, 2012**). Les effets environnementaux négatifs comprennent :

- ❖ La décomposition et, par conséquent, l'hypoxie, qui induisent des réductions dans d'autres populations animales (poissons) (**Kapellakis et al., 2008 ; Aggoun, 2016**).
- ❖ La très forte charge en matières organiques empêche ces eaux de s'auto-épurer et la pollution s'étend sur de très longues distances (**Kapellakis et al., 2008**).
- ❖ Les polyphénols contenus dans ces effluents rejetés dans les cours d'eau de faible débit ou l'échange de l'air est limité, exercent une action antagoniste sur la flore et la faune aquatique en causant leur mort (**Lakrari, 2013**).
- ❖ Les phosphores accélèrent le développement des algues et augmentent la probabilité d'une eutrophisation entraînant un déséquilibre écologique dans les eaux naturelles (**McNamara et al., 2008**).
- ❖ La présence des tannins, provenant de l'olive et se trouvant dans les margines, provoque une décoloration de ces eaux (**Kapellakis et al., 2008 ; Djadoun, non daté**).
- ❖ Les sucres provoquent une augmentation de la population microbienne, par conséquent une augmentation de la consommation d'oxygène dissout, ce qui entraîne une réduction de sa disponibilité pour d'autres organismes vivants (**Yahyaoui, 2012**).
- ❖ Leur forte acidité provoque l'asphyxie de la faune et la flore marine (**Yahyaoui, 2012**).

➤ **Pollution de l'air**

La forte teneur en sels, en charge organique et leur acidité sursaturent les milieux récepteurs et provoquent des conditions d'anaérobioses propices aux dégagements d'odeurs désagréables liées à la formation du gaz H<sub>2</sub>S lors du processus de fermentation (**Boudoukhana, 2008 ; Yahyaoui, 2012**).

➤ **Pollution des sols**

La microflore du sol peut être détruite suite à l'acidification du milieu. Par ailleurs le caractère visqueux des margines entraîne la formation d'un dépôt huileux qui provoque l'imperméabilisation du sol dans un premier lieu et son asphyxie par la suite et la faible dégradation chimique des composés phénoliques (**Boudoukhana, 2008 ; Mahmoud et al., 2010 ; Djadoun, Non daté**). Par ailleurs, l'oxydation des margines entraîne la polymérisation des composés phénoliques en tanins (**Achak et al., 2008 ; Yaakoubi et al., 2009**).

### ➤ Pollution des plantes

Les composés phénoliques peuvent agir en tant que composants phytotoxiques, inhibant la croissance ainsi que la germination des plantes et la croissance végétative. Les résidus de pesticides présents dans les effluents d'huileries d'olive peuvent également être nocifs pour les plantes (Morillo *et al.*, 2009).

#### I.2.2.7. Différentes filières de valorisation des margines

A partir des années soixante-dix, ces effluents ont été l'objet d'une grande attention de la part des institutions scientifiques, des entreprises et des organismes publics (Leulmi, 2011). Ils ont fait l'objet de plusieurs études, certaines d'entre elles sont encore au stade d'expérimentation (Kavvadias *et al.*, 2010). La valorisation des déchets oléicoles présente un double intérêt (Fig.05. Annexe 01). D'une part, elle permet de résoudre un problème environnemental posé par les effluents des huileries qui ont un pouvoir polluant très élevé, mais aussi, et surtout de subvenir au besoin économique national (Bataiche, 2014).

##### I.2.2.7.1. Valorisation agronomique

L'utilisation des margines comme fertilisant, se fait selon Ouazzani, (2012) soit par épandage ou bien par compostage qui est une pratique ancienne, notamment dans les pays producteurs de l'huile d'olive (Moraetis *et al.*, 2011).

### ➤ Utilisation des margines comme fertilisant par épandage

L'épandage agricole des margines est l'une des solutions permettant de les valoriser, mais à condition que cette opération soit contrôlée et maîtrisée en respectant les doses à appliquer (Sahraoui, 2012). La richesse des margines en matière organique et en nutriments fait des margines un bio fertilisant à bas coût dans les pays Méditerranéens où les précipitations sont de plus en plus rares (Caputo *et al.*, 2013). Car d'une part, elles ne contiennent pas de métaux lourds et de microorganisme pathogènes, et d'autre part, elles sont riches en éléments minéraux nutritifs (K,N, P), en plus, comme elles sont constituées de matière organique, elles représentent un excellent substrat pour le développement de la microflore qui permet d'améliorer les propriétés physico-chimique du sol. Cette utilisation n'est pas sans inconvénients, ils génèrent une acidité et une salinité élevées, accumulation des lipides et des acides organiques (Yaakoubi *et al.*, 2009).

### ➤ Utilisation des margines comme fertilisant par compostage

La valorisation agricole des margines par compostage a pour but essentiel de fixer les éléments fertilisants sur un substrat carboné au cours d'un processus aérobie-anaérobie de substance organique des résidus, pour les restituer au sol en fonction des besoins des plantes. Un temps de contact long permettra d'avoir de bons rendements (fixation de résidus agricoles dans les margines) de ce fait ils sont moins susceptibles de migrer en grosse quantité vers la nappe (Yaakoubi *et al.*, 2009 ; Chouchene, 2010).

#### I.2.2.7.2.Récupération de quelques composants

Les travaux sur l'utilisation des margines comme source naturelle pour la production de composés phénoliques bioactifs sont en plein essor (Schaffer *et al.*, 2010 ; Lafka *et al.*, 2011). Ces coproduits de l'industrie oléicole paraissent être une source abordable et abondante de substances phénoliques biologiquement actives qui détiennent un potentiel prometteur en tant qu'antioxydants, agents anti-inflammatoires et antimicrobiens utilisés en pharmacie, en cosmétique et en agro-industrie (Yaakoubi *et al.*, 2009; Dermeche *et al.*, 2013; Rahmanian *et al.*, 2014).

#### I.2.2.7.3.Production des enzymes

La production industrielle des enzymes est possible par l'utilisation des levures et des champignons filamenteux issues de margines. Les principaux enzymes obtenus à travers le traitement par ces microorganismes sont les lipases, les laccases, les peroxydases et les pectinases (Goncalves *et al.*, 2010).

#### I.2.2.7.4. Production de la biomasse fongique

Un mélange de coproduits d'olivier (grignons d'olives, bois de la taille, margines) a été mis au point pour fabriquer le COS et l'utiliser à la fois comme substrat et support solide, pour la culture des microorganismes par FMS, en particulier des champignons filamenteux entomopathogènes, nématophages pour la production de biopesticide ou pour la culture du mycélium de champignons comestibles et médicinaux comme le Shiitake pour l'alimentation humaine et d'autre part la détoxification des margines pour servir à l'alimentation animale (Lakhtar, 2009; Lakhtar *et al.*, 2010 ). Il existe d'autres filières de valorisation des margines citons :

- Eau d'irrigation (eau traitée) (Kapellakis *et al.*, 2008).
- Fabrication des savons (savon de Marseille) (Dermeche *et al.*, 2013).
- Teinture du textile (laine) (Meski *et al.*, 2012).

- Préparation des boissons fonctionnelles (Zbakh *et al.*, 2012).

### I.2.2.8. Procédés de traitement des margines

Plusieurs traitements de dépollution des margines ont été testés et proposés pour faire face à leur impact environnemental. A noter que la plupart de ces applications sont seulement décrites dans la littérature scientifique (Dermeche *et al.*, 2013) mais ne seraient pas ou difficilement applicables sur le terrain (Aggoun, 2016).

Les choix de ces procédés dépendent des contraintes d'ordre socio-économiques et technique, à savoir le système utilisé pour l'extraction d'huile, la charge produite par les huileries et la voie de valorisation des margines. Toutefois, il existe plus de 20 procédés applicables au traitement des margines. Ils peuvent être classés en procédés physique, chimique et biologique. Ils peuvent être utilisés seuls ou combinés (Fig.06 .Annexe 01), testées en laboratoire ou dans une installation pilote sans projection industrielle ultérieure (Boudoukhana, 2008 ; Arda *et al.*, 2010 ; Leulmi, 2011; Iboukhoulef, 2014). Les tentatives de mise en place de techniques de dépollution des margines ont abouti à l'élaboration de procédés complexes et coûteux et surtout à générer d'autres sous-produits difficiles à gérer (Schaffer *et al.*, 2010 ; Lafka *et al.*, 2011 ; Aouadi, 2012).

## I.3. Les champignons

### I.3.1. Généralité

Les micromycètes sont des champignons microscopiques regroupant les levures et les moisissures. Ce sont des eucaryotes caractérisés par la présence d'une membrane nucléaire et de mitochondries (Aurélié, 2013). Ils sont ubiquitaires (Nafee, 2009).

Les moisissures sont des champignons filamenteux microscopiques apparus sur terre il y a 550 millions d'années, sont très nombreuses, cosmopolites, saprophytes, symbiotes ou parasites (Lavaud *et al.*, 2008 ; Aurélié, 2012b). Les champignons filamenteux sont hétérotrophes et plus particulièrement absorbotrophes. Ils synthétisent leurs propres nutriments à partir de l'eau et des éléments nutritifs et minéraux. Les molécules complexes comme l'amidon, la cellulose ou les protéines nécessitent une digestion enzymatique préalable s'effectuent par la production d'enzymes ou d'acides. Leur développement est également dépendant de l'environnement (Tab.03) (Aurélié, 2013).

**Tableau 03:** Principaux paramètres environnementaux qui affectent le développement des champignons (Aurélie, 2013).

Paramètres	Normes
L'humidité relative (HR)	0,85 et 0,99.
La température	La majorité des moisissures sont mésophiles (20-25°C), mais d'autre sont psychrophiles, thermophiles.
L'oxygène	Aérobies.
pH	4,5 et 8 avec optimum soit compris entre 5,5 et 7,5.

### I.3.2.Méthodes d'identification des champignons filamenteux

L'identification des champignons filamenteux en routine repose essentiellement sur l'analyse des caractères morphologiques macroscopiques et microscopiques. Ces méthodes d'identification peuvent être complétées par une analyse moléculaire (Aurélie, 2013).

#### I.3.2.1.Etude morphologique

La morphologie est l'outil principal de la systématique des champignons. La majorité des 11.000 espèces de champignons filamenteux décrites jusqu'à présent sont des espèces morphologiques (Lamrani, 2009). Parmi ces critères on peut citer :

##### ➤ Etude macroscopique

Elle repose sur l'observation des colonies obtenues après culture (Tab. 04).

**Tableau 04 :** Différents caractères macroscopiques des champignons filamenteux (Aurélie, 2013).

L'aspect	Le relief	La taille	La couleur recto et verso
duveteux, laineux, cotonneux, velouté...	plat, plissé ou cérébriforme...	petite, étendue ou envahissante ...	blanche, crème ou colorée, verte, brune...

La présence d'un pigment diffusant dans la gélose ainsi que la vitesse de croissance apicale et la température de développement peuvent être des bons indicateurs pour l'identification (Aurélie, 2013), leur transparence (opaque, translucide), l'allure des contours et l'odeur (Boudih, 2011).

### ➤ Etude microscopique

L'analyse microscopique est fondée sur l'aspect morphologique des différentes structures des champignons filamenteux (**Boudih, 2011**) :

- **Le thalle végétatif** : septé (diamètre étroit et régulier de 2 à 5  $\mu\text{m}$ ) ou siphonné (filaments peu ou pas ramifiés, l'ornementation et le diamètre large et irrégulier de 5 à 15  $\mu\text{m}$ ), paroi pigmentée (mélanisée) ou non (hyaline) (**Aurélie, 2013**), la couleur des hyphes (foncées ou claires), son mode de ramification et la différenciation des thallospores (**Boudih, 2011**).

-**Les organes de fructifications** : Dans ce cas, les caractères suivant sont à prendre en considération : La forme, la couleur, la dimension, la texture des parois et l'ornementation. Ainsi que la présence ou non d'organes protecteurs des conidies, modes de formation des conidies (issues directement du thalle, solitaires (aleuriospores) ou en chaînes (arthrospores), mode de production (produites par bourgeonnement et regroupées soit en grappes, en masse, en têtes ou en chaînes basipètes ou acropètes), modes d'implantation des cellules conidiogènes indifférenciée ou peu indifférenciée et différenciées (sur le filament végétatif, porté sur les conidiospores dispersés ou groupés) (**Aurélie, 2013**).

-**Les spores**: l'origine des spores : endogènes (endospores) ou exogènes (conidiospores ou conidies), l'aspect des spores [améropores (unicellulaires et de petite taille), didymospores (bicellulaires), phragmospores (pluricellulaires à cloisons transversales), dictyospores (pluricellulaires à cloisons transversales et longitudinales), scolécospores (étroites et effilées)], la forme des têtes (en forme de pinceau, aspergillaire) et la présence ou non de chlamydospores ou d'exsudat (**Aurélie, 2013**).

#### I.3.2.2. Approche chimique

L'approche chimique qui se base sur des méthodes chromatographiques et spectroscopiques permet de mener des analyses aussi bien quantitatives que qualitatives pour élucider les structures des métabolites ou des composés de la membrane cellulaire. Il s'agit principalement des polysaccharides, des lipides insaponifiables, des acides gras et des métabolites secondaires volatiles et non volatiles (**Lamrani, 2009**).

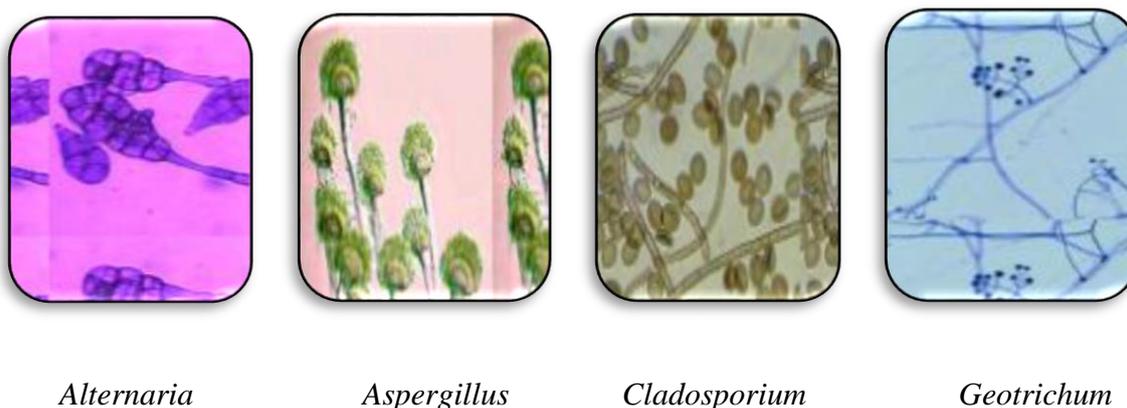
#### I.3.2.3. Etude moléculaire

Quand les champignons filamenteux sont peu différenciés et/ou sensibles aux conditions environnementales, les méthodes morphologiques, physiologiques et biochimiques s'avèrent alors

non seulement laborieuses et longues mais aussi quelquefois inefficaces (**Lamrani, 2009**). L'émergence de la PCR, RFLP et d'autres techniques ont permis d'importants progrès des techniques moléculaires. Permettant d'étudier le polymorphisme génétique des différents champignons filamenteux et de les discriminer à différents niveaux taxonomiques. En comparant leur spectre avec ceux d'une librairie de spectres de référence (**Pitt et al., 2009**).

### I.3.3. Les phylums fongiques

A l'instar des autres organismes vivants, les champignons sont subdivisés en classes, en ordres, en familles, puis en genres et espèces (**Boudih, 2011**). La classification des champignons est d'abord basée sur un mode de reproduction sexuée ou phase téléomorphe. Les mycètes constituent un règne autonome appelé Mycota qui comprend 60 000 à 100 000 espèces (**Reboux et al., 2010**) divisé en cinq groupes principaux : les Chytridiomycètes, les Zygomycètes, les Basidiomycètes et les Ascomycètes. Certaines moisissures sont le plus souvent ou exclusivement rencontrées à un stade de multiplication asexuée dit anamorphe. Ils sont alors classés d'après le mode de production des spores asexuées ou conidies dans le cinquième ordre ce sont les Deutéromycètes ou Champignons imparfaits. Les champignons microscopiques filamenteux sont nommés selon des règles internationales précises énoncées au XVIIIème siècle par Carl Von Linné, comprenant un nom de genre, suivi du nom de l'espèce et du nom de l'auteur l'ayant décrit (**Fig.09**) (**Boudih, 2011 ; Dugat, 2014**).



**Figure 09** : Quelques genres de champignons filamenteux (**Anonyme, 2018**).

### I.3.4. Développement des champignons filamenteux

Le développement des moisissures comprend deux phases : une phase végétative et une phase reproductive (**Aurélié, 2013**).

### I.3.4.1. La phase végétative

Le développement des champignons se fait par croissance apicale et élongation des filaments parfois visibles sous forme de petites tâches colorées à leur surface à partir de leurs extrémités dans toutes les directions et de façon identique. Le mode de croissance se traduit par la mise en place de colonies circulaires (thalles) caractéristiques des champignons sur milieu gélosé. Il existe deux types de ramifications : la ramification par dichotomie (apex) ou par bourgeonnement (latéral). Cette phase correspond également à la phase de nutrition qui constitue une phase active de développement (**Lamrani, 2009 ; Aurélie, 2013**).

### I.3.4.2. La phase reproductive

Comprend deux types de reproduction : la reproduction asexuée correspondant à la forme anamorphe et la reproduction sexuée correspondant à la forme téléomorphe (**Aurélie, 2013**).

#### I.2.4.2.1. La reproduction asexuée

Elle correspond majoritairement à la dispersion de spores mitotiques asexuées produites dans le cycle normal du mycélium végétatif, permettant la propagation des moisissures afin de coloniser d'autres substrats. Au cours de laquelle une spore ou un fragment de mycélium croît, s'allonge par l'extrémité apicale et se ramifie pour donner un nouveau mycélium. Dans cette catégorie, il existe deux types de spores : des spores endogènes et des spores exogènes produites soit à la surface du mycélium ou sur des filaments spécialisés libres ou groupés dans une structure spécialisée appelée pycnide. Après propagation et lorsque les spores se sont déposées sur un nouveau substrat, celles-ci peuvent rester inertes tant que l'environnement n'est pas favorable à leur développement. Ce n'est que lorsque les conditions environnementales deviennent favorables qu'elles « germent » comme des graines et émettent du mycélium (**Lamrani, 2009 ; Aurélie, 2013**).

#### I.3.4.2.2. La reproduction sexuée

Les modalités de la reproduction sexuée sont très variées (**Lamrani, 2009**) qui implique la rencontre de deux mycéliums de signes sexuels opposés. Un mycélium à  $n$  chromosomes va rencontrer un autre mycélium à polarité complémentaire pour donner lieu à la fusion des cytoplasmes, ce qui engendre un nouveau mycélium à  $2n$  chromosomes. Les cycles de vie diffèrent d'un champignon à un autre selon leur type de spores (**Boudih, 2011**).

### I.3.5.Importance des moisissures

Les champignons filamenteux présentent un intérêt au sein de l'environnement humain, de manière bénéfique ou néfaste, avec des conséquences économiques. Ils sont impliqués dans différents domaines tels que l'industrie agroalimentaire, pharmaceutique et cosmétique, ainsi que dans le secteur médical (**Aurélie, 2013**). Ces derniers ayant une application étendue en biotechnologie (**Compaoré *et al.*, 2017**) (**Tab. IV. Annexe 01**).

#### I.3.5.1.Secteur agroalimentaire

Au sein de l'industrie agroalimentaire, certaines moisissures sont utilisées pour la production de fromage comme le roquefort (*P.roqueforti*) ou le camembert (*P. camemberti*) (**Cantu *et al.*, 2009**). La synthèse d'enzymes telles que la maltase et la dextrinase servant à transformer le maltose et l'amidon en alcool (*Rhizopusoryzae*) (**Chaiwun *et al.*, 2011**).

#### I.3.5.2.Secteur pharmaceutique et médicale

Au sein de l'industrie pharmaceutique, certaines moisissures sont utilisées pour la synthèse de médicaments, notamment d'antibiotiques telles la pénicilline (*P. chrysogenum*) ou les céphalosporines (*Cephalosporium acremonium*) (**Aurélie, 2013**).

#### I.3.5.3.Intérêt économique

Du point de vue économique, grâce à leurs capacités de produire des acides organiques (l'acide citrique et itaconique), pigments et antibiotiques .Elles jouent aussi un rôle important dans le recyclage des matières organiques en puisant leur énergie à partir de sources carbonées externes (**Aurélie, 2013**).

#### I.3.5.4.Intérêt phytosanitaire

Les déchets agroindustriels constituent un excellent substrat solide pour réaliser des cultures de champignons filamenteux entomopathogènes ou nématophages. Dans la mesure où des conditions optimales de culture sont obtenues pour chaque microorganisme, le produit fermenté obtenu, s'avérer après retour au champ être un excellent agent pour une lutte biologique contre certains bio-agresseurs des cultures (**Rossas *et al.*, 2009**).

#### I.3.5.5.Production d'enzymes lipolytiques (lipases)

Les enzymes sont des macromolécules, majoritairement, de nature protéique. Elles sont des polypeptides de masses moléculaires élevées situées entre 10 à 1000 k Da (**Jarrar, 2011**). Entre eux

les lipases ou encore appelées triacylglycérols-acyl hydrolases (EC 3.1.1.3) appartiennent à la famille des hydrolases d'esters carboxyliques. Leur rôle physiologique est d'hydrolyser les triglycérides en diglycérides, monoglycérides, acides gras et glycérol (**Alloue *et al.*, 2008**). Elles sont omniprésentes dans la nature et peuvent être obtenues à partir de nombreuses sources, telles que les plantes, les microorganismes et les animaux (**Treichel *et al.*, 2010 ; Salihu *et al.*, 2012**).

De nombreux microorganismes sont connus comme des producteurs potentiels de lipases extracellulaires, notamment les bactéries, les levures et les moisissures (**Rigo *et al.*, 2010**). A cause de leur stabilité, efficacité et pureté, les lipases d'origine microbienne sont les plus utilisées dans les applications biotechnologiques et de la chimie organique (**Treichel *et al.*, 2010**).

## II. Matériel et méthode

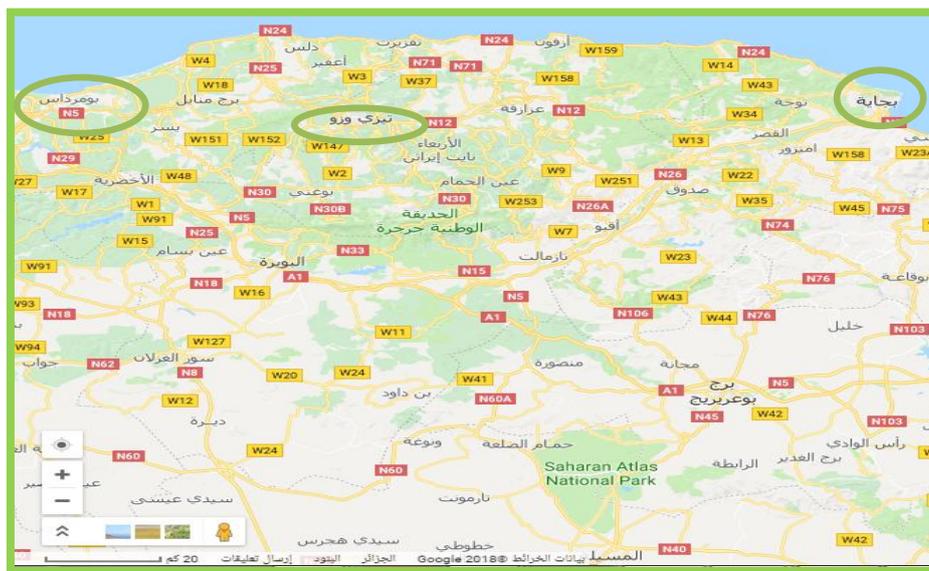
Dans ce travail, nous avons essayé d'évaluer les caractères physico-chimiques et microbiologique margines qui nous ont été fournis à partir des unités de trituration d'olives de 3 différentes régions d'Algérie, qui sont Bejaïa, Boumerdès et Tizi Ouzou. Aussi, on s'est particulièrement intéressé à mettre en valeur la biodiversité des champignons filamenteux mésophiles contenus dans ce rejet liquide. L'étude a été réalisée au niveau de laboratoire de recherche VALCORE et le laboratoire d'analyses physico-chimiques de département de chimie de la faculté des sciences (UMBB). Ainsi que certaines analyses microbiologiques ont été conduites au niveau de laboratoire de microbiologie de la laiterie et fromagerie de Boudouaou (LFB).

### II.1. Matériels

#### II.1.1. Matériel végétale

Le matériel biologique est présenté par les margines (Amoredj), issus des Maâsras dotés d'un système d'extractions à trois phases localisées dans trois unités trituration moderne de stations différentes régions principalement au niveau de 3 stations (unités de) : Bejaïa (Sidi Aiche) , Tizi-Ouzou (Boughni) et Boumerdès (Thyzza).

Ces trois villes sont situées dans trois régions différentes, qui sont connues par une importante production oléicole, ceci est dû aux grandes surfaces de plantation de l'olivier ainsi qu'aux conditions climatiques caractéristiques à ces régions (**Fig.10**).



**Figure 10:** Localisation géographique des régions concernées par la collecte des margines.

(Google Map, 2018).

### **I1.1.1.1.Prélèvement d'échantillons**

Les échantillons fraîches prélevées ont été suffisamment homogénéisés et obtenue sans modification de leurs caractéristiques. Cependant les résultats analytiques et leur interprétation dépendent étroitement de la manière de prélèvement, de conditionnement et de la durée de stockage. Pour cela nos échantillons ont été prélevés dans des bouteilles opaques en plastique de 1,5 L bien remplies et fermées de manière à assurer que le milieu est exempt d'oxygène. Une fois les échantillons prélevés, ils sont conservés dans une glacière à 5°C et transportés le plus tôt possible au laboratoire, puis subdivisées d'une manière homogène dans des flacons de 180ml et réfrigérer à 4° C à l'abri de la lumière afin d'éviter leur fermentation jusqu'au jour de l'analyse.

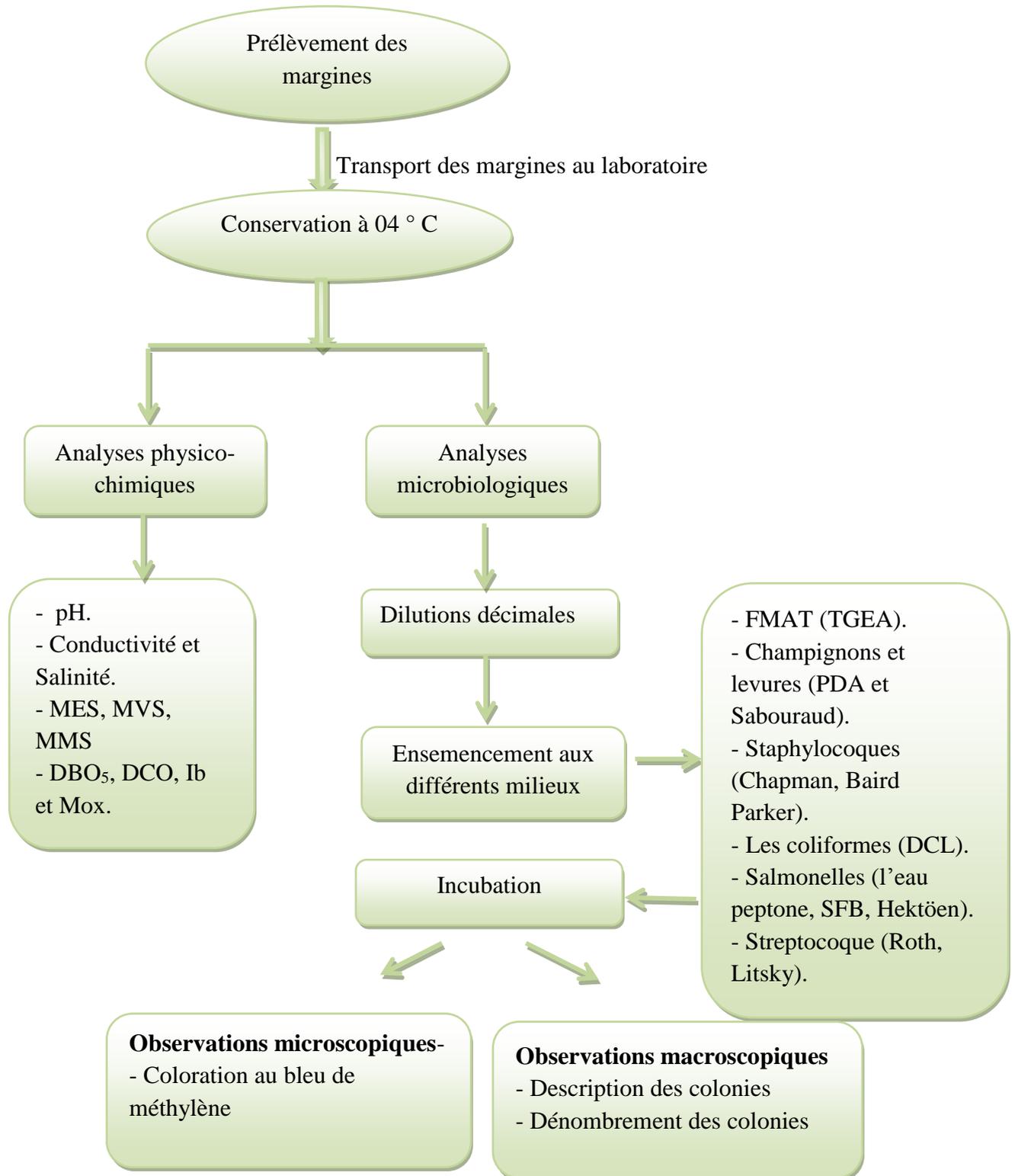
### **I1.1.2. Matériel non biologiques**

Dans ce présent travail, la fréquence des études qualitatives et quantitatives et leurs variétés font qu'il est nécessaire de disposer d'un nombre élevé de milieux de culture et de divers matériels allant de grands matériels ,verreries et petit matériels, milieux de culture, milieux d'enrichissements et produits et réactifs (**Tab I. et II Annexe 02**).

**Méthode**

**11.1.3. Paramètres analytiques de base des margines**

La procédure expérimentale adoptée est illustrée dans l'organigramme présenté dans la figure suivante (Fig.11) :



**Figure 11** : La procédure expérimentale de notre étude.

### II .2. 1. Etude physico-chimique des margines

La caractérisation physico-chimique et minéralogique a été basée sur l'étude des paramètres suivants : Acidité (pH), Conductivité, salinité, matières en suspension (MES), matière minérale (MMS), matière volatile (MVS), demande chimique en oxygène (DCO), demande biochimique en oxygène (DBO<sub>5</sub>), indice de biodégradabilité (Ib), matière oxydable (Mox) et fonctions organiques (spectre infrarouge). Avant de procéder au dosage des différents paramètres physico-chimiques, les échantillons de margines ont été bien homogénéisés.

#### II .2. 1.1. Mesure de pH

##### Principe

Le pH donne une indication sur l'acidité ou l'alcalinité du milieu, il est déterminé à partir de la quantité d'ions H<sup>+</sup> libres contenus dans l'échantillon (AFNOR, 1983). La mesure de pH est faite pour les trois échantillons de margines non dilués et à température ambiante (Rodier *et al.*, 2009).

##### Mode opératoire

La mesure de pH est faite pour trois échantillons de marge non dilués (brutes). Après rinçage et l'étalonnage du pH-mètre, on plonge l'électrode de mesure dans un bécher contenant un volume de 20 à 30 ml de margines et on note le pH sur l'appareil (Fig.12) (Rodier *et al.*, 2009).



Figure 12 : Mesure de pH des échantillons des margines.

#### II .2. 1.2. Conductivité électrique et la salinité

##### Principe

Cette propriété électrochimique est basée sur le fait que la conductance d'une solution s'accroît au fur et à mesure que les concentrations en cations et anions, porteurs des charges électriques,

augmentent. La conductivité électrique est mesurée par un conductimètre de terrain, elle est exprimée en ms/cm en prenant compte de la température de mesure (**Rodier et al., 2009**).

### Mode opératoire

Après le rinçage de la sonde du conductimètre, on la plonge dans un bécher contenant 20 à 30 ml de margine à analyser, en prenant soin à ce que l'électrode soient complètement immergés.

On agite les margines afin que la concentration ionique entre l'électrode soit identique à celle du liquide ambiant et aussi pour éliminer les bulles d'air d'électrode, on lit la valeur de conductivité (CE) en prenant compte la température de mesure (**Rodier et al., 2009**).

❖ **La salinité (S)** : Elle est déduite à partir de l'expression suivante :

$$S \text{ (g/L)} = 0,7 \times \text{CE (Ums/cm)}$$

## II .2. 1.3. Matière en suspension (MES)

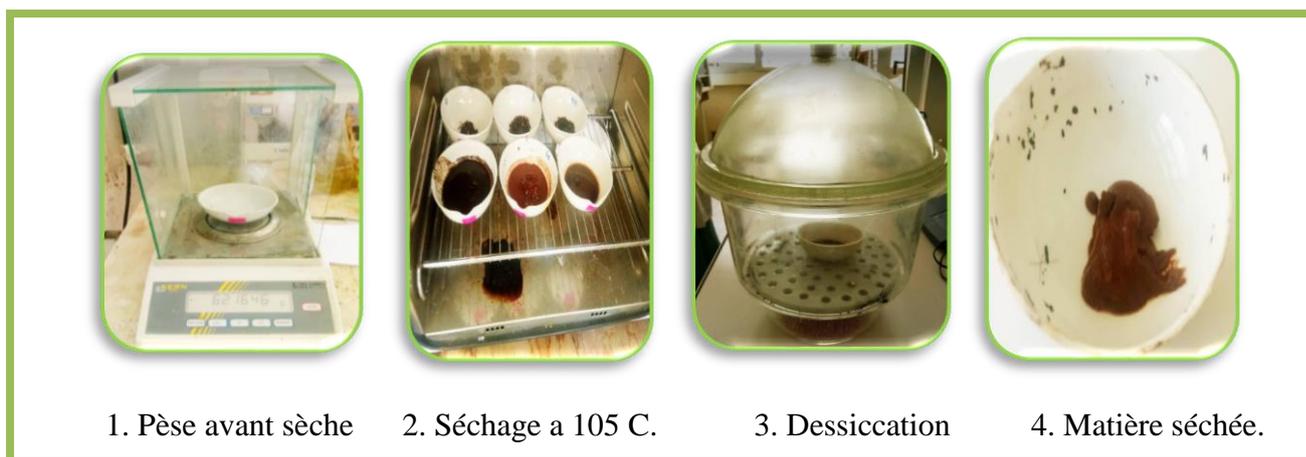
### Principe

La définition d'ISO des matières en suspension (**AFNOR, 1999a**) indique que : «il s'agit des matières éliminées par filtration ou centrifugation dans des conditions définies ». Deux techniques sont actuellement utilisées pour la détermination des matières en suspension elles font appel à la séparation par filtration directe ou centrifugation. On réserve cette dernière méthode au cas où la durée de la filtration dépasse une heure environ (**AFNOR T90-105**).

### Mode opératoire

#### Méthode de centrifugation

Après homogénéisation de margines, les volumes de 50ml sont centrifugés à grand vitesse (8000trs/mn) pendant 20mn, les culots déposés au fond du pot de la centrifugeuse sont transvasés dans des capsules en porcelaine préalablement séchées à 105°C et pesées ( $M_1$ ). On rince les pots de centrifugation avec l'eau distillée et on recueille les eaux d'entraînement dans les capsules, par la suite on les sèche à une température de 105°C ± 2°C, après élimination totale de l'eau on laisse les capsules se refroidies dans un dessiccateur et on pèse de nouveau, on répète les opérations de séchage, de refroidissement et de pesée jusqu'à ce que la différence entre deux pesées successives ne dépasse pas 0,5 mg ( $M_2$ ) (**Fig.13**).



**Figure 13** : Les étapes de mesure de la matière en suspension des margines.

### Expression des résultats

Le calcul de la teneur en matières en suspension est effectué d'après l'expression suivante :

$$P = (M1 - M2) / V. (10^{-3})$$

**P** : Teneur en matières en suspensions, en gramme par litre.

**V** : Volume en millilitre de la prise d'essai.

**M0** : Masse en grammes, de la capsule vide.

**M1** : Masse en milligrammes, du creuset et son contenu après séchage à 105°C et dessiccation (**Rodier, 2009**).

### II .2. 1.4. Détermination de la matière minérale en suspension (MM) et la matière volatile en suspension (MVS)

#### Principe

La teneur en matière minérale est le résidu d'une substance après destruction de la matière organique par une incinération (**AOAC, 1975**).

#### Mode opératoire

Pour la détermination des matières minérales et volatiles, la marge est centrifugée à grande vitesse comme pour le cas de MES. Après récupération du culot est le séchage à 105°C, le culot est calciné à 525°C pendant 2h. Après son refroidissement dans un dessiccateur, on pèse les capsules jusqu'à l'obtention d'une masse constante ( $M_3$ ) ( $M_1c'$  est la masse de capsule vide) (**Fig.14**).



**Figure 14:** Les étapes de mesure de la matière minérale des margines.

La teneur en matière minérales en suspension est donnée par la formule suivante (**Rodier et al., 2009**).

$$[\text{MMS}] \text{ (g/l)} = (\text{M}_3 - \text{M}_1) / \text{VE} 10^{-3}$$

La différence entre les concentrations de MES et MMS est considérée comme les matières volatiles en suspension MVS (**Rodier et al., 2009**).

$$[\text{MVS}] \text{ (g/l)} = (\text{MES} - \text{MMS}) / \text{VE} (10^{-3})$$

## II .2. 1.5. Spectroscopie infrarouge IR-TF

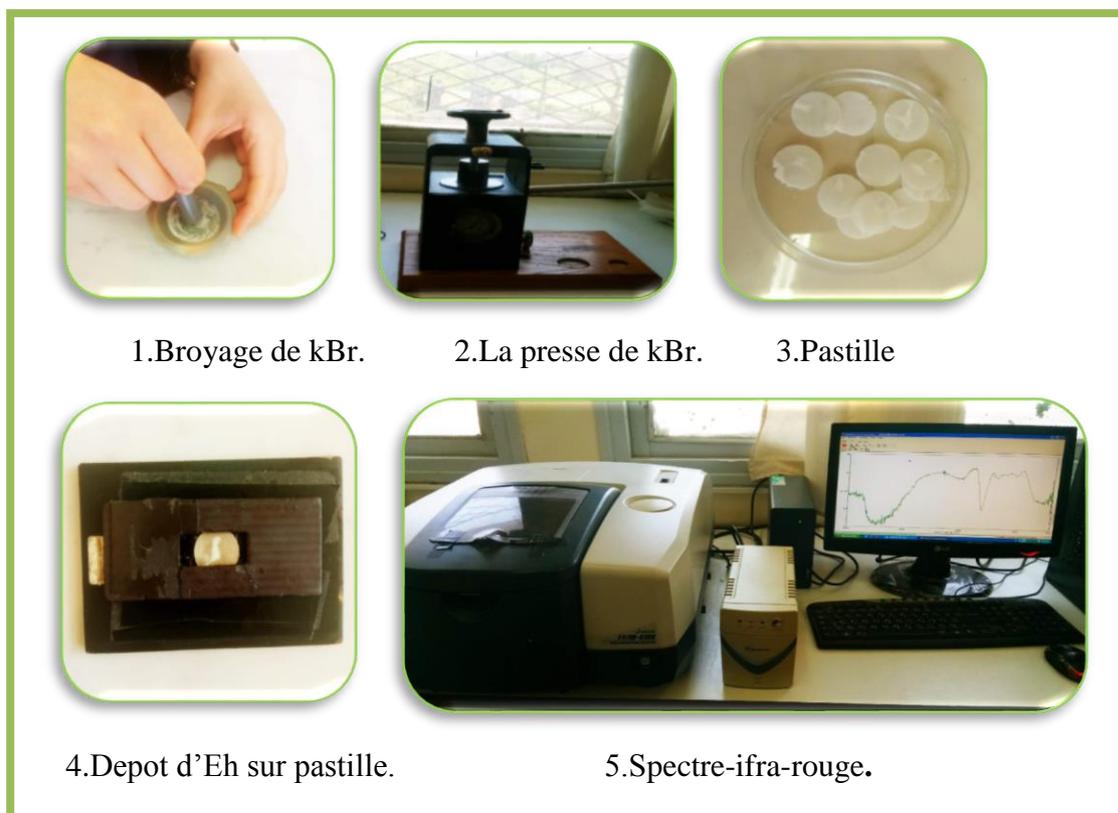
### Principe

La spectroscopie infrarouge est l'une des méthodes les plus efficaces et répandues pour l'identification des molécules organiques et inorganiques à partir de leur propriétés vibrationnelles. En effet, le rayonnement infrarouge excite les atomes, lesquels subissent des vibrations selon divers modes qui sont : déformation, élongation symétriques ou non symétriques. Elle permettra de mettre en évidence plusieurs constituants peuvent être déterminés à partir d'un seul spectre observable à  $3300 \text{ cm}^{-1}$  (**Leulmi, 2011**)

### Mode opératoire

100 mg de KBr (bromure de potassium) sont broyés finement et pressés afin d'obtenir une pastille. L'échantillon de margines est déposé dans la pastille obtenue qui est éclairée par la suite par un rayonnement polychromatique qui couvre le domaine spectral de  $4000-400 \text{ cm}^{-1}$ . Une fois

l'infra-rouge traverse l'échantillon le spectre infra-rouge est enregistré sur l'ordinateur donnant des pics indiquent chaque un une fonction organique ou inorganique précise (**Fig.15**).



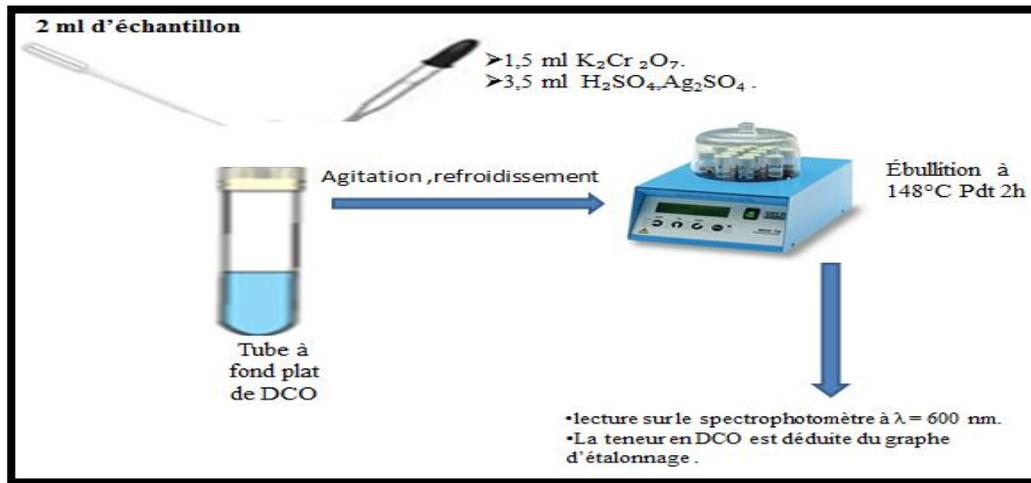
**Figure 15** : Les étapes de mesure au spectre Infrarouge des margines.

### II .2. 1.6. Détermination de la DCO selon la méthode de kit Hach LCK 114/314

La DCO est la mesure de la quantité d'oxygène nécessaire pour la dégradation chimique de toute la matière organique biodégradable ou non, contenue dans les margines à l'aide de dichromate de potassium ( $K_2Cr_2O_7$ ) à  $150\text{ }^\circ\text{C}$ . Le chlorure est masqué par sulfate de mercure. La coloration verte de  $Cr^{3+}$  est évalué. Elle est exprimée en  $\text{mg d'O}_2/\text{l}$  (**Rodier et al., 2009 ; Metahri, 2012**).

#### Mode opératoire

Cette méthode est basée sur une oxydation à ébullition ( $150^\circ\text{C}$  pendant 2 heures) des matières réductrices par un excès de dichromate de potassium en milieu acide ( $H_2SO_4$ ), et en présence du sulfate d'argent comme catalyseur et du sulfate de mercure comme complexant des chlorures. En fin de la réaction, la DCO est évaluée par prise d'un échantillon convenablement dilué avant l'oxydation. La densité optique de l'échantillon est obtenue par spectrophotométrie à une longueur d'onde de  $585\text{ nm}$ . Les valeurs de la DCO sont mesurées à l'aide d'un spectrophotomètre (**Fig. 16**) (**Rodier et al., 2009**).



**Figure 16:** Différentes étapes de la mesure de la DCO des margines.

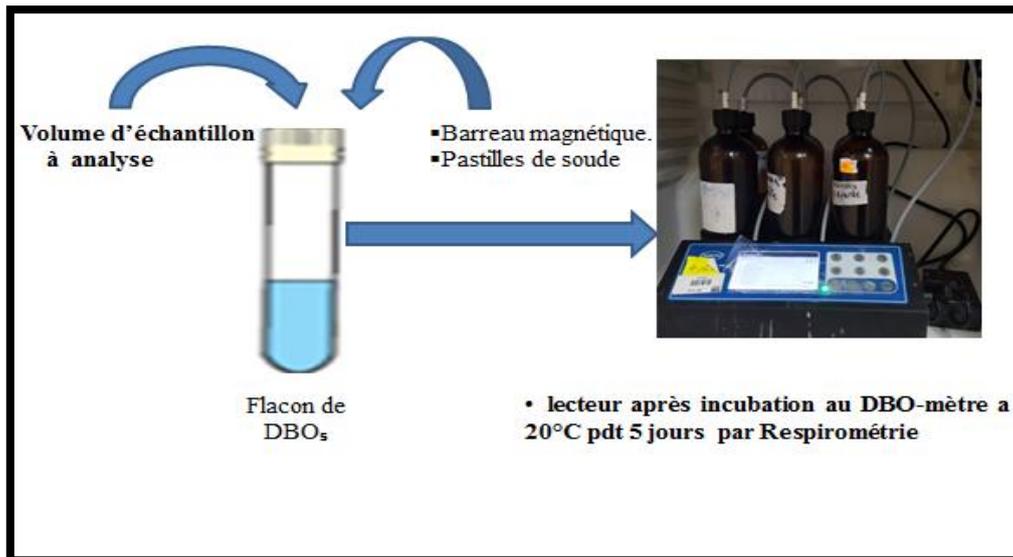
### II .2. 1.6. Détermination de la DBO<sub>5</sub>

La DBO<sub>5</sub> est la quantité d'oxygène consommée par les microorganismes à 20 C°, dans l'obscurité et pendant cinq jours d'incubation c'est le temps qui assure l'oxydation par voie biochimique d'une fraction de matière organique carbonée contenue dans l'échantillon. La consommation d'oxygène est proportionnelle à la quantité de matière organique biologiquement oxydable contenue dans l'échantillon, et donc à son niveau de pollution (**Rodier et al., 2009; Metahri, 2012**). La mesure de la DBO<sub>5</sub> de nos échantillons a été faite par une méthode respirométrique à l'aide d'un DBO-mètre. Les résultats sont exprimés en mg d'O<sub>2</sub>/l (**Rodier et al., 2009**).

#### Mode opératoire

La mesure de la DBO<sub>5</sub> est faite par une méthode respirométrique, en utilisant un DBO-mètre. On prélève un volume de 2,5 ml de margine et on le dilue 100 fois avec de l'eau distillée au début, on corrige le pH de chaque échantillon dans un intervalle de 6,5 et 7,5 par l'ajout de Na OH. On introduit chaque échantillon dans une bouteille de DBO5 mètre. Et on règle la charge des bouchons à 250mg d O<sub>2</sub>/l correspondante au volume introduit (250 ml). La dépression due à la consommation d'oxygène et l'adsorption du gaz carbonique par la potasse est mesurée à l'aide du manomètre à mercure (**Fig. 17**). Les valeurs de la DBO<sub>5</sub> sont exprimées comme suit (**Rodier et al., 2009**):

$$DBO_5 \text{ (mg d'o}_2\text{/l)} = \text{Valeurs lues} \times \text{facteur dilution.}$$



**Figure 17 :** Différentes étapes de la mesure de la DBO<sub>5</sub> des margines.

### II .2. 1.7. L'indice de la biodégradabilité (Ib)

Il est exprimé par le rapport DCO/DBO<sub>5</sub> à une importance pour la définition de la chaîne d'épuration d'un effluent. Les résultats de ce rapport constituent une indication de l'importance des matières polluantes peu ou pas biodégradables. Le rapport DCO/DBO<sub>5</sub> permet de déterminer Ib, indicateur de l'importance des matières polluantes peu ou pas biodégradables (**Rodier 1996**). Si :

Ib > 6 Substrat difficilement biodégradable

3 < Ib < 6 Substrat partiellement (ou moins facilement) biodégradable

Ib < 3 Substrat très facilement biodégradable

### II .2. 1.8. Matière Oxydable (MOx)

La matière oxydable constitue l'essentiel de la partie biodégradable de la pollution organique rejetée. Ce concept, purement administratif, est exprimé par (**Rodier 1996**) :

$$MOx = \frac{2}{3} DBO_5 + \frac{1}{3} DCO$$

### II .2. 2. Etude microbiologiques des margines

Les analyses microbiologiques ont été portées sur la recherche et le dénombrement des germes susceptibles d'évoluer dans les échantillons des margines, principalement les indicateurs de pollution qui regroupent les bactéries hétérotrophes aérobies mésophiles tels que : Coliformes Totaux (CT) et Coliformes Fécaux (CF), Flore Mésophile Aérobie Totale (FMAT) des Streptocoques Fécaux (SF), Les salmonelles et des Staphylocoques. Nous exigeons aussi la

recherche les bactéries lactiques ainsi que des levures et des moisissures (**Tab. 06**). Nous avons également isolé quelques souches de moisissures et étudier leur activités lipolytique (**Tab.09**).

### II.2.2.1.Préparation des dilutions décimales

#### Principe

Après homogénéisation des échantillons des margines, une série de dilutions en cascade dans l'eau physiologique (NaCl à 0.9%) stérile est réalisée depuis la dilution  $10^{-1}$  jusqu'à la dilution  $10^{-4}$ , les dilutions sont toujours effectuées dans des conditions aseptiques. Les pipettes conseillées sont à écoulement totale. Les tubes de diluant peuvent être préparés et autoclavés à l'avance. La préparation des dilutions décimales est si nécessaire en vue de réduire le nombre des microorganismes par unité de volume pour permettre, après incubation d'observer leur éventuel développement (cas de tubes) ou effectuer le dénombrement des colonies (cas de boîtes) (**Guiraud et Rosec, 2004**).

#### Mode opératoire

On utilise les dilutions pour faciliter le dénombrement des germes. Au début, on fait une préparation des tubes d'essai de 16/160 m, dans chacun de ces tubes, on prélève aseptiquement 9 ml d'eau physiologique stérilisée dans l'autoclave pendant 20 minutes à  $120^{\circ}\text{C}$ , ceci permet d'obtenir une précision maximale. Après agitation manuelle de récipient contenant les margines à diluer et à l'aide d'une micropipette, on prélève 1 ml de ce liquide que l'on introduit dans le tube qui contient 9 ml de diluant stérile, le tube est agité au moyen d'un Vortex. On obtient donc la dilution  $10^{-1}$  (1/10) à partir de cette dernière, on met 1 ml dans un autre tube d'eau physiologique donnant ainsi une dilution de  $10^{-2}$  (1/100). On poursuit cette méthode jusqu'à l'obtention de la dilution  $10^{-4}$  en changeant à chaque fois d'embouts pour ne pas perturber les concentrations(**Fig.18**) (**Guiraud et Rosec, 2004**).

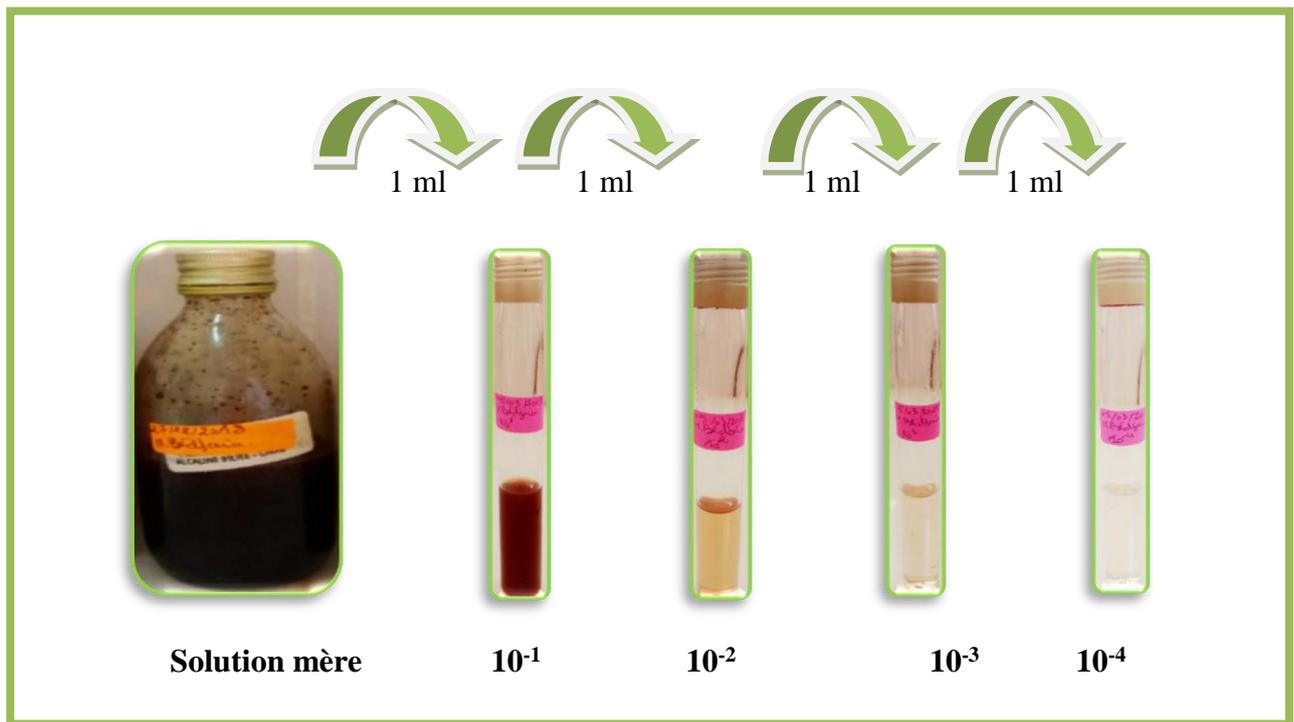


Figure 18: Préparation des dilutions décimales des margines

**Tableau 05:** Milieux nutritifs et conditions de culture des différents groupes microbiens recherchés dans les margines.

Les bactéries recherchées	Milieu utilisé	Type d'ensemencement	Incubation	
			Durée	T°
La flore totale aérobie Mésophile (FMAT)	PCA (Plate Count Agar)	En masse	48 à 72 heures	30°C
Coliformes totaux	Désoxycholate	En masse	24 heures	37°C
Coliforme fécaux	Désoxycholate	En masse	24 heures	44°C
Streptocoque fécaux	Litsky	En liquide	24 heures	37°C
Entérobactéries pathogènes (Salmonelles)	Hektoen	Surface (Striés séries)	24heures	37°C
Bactéries halotolérantes (Staphylococcus sp)	Chapman	Surface (Etalement)	24heures	37°C
Bactéries lactiques	MRS	En masse	24 heures	30°C
Les moisissures	PDA	Surface	5 jours	25 °C
les levures	Sabouraud	Surface	3 jours	25°C

## II.2.2.2. Recherche et dénombrement des souches

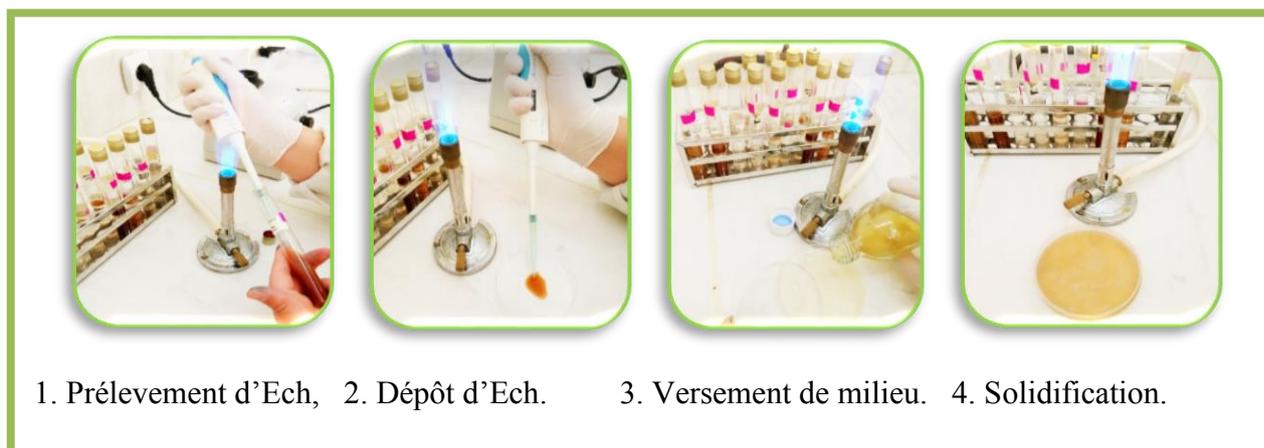
### II.2.2.2.1. La flore totale aérobie mésophile (FMAT)

#### Principe

Appelée aussi "Flore totale" ou nombre très approximatif des germes qui se trouvent dans différents produits. Elle renferme les microorganismes pathogènes et saprophytes, originelle ou apportée lors des manipulations, le nombre de germes totaux peut donner une indication de l'état de la fraîcheur ou de décomposition (altération) des denrées (**Bourgoie, 1996 ; Guiraud, 1998 ; Guiraud, 2003 ; Guiraud et Rosec, 2004**). Le comptage des colonies est réalisé à 30° C par la technique d'ensemencement en profondeur sur milieu TGEA incubé 48h a 72h il est exprimé en UFC, selon les normes d'**ISO 4833-1-2013**.

**Mode opératoire**

À l'aide d'une micropipette on introduit aseptiquement 1ml à partir de la dilution  $10^{-1}$  jusqu'à  $10^{-4}$  des margines dans des boîtes de Pétri vides préparée à cet usage et numérotées. Dans lesquelles on verse la gélose TGEA fondue et refroidi à  $45\text{ °C} \pm 1$ . Pour permettre à l'inoculum de se mélanger à la gélose utilisée on effectue des mouvements soigneusement circulaires et de va-et-vient en forme de 8 et on laisse les boîtes solidifier sur la paillasse qui seront incubées couvercle en bas pour éviter le phénomène de condensation à  $30\text{ °C}$  pendant 72 h (**Fig.19**) (**Guiraud, 1998**).



**Figure19:** Les étapes de la recherche et du dénombrement de la FMAT sur milieu TGEA.

**Lecture**

- Première lecture à 24 h.
- Deuxième lecture à 48 h.
- Troisième lecture à 72 h

Les colonies des FMAT se présentent sous forme lenticulaire en masse (**Guiraud, 1998**).

**Expression des résultats**

L'exploitation des résultats se fait on prend en compte les boîtes contenant entre 30 et 300 colonies et on calcule le nombre de microorganismes rapporté au millilitre de margine à l'aide de la formule suivante :

$$UFC/ml = \frac{c}{V \cdot d}$$

- **C**: Nombre de colonies comptées par boîte.
- **V** : Volume de l'inoculum.
- **d** : Facteur de dilution à partir duquel les premiers comptages ont été obtenus (**Guiraud, 2003**).

Cette loi est appliquée aussi pour le dénombrement des coliformes totaux et fécaux, les bactéries lactiques, les staphylocoques, les salmonelles, les levures et les moisissures.

#### II.2.2.2. Les coliformes fécaux et totaux

##### II.2.2.2. 1. Les coliformes totaux

###### Principe

Les coliformes totaux se trouvent dans l'intestin des êtres humains et animaux à sang chaud (**Bugnicourt, 1995**). Ils peuvent causer des intoxications alimentaires, ce sont des marqueurs de qualité hygiéniques (**Guiraud, 2003**). Les coliformes totaux sont des bacilles à Gram négatifs, aérobies ou anaérobies facultatifs, non sporulés, ne possèdent pas d'oxydase, capables de se multiplier en présence de sels biliaires et capables de fermenter le lactose avec production d'acide et de gaz en 24 à 48 h à une température comprise entre 36 et 37 °C (**Bourgoie, 1996**).

##### II.2.2.2. 2. Les coliformes fécaux

###### Principe

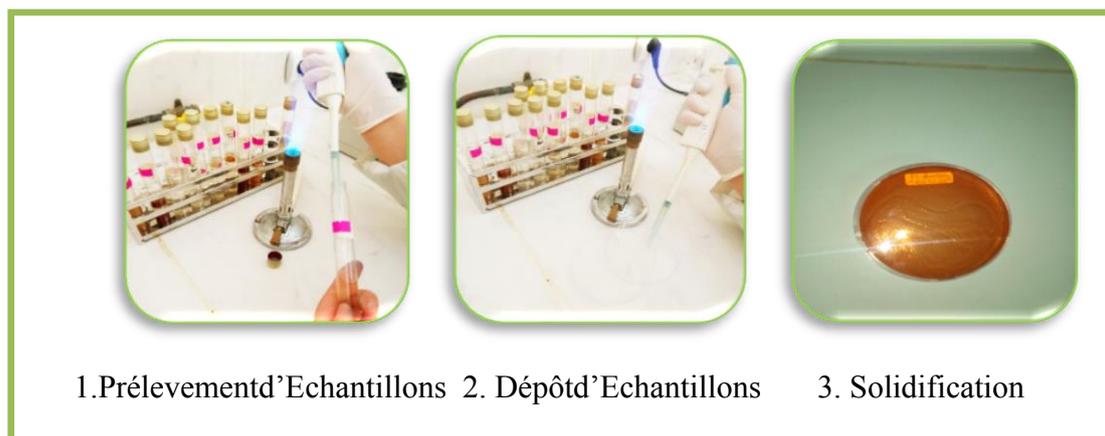
Les coliformes fécaux ont les mêmes caractères des coliformes totaux, mais ils sont capables de fermenter le lactose avec production d'acide et de gaz en 24 h à une température de l'ordre de 44 °C (**Bourgoie, 1996**).

###### Mode opératoire

La colimétrie ou le dénombrement des coliformes, peut être réalisé soit en milieu liquide soit en milieu solide (**Jean-Louis 2007**).

Le dénombrement des coliformes est effectué sur milieu Désoxycholate–citrate-lactose (DCL), à l'aide d'une micropipette on introduit (1ml) de la dilution  $10^{-1}$  jusqu'à  $10^{-4}$  des marges dans des boîtes de pétri vide préparées à cet usage et numérotées. On verse 15 ml la gélose DCL maintenue en surfusion refroidi à 45 C. Puis on effectue des mouvements circulaires et de va-et-vient en forme de (8) pour bien mélanger la gélose à l'inoculum et laisser solidifier sur la paillasse (**Fig.20**). Cette opération doit être effectuée en double pour chaque dilution car :

- La première série de boîtes sera réservée à la recherche des coliformes totaux incubés à 37°C.
- La deuxième série de boîtes sera réservée à la recherche des coliformes fécaux incubés à 44 °C (**NM 08.0.124**).



**Figure 20 :** Etapes de la recherche et de dénombrement des coliformes totaux et fécaux sur milieu DCL.

### Lecture

Les colonies des coliformes totaux et fécaux apparaissent en masse sous forme de petites colonies rondes à contour régulier d'une couleur rouge foncé avec un diamètre supérieur à 0,5 mm (NM 08.0.124).

### II.2.2.2. 3. Les Streptocoques

#### Principe

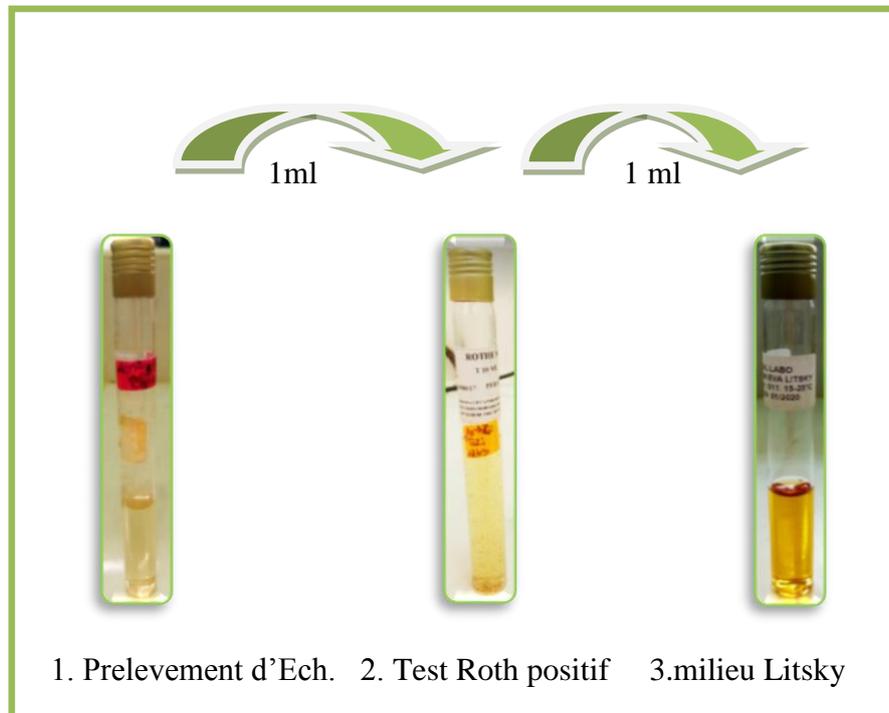
Les streptocoques fécaux sont des cocci Gram positifs, formant des chaînettes en milieu de culture liquide, catalase négative, capables d'hydrolyser l'esculine et de se cultiver à 44°C. Ce sont des hôtes normaux de l'intestin de l'homme et des animaux à sang chaud. Leur recherche est associée à celle des coliformes fécaux, elle constitue un bon indice d'une contamination d'origine fécale ancienne (ISO 29/07/2015).

#### Mode opératoire

La recherche des streptocoques fécaux se fait sur milieu liquide en deux tests consécutivement à savoir :

- ❖ **Le test présomptif :** A l'aide d'une micropipette 1ml de chaque dilutions décimales est introduit dans les tubes contenant le milieu Rothe S/C (deux tubes par dilution pour chaque région) en commençant par la dilution  $10^{-1}$  jusqu'à  $10^{-4}$ , l'inoculum est bien mélangé dans le milieu puis incubés à 37°C, pendant 24h (Fig.22) (Jean-Louis, 2007).

- ❖ **Le test confirmatif** : 1ml de chaque tube de Rothe positif est prélevé à l'aide d'une micropipette et introduit dans les tubes contenant 10ml de milieu Eva Lytski. Et incubés à 37°C, pendant 24h après une bonne homogénéisation (**Fig.21**) (**Jean-Louis, 2007**).



**Figure 22** : Les étapes de la recherche des streptocoques fécaux dans le milieu Litsky.

### Lecture

Sont considérés comme positifs les tubes d'Eva présentant à la fois : un trouble microbien et une pastille blanchâtre ou violette au fond du tube. Le dénombrement s'effectue selon les prescriptions de la table de MAC GRADY en tenant compte des tubes Litsky positifs (**Jean-Louis, 2007**).

#### II.2.2.2.4. Staphylocoques

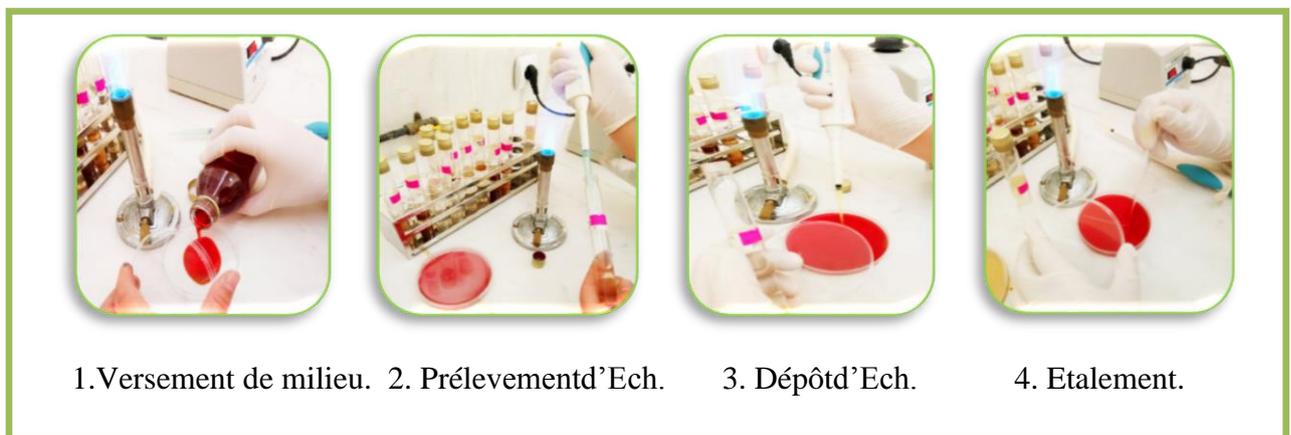
##### Principe

Les *Staphylococcus aureus* appartiennent à la famille de *Micrococcaceae*. Ce sont des Cocci à Gram positif, non sporulés, aéro-anaérobies facultatifs, immobiles, halophiles, se divisent en plusieurs plans en formant des amas irréguliers, coagulase, protéase et catalase positive. Elles sont des bactéries ubiquitaire, essentiellement saprophytes de l'homme et l'animale. Certaines espèces sont pathogènes : *Staphylococcus aureus* est la plus virulente (**Bourgeois, 1996**). Les staphylocoques sont dénombrés sur le milieu Baird Parker ou Chapman après incubation à 37°C

pendant 24h, leur dénombrement est obligatoire pour s'assurer de l'innocuité de nos échantillons (Labres, 2002).

### Mode opératoire

- **Etape d'enrichissement** : Consiste à prélevée 1 ml de chaque solution mère des margines dans des tubes de 10 ml de bouillon Giolitti Cantoni, après homogénéisation les tubes sont incubée à 37°C pendant 24h.
- **Etape d'isolement** : A l'aide d'une micropipette, une boite de Pétri contenant le milieu Chapman est ensemencée par (0,1ml) de bouillon Giolitti Cantoni positif des margines, par l'intermédiaire d'un râteau la goutte est étalée sur toute la surface des boites, La croissance des staphylocoques sur ce milieu Chapman solide se fait à 35°C ou 37°C pendant 48heures (Fig.22) (Labres, 2002). Nous avons ensemence deux boites pour seulement les solutions mères.



**Figure 22** : Etapes de la recherche des staphylocoques sur milieu Chapman.

### Incubation.

La croissance des staphylocoques sur milieu solide Chapman se fait à 35°C ou 37°C pendant 48heures. (ISO 6888, 2009).

### Lecture

Après incubation, *Staphylococcus aureus* se manifeste sur le milieu Chapman sous forme des colonies de 1 à 2 mm de diamètre, bombées, luisantes constituées de cocci à Gram (+) en amas. Sur ce milieu, *Staphylocoques* provoque une acidification du mannitol produisant parfois un pigment jaune (virage au jaune) (Avril, 1992). Les résultats positifs obtenus sur milieu Chapman, après incubation, pourrait être confirmé par un test à la catalase qui doit être positif (Rodier, 1996).

### II.2.2.2.5. Les Salmonelles

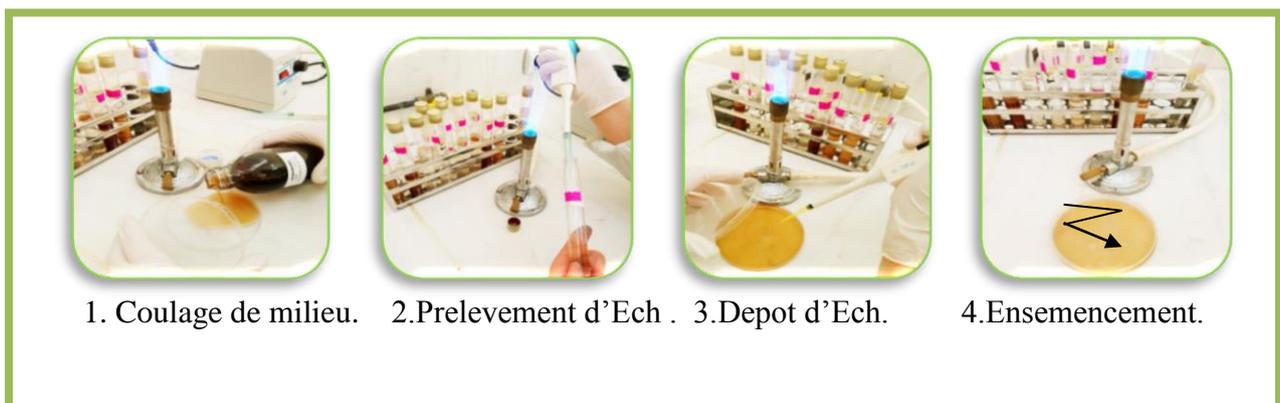
#### Principe

Les Salmonelles appartiennent à la famille des *Enterobacteriaceae* et sont bacilles à Gram négatif, anaérobies facultatifs, habituellement mobiles grâce à une ciliature péritriche, sauf *Salmonella gallinarum* toujours immobiles. Elles possèdent une catalase, réduisent les nitrates en nitrites, fermentent le glucose avec production d'acide et de gaz. Leur recherche est effectuée sur milieu S-S ou Hektoen (**Bourgeois, 1996**).

#### Mode opératoire

La recherche de Salmonelles nécessite une prise d'essai à part en 3 étapes, Seule les solutions mères sont utilisées pour les trois régions :

- **Etape de pré-enrichissement :** 1ml de la solution mère est ensemencé dans des tubes contenant 10 ml de l'eau peptone exempte d'indole. Après homogénéisation, les tubes sont incubés à l'étuve à 37 °C pendant 24h (**Guiraud, 1998**).
- **Etape d'enrichissement :** 1ml de chaque tube pré-enrichi sert à ensemencer 9ml du milieu d'enrichissement SFB (bouillon Sélénite - Cystéine). Les tubes sont homogénéisés puis incubés à 37 °C pendant 24h (**Guiraud, 1998**).
- **Etape d'isolement :** Les tubes positifs qui ont des troubles servent à l'isolement par la technique de stries d'épuisement après l'introduction d'une goutte (0,1ml) de culture d'enrichissement sur les boîtes contenues le milieu Hektoen, par la suite ces derniers sont incubés à 37°C pendant 20 à 24h (**Fig. 23**) (**Delarras, 2014**).



**Figure 23:** Différentes étapes de la recherche des Salmonelles sur milieu Hektöen.

**Lecture :** Les Salmonelles se présentent sous forme des colonies bleues vertes au centre noires sur gélose Hektoen (Guiraud, 1998).

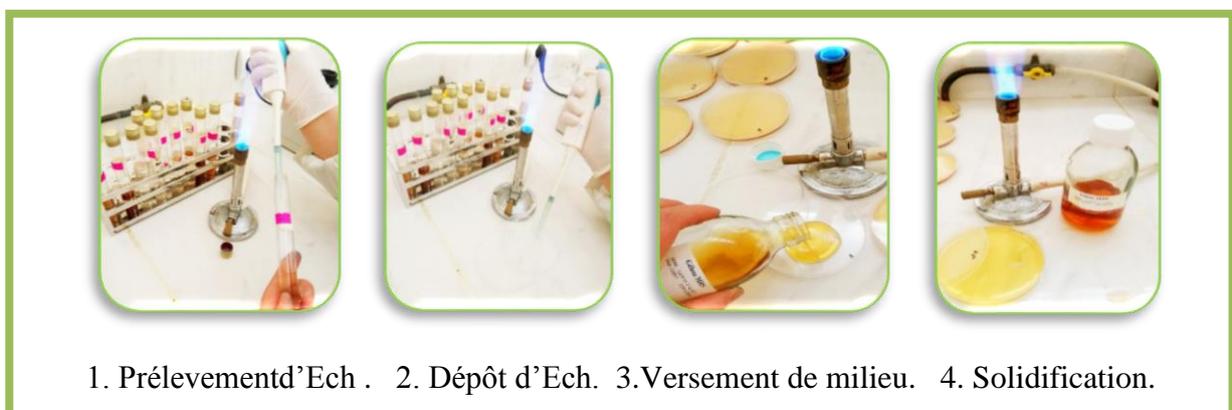
### II.2.2.2. 6.Les bactéries lactiques mésophiles

#### Principe

Les bactéries lactiques mésophiles sont des bacilles et des coques, qui peuvent former des chaînes de différentes longueurs, mais qui ne forment jamais de spores, elles sont des anaérobies facultatifs généralement immobiles, acido-tolérantes ni catalase, ni nitrate réductase, ni cytochrome oxydas (à l'exception de quelques souches sous certaines conditions) (Zhang et Cai, 2014). Elles sont protéolytiques La plupart d'entre elles sont tuées lorsqu'on les chauffe à 70°C. Elles préfèrent le lactose comme source de carbone et fermentent le lactose en acide lactique. La fermentation peut être pure ou impure ces bactéries ont besoin de composés organiques de l'azote pour leur croissance (Guiraud, 2003).

#### Mode opératoire

L'isolement des bactéries lactiques est effectué sur milieu de MRS. Il consiste à introduire à l'aide d'une micropipette (1ml) de la dilution  $10^{-1}$  jusqu'à  $10^{-4}$  des marges dans des boîtes de Pétri vides préparées à cet usage et numérotées. Par la suite 15 ml la gélose MRS maintenue en surfusion refroidi à 45 C est versée sur les boîtes. Pour bien mélanger la gélose à l'inoculum on effectue des mouvements circulaires et de va-et-vient en forme de (8) et laissés solidifier sur la paillasse. Une fois la solidification est terminée on verse une deuxième couche de milieu MRS sur les boîtes qui sont déposées dans une jarre pour assurer les conditions d'anaérobiose. L'incubation des boîtes est effectuée à 30°C pendant 48h (Fig.24) (NM ISO 15214-2007).



**Figure 24 :** Différentes étapes de recherche et de dénombrement des bactéries lactiques sur milieu MRS.

**Lecture**

Seules les colonies rondes ou lenticulaires sont dénombrées (NM ISO 15214-2007).

**II.2.2.2. 7. Les Levures et moisissures****Principe**

Ces microorganismes sont souvent isolés et dénombrés sur des milieux acidifiés. Le pH bas de ces milieux n'inhibe pas toutes les bactéries mais il peut même inhiber certaines levures et moisissures, certains milieux contiennent des antibiotiques ou autres agents antibactériens (Jean-Louis, 2007). Les moisissures sont des champignons microscopiques filamenteux, de taille dix fois plus que les levures, il existe plusieurs genres de moisissures notamment les genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium* (Meyer et al., 2004).

**Mode opératoire**

Le dénombrement des champignons filamenteux mésophiles est effectué sur un milieu Gélose dextrose à la pomme de terre (PDA) (préparation vers l'annexe 02), auquel a été ajouté Augmentin (0,5 g/litre). Ainsi que l'évaluation de l'abondance des levures se fait sur milieu Sabouraud auquel est ajouté le même antibiotique afin d'inhiber toute croissance bactérienne Après régénération de milieu ramené à 50° C en raison de 100ml Le coulage doit être vite pour éviter toute contamination (Fig. 25). À partir des dilutions décimales retenues ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  et  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ), à l'aide d'une micropipette on transfère aseptiquement 0,1 ml de chaque dilution aux boîtes de Pétri contenant le milieu PDA préalablement fondu et solidifié puis on étale la goutte uniformément sur toute la surface du milieu à l'aide d'un râteau stérile par un mouvement de balayage et de rotation sur l'ensemble de la surface de la gélose. Enfin sur les boîtes ensemencées on indique le numéro de l'échantillon, la dilution ainsi que la date d'ensemencement et sont incubés à 25°C pendant 4 à 5 jours pour les moisissures et pendant 48 à 72 heures pour les levures (Botton et al., 1990).



**Figure 25 :** Différentes étapes de la recherche et de dénombrement des levures et moisissures sur milieu PDA.

**Lecture**

- ❖ **Les colonies des levures** : sont brillantes, rondes et bondées, de couleurs différentes, de formes convexes ou plates et souvent opaques.
- ❖ **Les colonies de moisissures** : sont épaisses, filamenteuses, pigmentées ou non, à aspect velouté et sont plus grandes (**Guiraud et Gazli, 1980**).

Le dénombrement consiste à compter toutes les colonies ayant poussé sur les boîtes en tenant compte seulement les boîtes contenant entre 15 et 150 colonies.

**II.2.2.2. 7.1.Repiquage****Principe**

Cette opération a pour but de faciliter l'identification des champignons après un bon développement des colonies. Pour avoir une colonie pure, on effectue plusieurs repiquages dans des boîtes de Pétri contenant un milieu de culture (PDA). Quelques soient les précautions prises on n'obtient une culture pure qu'après plusieurs repiquages (**Rapilly, 1968**).

**Mode opératoire**

Il se fait en prélevant un fragment de colonie ou d'un hyphes terminal d'une moisissure à l'aide d'une anse de platine stérilisée tout en évitant son contact avec les autres colonies avoisinantes de la même boîte, ce fragment est déposé au centre d'une nouvelle boîte contenant un milieu de culture neuf sur laquelle on indique la date de repiquage et les coordonnées de la boîte de prélèvement. Le repiquage se fait aseptiquement près de bec Bunsen (**Fig.26**) (**Bourgeois et Leveau, 1980**). Les boîtes sont incubées à 25 °C jusqu'à un développement suffisant de la souche pour qu'elle soit prélevée et faire l'objet de plusieurs repiquages permettant l'obtention d'une culture pure représentant une seule souche (**Rapilly, 1968**).



**Figure 26** : Différentes étapes de purification des moisissures isolées dans les marges sur milieu PDA.

### II.2.2.2. 7.2. Conservation sur gélose inclinée

#### Principe

C'est une méthode utilisée dans les laboratoires pour conserver les cultures des différentes souches des moisissures, elle consiste à repiquer ces dernières dans des tubes à essai inclinés contenant le milieu PDA, dont ils sont stockés après incubation à 4° C pour favoriser leur viabilité et limiter les possibilités de variations (**Botton et al., 1990**).

#### Mode opératoire

A l'aide d'une anse de platine bien stérile on prélève à partir d'une boîte de Pétri contenant des colonies pures destinées à la conservation un fragment mycélien. Les colonies pures prélevées sont repiquées par des stries d'épuisement parallèles dans des tubes contenant le milieu PDA incliné d'une manière à avoir des colonies abondantes (**Fig.27**). Après 7 jours d'incubation à 28°C, les tubes de collection sont conservés à 4°C en évitant le plus possible tout risque de contamination (**Botton et al., 1990**).



**Figure 28:** Les étapes de conservation des souches de moisissures isolées des margines sur milieu PDA.

### II.2.2.2. 7.3. Identification des champignons filamenteux mésophiles

#### Principe

L'identification des moisissures mésophiles dépend d'une part, de l'examen macroscopique effectué sur un milieu PDA coulé en boîtes de Pétri dont l'aspect extérieur de la culture reste un indice très important pour prévoir le genre (**Bourgeois et Leveau, 1980**). Et de l'examen microscopique effectué sur une préparation à l'état frais, après coloration au bleu de méthylène. Il est à signaler que malgré la réunion de ces deux tests dans la présente étude, seul le genre a été

identifié, vu la complexité d'identifier l'espèce (**Barnett *et al.*, 1972**). L'identification est selon la méthode de la localisation externe (x100) avec l'utilisation de l'huile d'immersion pour bien visualiser le thalle. Il convient ensuite de se référer aux principaux ouvrages de systématique mycologique concernant les moisissures (les plus courantes et d'autres plus récentes). Les clés d'identification retenues sont celles de **Barnett *et al.*, (1972)** ; **Bourgeois et Leveau, (1980)** ; **Chabasse, (2002)** et **Botton *et al.*, (1990)**.

- **L'observation macroscopique**

L'identification se fait à l'œil nue et elle se base essentiellement sur les caractères suivant :

- La vitesse de croissance (rapide, moyenne et lente)
- La texture des colonies.
- La couleur des colonies.
- La couleur du revers de la culture.

### **L'observation microscopique**

Les observations sont effectuées au grossissement 100 à l'aide d'un microscope optique l'étude microscopique du mycélium est basée sur :

- L'absence ou présence de cloisons.
- Couleur des filaments mycéliens.
- Mode de ramification des cloisons.
- Différenciation des thallospores.
- Le mode de reproduction.

#### **II.2.2.2. 7.4. Identification des genres par la technique de Ruban adhésif**

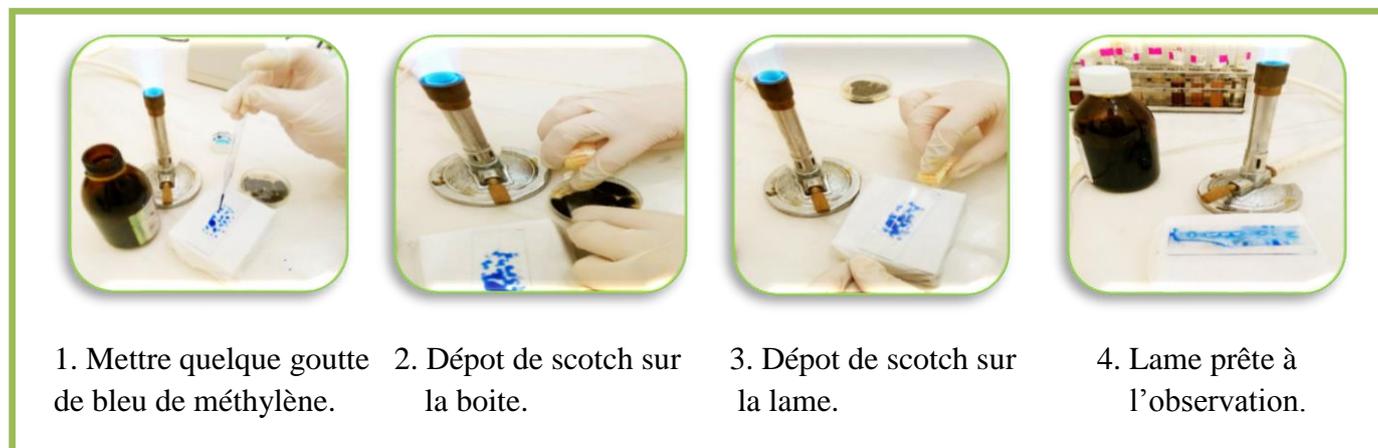
##### **Principe**

L'observation microscopique des moisissures nécessite une bonne visualisation à l'aide d'un colorant, le plus probable est le bleu de méthylène qui est utilisé comme liquide de montage éclaircissant en raison des avantages qu'il assure à l'opérateur; contrairement à l'eau physiologique et à l'alcool, le bleu de méthylène donne des résultats satisfaisants car il n'apporte aucune modification de forme ni de dimensions au champignon ainsi qu'il augmente le contraste et permette d'apparenter mieux le thalle mycélien (**Chabasse, 2002**).

##### **Mode opératoire**

Juste après l'observation macroscopique et afin de prélever des spores et des filaments mycéliens de la souche fongique à identifier, un morceau de papier adhésif (scotch) est mis sur la culture puis déposé sur une lame contenant une goutte de bleu méthylène. L'observation

microscopique permet la visualisation de la forme du mycélium et les spores caractéristique des champignons (**Fig.28**) (**Botton *et al.*, 1990 ; Chabasse, 2002**).



1. Mettre quelque goutte de bleu de méthylène.

2. Dépot de scotch sur la boîte.

3. Dépot de scotch sur la lame.

4. Lame prête à l'observation.

**Figure 28 :** Différentes étapes d'identification des moisissures mesophiles isolées des margines par la méthode de Ruben adhésif.

#### II.2.2.2. 7.5. La mise en évidence de l'activité lipolytique de certaines souches

##### Principe

Le catabolisme des Substrats Hydrophobes (SH), tels que les alcanes, les acides gras et les triglycérides, est un métabolisme assez complexe, qui implique plusieurs voies métaboliques et qui ait lieu dans différents compartiments cellulaires (**Fickers *et al.*, 2005**). Les moisissures sont connues par la synthèse des lipases extracellulaires et ainsi d'être capables de métaboliser les lipides présents dans l'environnement (**Downes et Ito, 2001**).

##### Mode opératoire

La production des lipases a été déterminée sur un milieu de culture contenant du Tween 20 (polyoxy-éthylène-sorbitan-monolaurate) comme un substrat lipidique (**Annexe 02**) (**Abe *et al.*, 2015**). Le Tween 20 a été autoclavé séparément et ajouté au milieu stérile avant de le couler dans les boîtes. A l'aide d'un embout stérile on prend un disque de souche. Après 2 à 5 jours d'incubation à 28 °C (**Fig. 29**) (**Hankin et Anagnostakis, 1975**).

La mesure des diamètres des zones de lipolyses est fait selon la formule suivant  $D-d$  dont  $D$  est le diamètre du halo total hydrolysé y compris le diamètre du disque et le  $d$  c'est le diamètre du disque (**Griebeler *et al.*, 2009 ; Hasan *et al.*, 2009**). Les souches exhibant les diamètres les plus élevés ( $D-d$ ) sont sélectionnées en tant que potentiellement productrices de lipases (fausses lipases).



**Figure 29:** Différentes étapes de test d'activité lipolytique des moisissures isolés des margines sur milieu Tween 20.

### Lecture

Appariation des zones hydrolyses sous forme de précipitation (**Griebeler *et al.*, 2009**).

### III.1. Résultats et discussion

#### III.1.1. Les caractéristiques physico-chimiques

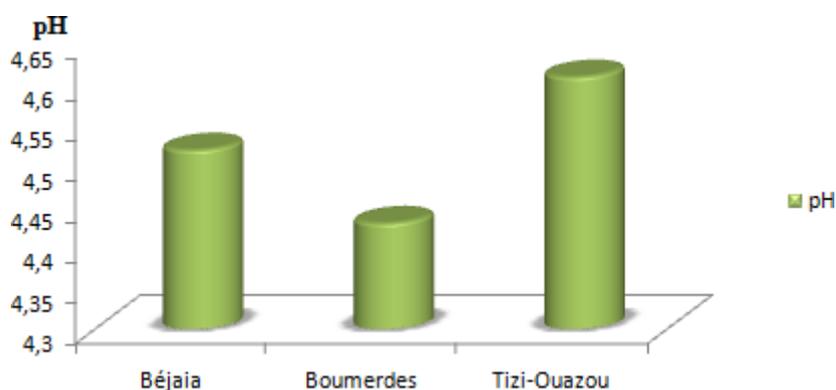
Les margines de cette étude sont constitués des eaux utilisées au cours du processus de trituration et les eaux de végétation d'olives. Elles ont une couleur brune-noire et une odeur de l'huile d'olive. Les résultats des caractéristiques physico-chimiques des margines collectées dans les différentes régions étudiées sont donnés dans le tableau suivant (**Tab.06**).

**Tableau 06** : Résultat de la composition physico-chimique des margines des trois régions.

Paramètres	Unités	Bejaia	Boumerdès	Tizi
<b>pH</b>	-	4,52	4,43	4,61
<b>Conductivité</b>	um.cm <sup>-1</sup>	19	21	18
<b>Salinité</b>	m. cm <sup>-1</sup>	13	15	14
<b>MES</b>	g.l <sup>-1</sup>	23,41	25,85	27
<b>MMS</b>	g.l <sup>-1</sup>	12,27	10,57	13,42
<b>MMV</b>	g.l <sup>-1</sup>	11,14	15,28	13,58
<b>DCO</b>	g.l <sup>-1</sup>	2,86	1,45	3,37
<b>DBO<sub>5</sub></b>	g.l <sup>-1</sup>	3,82. 10 <sup>-2</sup>	4,3. 10 <sup>-2</sup>	6,58. 10 <sup>-2</sup>
<b>Ib</b>	-	74,86	33,72	51,21
<b>MOx</b>	g.l <sup>-1</sup>	9,74.10 <sup>-1</sup>	12,5. 10 <sup>-1</sup>	5,11.10 <sup>-1</sup>

##### III.1.1.1. Le pH

Les valeurs de pH sont mesurées à l'aide d'un pH-mètre à affichage numérique. Les résultats de nos échantillons sont présentés sous forme de l'histogramme suivant :



**Figure 30** : Résultats de pH des margines de 3 régions.

L'analyse des caractéristiques physico-chimiques des margines dans les différentes régions étudiées a montré que dans la plupart du temps, et selon la littérature, l'acidité des margines est une

Caractéristique commune de cet effluent liquide (Eroglu *et al.*, 2008 ; Achak *et al.*, 2009 ; Blika *et al.*, 2009 ; Martinez-Garcia *et al.*, 2009 ; Garcia Castello *et al.*, 2010 ; Gonçalve *et al.*, 2010 ; Lakhtar *et al.*, 2010 ; Mechriet *et al.*, 2011 ; Di Bene *et al.*, 2012 ; Mahmoud *et al.*, 2012 ; Lykas *et al.*, 2014).

Ceci est confirmé par les résultats obtenus au cours de notre étude (Tab 06) présentés comme suit (Bejaïa : 4,52 ; Boumerdes : 4,43 et Tizi-Ouzou : 4,61). La valeur enregistrée dans notre étude se trouve dans la limite inférieure de la fourchette citée dans la littérature (4,5 à 6).

La variation dépend des facteurs mentionnés ci-dessus ainsi que de la présence des acides organiques (acides phénoliques, acides gras, ...) ce qui entrave l'épuration biologique de ces rejets liquides (Capasso *et al.*, 1992 ; Aggelis *et al.*, 2003 ; Fakharedine *et al.*, 2006 ; Achak *et al.*, 2009 ; Leulmi, 2011 ; Chaari *et al.*, 2015). Cependant l'acidité des margines augmente avec la durée de leur stockage dans les bassins de stockages. Ceci peut être expliqué par des réactions d'auto-oxydation et de polymérisation qui transforment les alcools phénoliques en acides phénoliques (Hamdi, 1991). Ces réactions se manifestent par un changement de la coloration initiale des margines vers une couleur noir très sombre (Assas *et al.*, 2002). En effet, nos margines de Bejaïa sont caractérisées par une coloration très foncée noir par rapport aux margines de Boumerdes et de Tizi-Ouzou qui se caractérisent par une coloration marron.

### III.1.1.2. La conductivité électrique et la salinité

Les valeurs de conductivité électrique mesurées à partir des margines issues de trois régions sont consignées dans l'histogramme suivant :

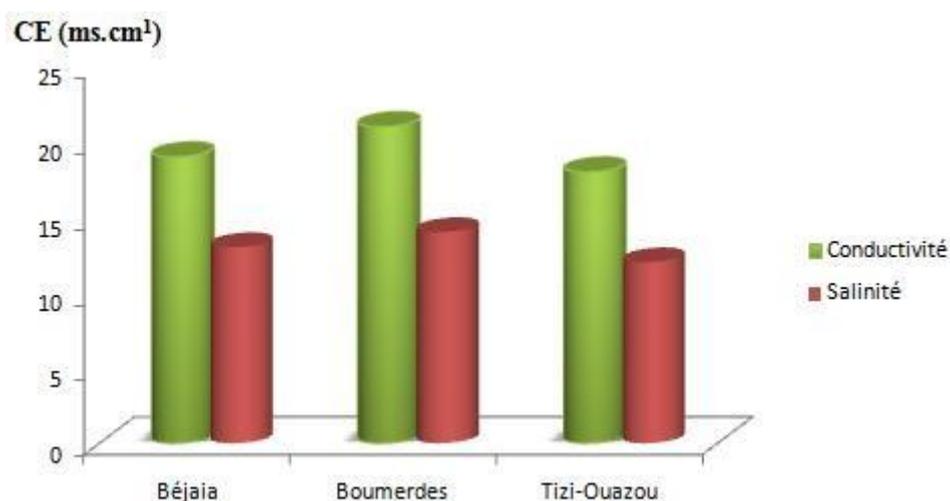


Figure 31 : Les valeurs de conductivité et de salinité des 3 régions exprimées en ms.cm<sup>-1</sup>.

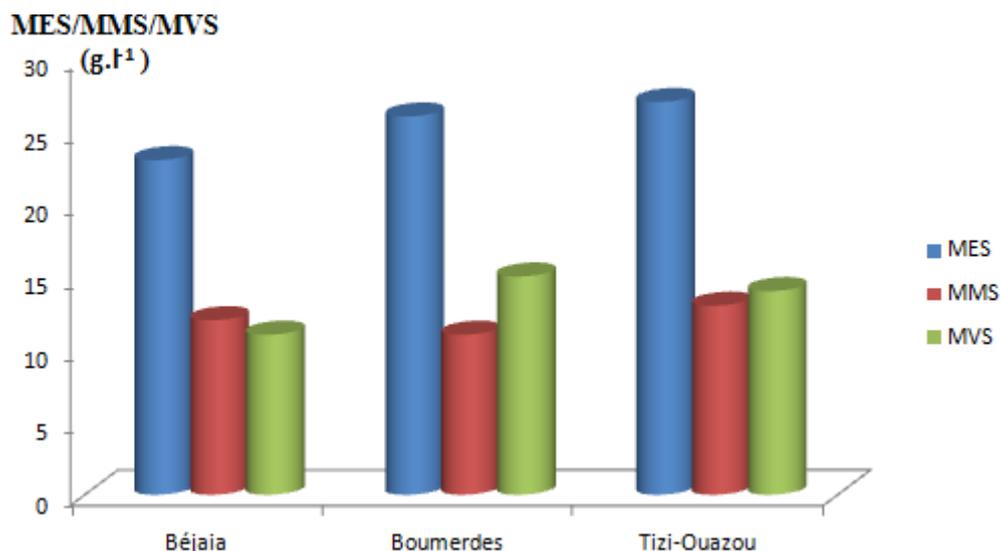
Dans le cas des margines, les valeurs de la conductivité varient entre 18 et 50  $\text{ms.cm}^{-1}$  (**Di Serio, 2008**). Les résultats obtenus au cours de notre étude (**Tab.06**) sont comparables à ceux trouvés dans la littérature dont nous avons trouvés respectivement pour les stations Bejaia et Boumerdès 19  $\text{ms.cm}^{-1}$  et 21  $\text{ms.cm}^{-1}$ , et une valeur de 18  $\text{ms.cm}^{-1}$  pour la station de Tizi-Ouzou dépassant de loin la limite admissible de rejet (7,00  $\text{ms/cm}$ ) décrite par **M'sadek et al., (2015)**. Et supérieure à celle trouvée par **Achak et al (2009)** (9,6  $\text{ms.cm}^{-1}$ ), **Esmail et al., (2014)** et **Bouajila et al., (2015)** (18, 70  $\text{ms.cm}^{-1}$ ) ainsi que **Zaier et al., (2017)** (12,4  $\text{ms.cm}^{-1}$ ). Il faut également signaler que les valeurs de la conductivité enregistrées dans cette étude sont largement supérieures à la valeur de conductivité d'un échantillon de margines provenant d'une huilerie de la région de Tizi-Ouzou, qui est de 5,4  $\text{ms/cm}$  (**Yahiaoui, 2012**). En revanche, ces valeurs restent très faibles par rapport à celles enregistrées par **Aissam (2003)**, où la conductivité atteint jusqu'à 36  $\text{ms/cm}$ .

**Salinité (S)** : Un taux élevé de salinité qui est de l'ordre de 13g/l, 15g/l et 14 g/l pour les trois stations Bejaia, Boumerdès et Tizi-Ouzou (**Tab.06**). Ces résultats sont nettement supérieures à celle trouvée par **M'Sadak et al (2015)** (8,74 g/l).

Elle est étroitement liée à la concentration des substances dissoutes et à leur nature (**Di Serio, 2008**). Cette mesure ne donne pas forcément une idée immédiate sur la charge minérale du milieu (**Paredes, 2005**). Elle donne une idée générale sur la teneur élevée en sel présents dans ces effluents, ceci est dû aux pratiques de salage pour la conservation des olives avant la trituration, en plus de la richesse naturelle des margines en sels minéraux dissous. Cette variation est probablement due au degré de maturation ou bien à la variété d'olives de chaque région (**Benyahia et Zein, 2003 ; Hanafi et al., 2009**). Mais cette salinité peut être réduite lors du compostage par lessivage suite aux arrosages fréquents pratiqués en vue de se rapprocher autant que possible de l'humidité optimale recherchée (50 à 60%) (**M'sadak et al., 2015**).

### III.1.1.3. La matière en suspension (MES), La matière minérale (MMS) et la matière volatile (MVS)

Les valeurs des teneurs en MES, MMS et MVS de trois échantillons de margines étudiées sont collectées sous forme d'histogramme suivant :



**Figure 32:** Les valeurs de MES, MMS et MVS des margines de 3 régions exprimées en g.l<sup>-1</sup>.

#### III.1.1.3.1. La matière en suspension (MES)

D'après les résultats obtenus, les valeurs de MES (**Tab. IV. Annexe 03**) sont, respectivement (23,41g/l) pour la station de Bejaïa, (25,85g/l), pour Boumerdes et (27) g/l pour Tizi-Ouzou (**Tab.06**). Ces valeurs dépassent ceux obtenus par **Al-Malah et al., (2000)** ; **Assas et al., (2002)** ; **Hanafi et al.,(2009)** (213mg/l) , **Fatiha (2009)** ; **Esmail et al., (2014)** (0,61 g/l) et **Zaier et al., (2017)**.

Les margines étudiées sont chargées en matières en suspensions, les valeurs obtenues ne sont pas conformes aux normes (**Tab.06**) (1 à 9 g/L). Ils sont expliqués par l'origine de l'échantillonnage des margines, en effet, ces derniers sont prélevés depuis des bassins de stockage ce qui provoque un abaissement de MES sous l'effet de la décantation, la valeur moyenne enregistrée au cours de notre étude est élevée. Ceci est probablement dû à l'effet du vent et/ou de l'agitation provoquée au moment du déchargement des margines (**Aissam, 2003**).

#### III.1.1.3.2. La matière minérale en suspension (MMS)

Les teneurs moyennes des margines en matière minérale en suspension sont de l'ordre de 12,27g.l<sup>-1</sup>, 10,57g.l<sup>-1</sup> et 13,42 g.l<sup>-1</sup>respectivement pour Bejaïa, Boumerdes et Tizi-Ouzou (**Tab .07**). Ces valeurs sont inférieures à celles trouvées par **Aggoun, (2016)** (15 g/l), et semblable à celle trouvées par plusieurs auteurs variaient entre 0,8 et 3,4 g/100g avec une moyenne de  $1,6 \pm 1,4$ g/100g des margines brutes (**Belaid et al., 2006** ; **Fakharedine et al., 2006** ; **El Hajjouji et al., 2007** ; **Achak et al., 2009** ; **Mekki et al., 2009** ; **Mahmoud et al., 2010** ; **El Abbassi et al., 2012b** ; **Mahmoud et al., 2012** ; **Abichou et al., 2013**), ce qui nous a permis de constater que les teneurs en MMS de nos échantillons de margines sont conformes avec celles de la littérature (4-42 g/l) (**COI, 2008**).

Il apparaît clairement que les margines algériennes renferment des teneurs en matière minérale (**Tab.06**) variable et faible, ce taux reste considérable comparativement à ceux détectés pour des margines de la Turquie (**Azbar et al., 2008**). Cependant, **Hachicha et al., (2008)** indiquent un taux relativement élevé (21,42%) par rapport à nos margines et à ceux notées par la littérature (**Aissam, 2003**). Cette différence notée peut être expliquée par le degré de maturation et la variété des olives. Cette dernière est rarement mentionnée dans littérature. De plus, la méthode d'extraction de l'huile d'olive semble être un facteur influençant la teneur en matière minérale des margines (**Aissam, 2003**).

Des facteurs tels que le changement de la zone géographique, les méthodes de la récolte et la saison contribuent à faire varier fortement la concentration des éléments minéraux des margines (**Spear, 1994 ; Le Houerou, 1980**).

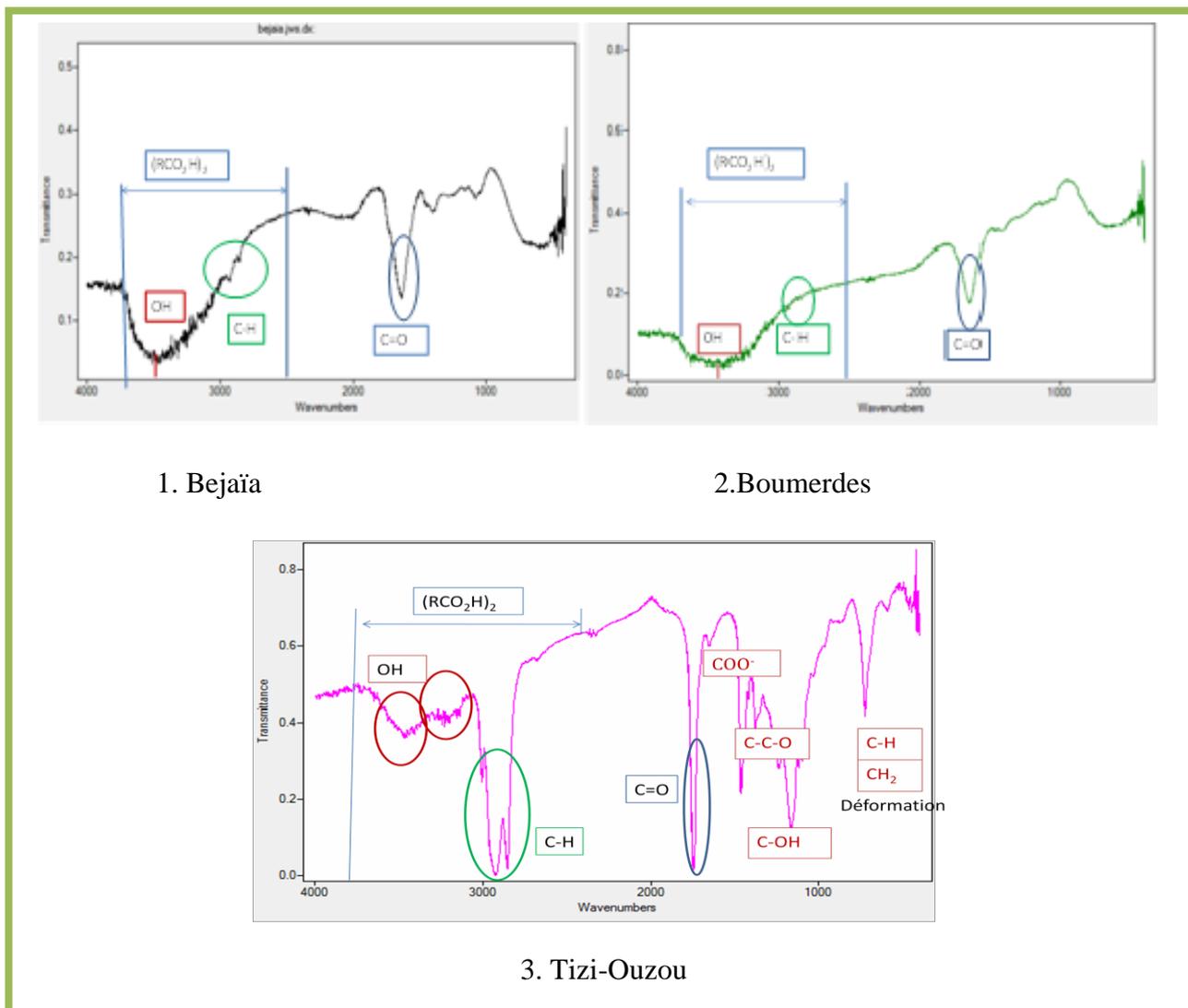
#### III.1.1.3. 3. La matière volatile en suspension (MVS)

Les valeurs de la matière volatile en suspension (**Tab. IV. Annexe 03**) sont  $11,14\text{g.l}^{-1}$ ,  $15,28\text{g.l}^{-1}$  et  $13,85\text{g.l}^{-1}$  respectivement pour les trois régions Bejaïa, Boumerdes et Tizi-Ouzou (**Tab .06**). Ces valeurs sont supérieures légèrement à celle trouvées par **Iboukhoulef, (2014)** (9, 179 g/l) et nettement inférieure à celle trouvée par **Zaïer et al., (2017)** (79,4 g/l).

La variation des valeurs de MVS (**Tab.06**) est due probablement aux conditions climatiques et géologiques particulièrement, la température et la pluviométrie. Ainsi que le stade végétatif au moment de la récolte, le stade de maturation de l'olive et les procédés d'extraction d'huile (**Topps, 1992 ; Kebbab, 2014**).

#### III.1.1.4. La spectroscopie infra-rouge MIR-FTIR

Les différents spectres d'infrarouge des 3 échantillons des margines étudiées sont représentées dans les graphes suivants :



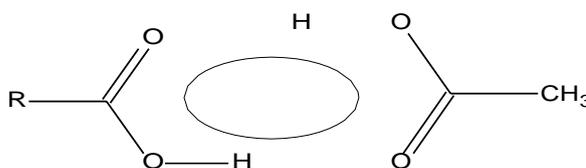
**Figure 33** : Le spectre infrarouge des trois échantillons des margines brutes.

D’après les spectres d’infra-rouge de chaque échantillon (**Fig.33**), nous observons que les spectres sont caractérisés par des bandes d'absorption communes. Malgré la similitude du modèle général, certaines différences dans les intensités relatives de l'absorbance spectrale ont été observées entre les différents échantillons des margines. Ils sont étaient presque semblables pour les échantillons de Bedjaia et Boumerdes par une inspection visuelle. Cependant le spectre de la région de Tizii-ouazou montre une grande différence des fonctions par rapport aux deux autres régions.

### ➤ Spectre Bejaia et Boumerdes

La superposition des spectres infrarouges, notamment la partie empreinte (De  $400\text{ cm}^{-1}$  à  $1300\text{ cm}^{-1}$ ) est confuse pour le spectre de Bejaia et celui de Boumerdes, dénote une parenté des produits en termes de composition chimique moyennant des différences de concentration des produits trop élevée. On peut affirmer que les composés ont une formulation équivalente.

L'examen de spectre MIR fait apparaître : clairement une bande large et intense qui caractérise les composés phénoliques contenant dans les margines. La nature de ce produit, nous invite sans trop de risque à prédire la présence de dimères acides organiques (**Fig. 34**).



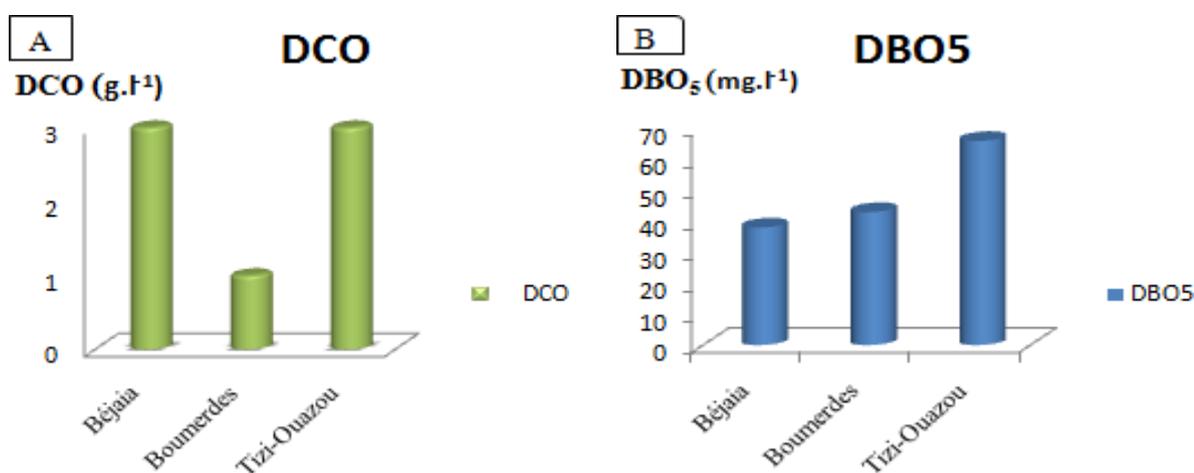
**Figure 34** : Formule chimique de d dimères acides organiques

### ➤ Spectre de Tizi -Ouzou

L'analyse par spectroscopie Infrarouge de ce type de produit complexe de part sa constitution repose en grande partie sur la littérature. En effet, dans des produits résidus dans la production de l'huile d'olive, on marque la présence des vibrations d'élongation de liaisons hydroxyles des produits hydroxylés (phénols) et pourrait être également attribuée à la présence de l'eau résiduelle. Ainsi des vibrations d'élongation des liaisons C-H (**Zeng et al., 2012**). Des groupe carboxyle qui confirme ainsi la présence de fonctions  $\text{COO}^-$  (**Huang et al., 2010**). Ces vibrations d'élongation ont été également attribuée par **Piyathida et al., (2014)** à la présence de protéines. On a marqué d'autre vibrations d'élongation correspondent aux groupes latéraux C-OH et aux liaisons C-O-C (**XU et al., 2012**). On a signalé la vibration de déformation des groupes phénoliques OH (**Adapa et al., 2009**) confirmant de ce fait la présence de composés phénoliques au sein de cette fraction. Par ailleurs on marqué la présence de liaisons C-C-O dans la structure qui selon **Zeng et al., (2011)** résulte des vibrations d'élongation de la liaison C-O. La bande à  $813\text{ cm}^{-1}$  selon **Mohana et al., (2014)** est attribuée également aux vibrations de déformation de liaisons  $-\text{CH}$ . On a signalé aussi des vibrations des groupements  $\text{CH}_2$  de la cellulose comme décrit par **Mohana Srinivasan et al., (2014)**.

### III.1.1.5. Les DBO<sub>5</sub> et DCO

Les margines sont très riches en matières organiques exprimés en terme de DBO<sub>5</sub> et DCO. D'après le **tableau 06**, les valeurs obtenues pour la station de Bejaia sont de l'ordre de 2,86 g/l (DCO) et  $3,82 \cdot 10^{-2}$  g/l (DBO<sub>5</sub>), pour la station Boumerdes nous avons trouvés 1,45 g/l (DCO) et  $4,3 \cdot 10^{-2}$  g/l (DBO<sub>5</sub>) et pour la station Tizi-Ouzou une valeur de l'ordre de 3,37g/l (DCO) et  $6,58 \cdot 10^{-2}$  g/l (DBO<sub>5</sub>). Les valeurs obtenues sont nettement inférieures à ceux obtenus par **Fiestas Ros d'Ursinos (1992)**, **Al Mallah et al., (2000)**, **Ergüder et al., (2000)**, **Tsioulpas et al., (2002)**, **Yaakoubi et al., (2010)**, **Esmail et al., (2014)** et **Zaier et al., (2017)** qui sont de l'ordre de 78 g/l pour la DCO et 25 g/l pour la DBO<sub>5</sub>.



**Figure 34 :** A- Les valeurs de DCO des margines de 3 régions exprimées en g.l<sup>-1</sup>  
 B- Les valeurs de DBO<sub>5</sub> des margines de 3 régions exprimées en mg.l<sup>-1</sup>.

### III.1.1.6. Les matières Oxydables (MOx)

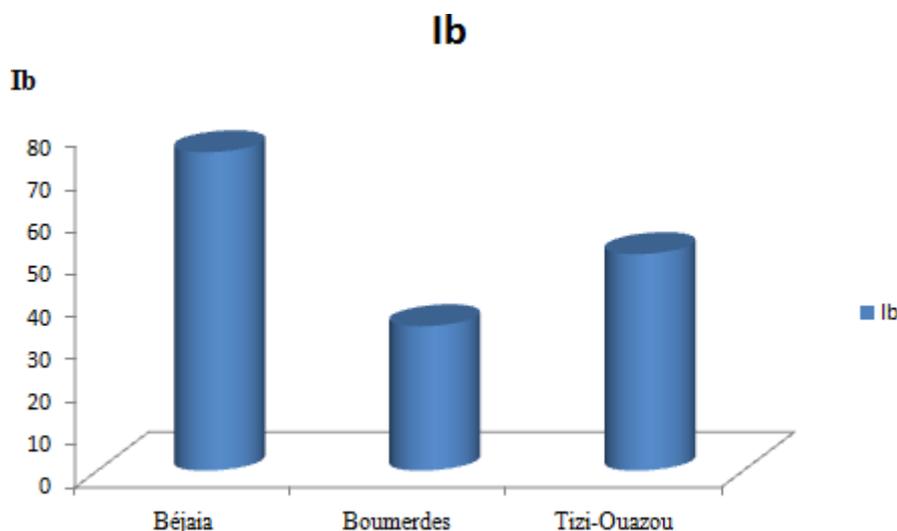
Les teneurs en matière oxydable des trois régions sont de l'ordre de  $9,74 \cdot 10^{-1}$  g/l,  $5,11 \cdot 10^{-1}$  g/l et 1,25 g/l respectivement pour Bejaïa, Boumerdes et Tizi-Ouzou (**Tab.06**). Ces résultats sont nettement inférieur à celle trouvé par **M'Sadak et al., (2015)** ( 43,2 g/l).

Les valeurs obtenues montrent que nos échantillons sont très chargés en matière organique mais restent inférieures aux résultats cités par la littérature, cela est du à la dégradation des margines au cours du temps dans les bassins de stockage, et avec le temps, la matière organique se dégrade. Ceci montre la forte demande en oxygène pour l'oxydation complète de la matière

organique contenue dans ces effluents qui reflète leurs pouvoirs polluant très important plus précisément, des pollutions d'origine organiques et l'asphyxie du milieu récepteur en cas de rejet direct (**Esmail et al., 2014**).

### III.1.1.7. L'indice de biodégradabilité (Ib)

Ces effluents ont un pouvoir polluant très important avec un ratio moyen Ib supérieur à 6 (**Tab.06**), révélant un substrat très difficilement biodégradable (**M'sadek et al., 2015**). Les résultats obtenus de notre étude sont respectivement de l'ordre de 74,86 (Bejaïa), 33,72 (Boumerdes) et 51,21 (Tizi-Ouzou). Ces valeurs sont largement supérieures à celle trouvés par **Zaier et al., (2017)** (Ib =3) et **M'Sadak et al., (2015)** (Ib < 3).



**Figure 36:** Les valeurs d'Ib des margines de 3 régions exprimées en mg.l<sup>-1</sup>.

L'indice de la biodégradabilité (Ib) exprimé par le rapport DCO/DBO<sub>5</sub> a une importance pour la définition de la chaîne d'épuration d'un effluent. Le rapport DCO/DBO<sub>5</sub> donne des indications intéressantes sur la biodégradabilité d'un effluent (**Demba et al., 2012**). Les résultats de ce rapport constituent une indication de l'importance des matières polluantes peu ou pas biodégradables. La valeur importante de ce rapport par rapport nous échantillons (> 6) indique qu'une grande partie de la matière organique n'est pas biodégradable. Ceci est dû à la présence de plusieurs substances inhibitrices de la croissance microbienne, tels que les composés phénoliques. Impliquant que ces rejets oléicoles sont très difficilement biodégradables. Dans ce cas, il est préférable d'envisager un traitement physico-chimique (**Metahri, 2012**).

### III.1.2. Paramètres microbiologique des margines

Jusqu'à présent, peu de travaux ont été réalisés sur la caractérisation microbiologique des margines. Ceci est probablement dû à l'intérêt accordé aux matières organiques des margines, sans se soucier de leur contenu microbien. C'est pour cela que nous avons jugé utile de faire une étude microbiologique des margines des trois régions : Bejaïa, Boumerdes et Tizi-Ouzou, le but de la présente étude 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 des paramètres polluants (polyphénols, DBO<sub>5</sub> et DCO) ainsi que l'étude de la biodiversité des moisissures dans les margines des 3 régions.

#### III.1.2.1. Résultat de la recherche et dénombrement des germes

Les résultats de dénombrement (**Tab. I, II, III. Annexe 03**) de quelques groupes microbiens des margines sont de quelques groupes microbiens des margines sont représentés dans le tableau suivant (**Tab. 07**).

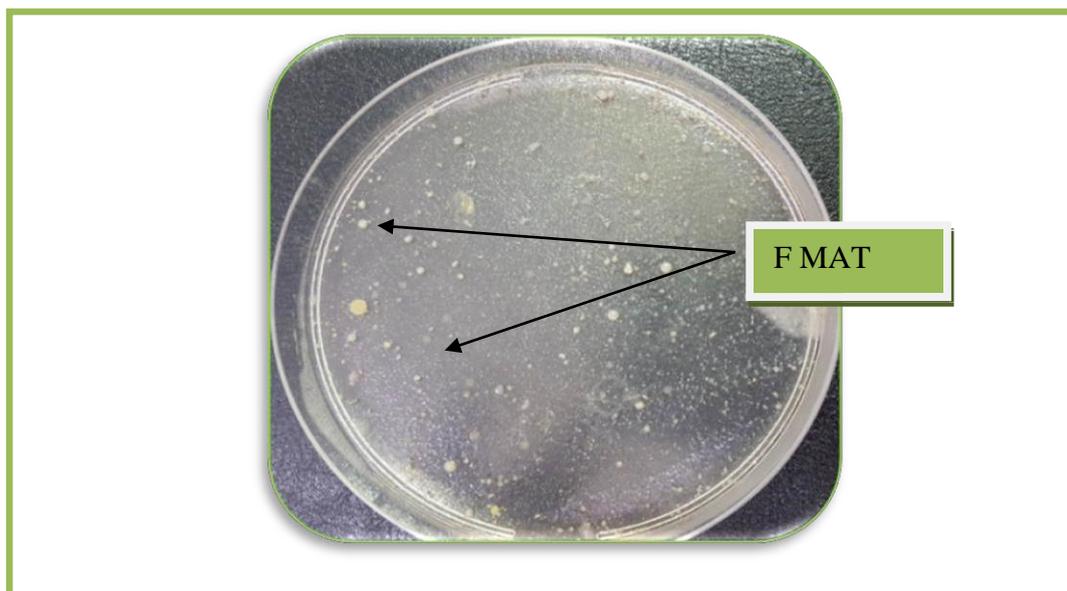
**Tableau07** : Dénombrement de la flore microbienne des margines.

Echantillons	Unité	Bejaïa	Tizi-Ouzou	Boumerdes
<b>La flore</b>				
<b>FMAT</b>	UFC/ml	1, 25. 10 <sup>5</sup>	1, 45. 10 <sup>5</sup>	3,8 10 <sup>5</sup>
<b>Coliformes totaux</b>	UFC/ml	0	0	0
<b>Coliformes fécaux</b>	UFC/ml	0	0	0
<b>Staphylocoques</b>	UFC/ml	0	0	0
<b>Streptocoques</b>	UFC/ml	0	0	0
<b>Salmonelles</b>	UFC/ml	0	0	0
<b>Bactéries lactiques</b>	UFC/ml	0	1, 87. 10 <sup>5</sup>	3,2. 10 <sup>4</sup>
<b>Levures</b>	UFC/ml	3. 10 <sup>3</sup>	5. 10 <sup>3</sup>	6. 10 <sup>4</sup>
<b>Moisissures</b>	UFC/ml	2. 10 <sup>2</sup>	3. 10 <sup>1</sup>	3. 10 <sup>3</sup>

#### III.1.2.1.1. Dénombrement de la flore totale aérobie mésophile (FMAT)

L'évolution de la flore aérobie mésophile totale des trois échantillons des margines (**Fig.36**) indique l'abondance de cette flore dans les trois régions. Cependant cette charge microbienne (**Tab. 07**) totale reste relativement faible par rapport à celle enregistrée dans les effluents d'abattoir (1,2310<sup>6</sup> UFC/ml) (**Aissam et al., 2001**). Et comparable à celle trouvée dans les effluents de différentes régions de la Tunisie : Sfax 3,16.10<sup>5</sup>UFC/ml, Zarzis 4,3.10<sup>5</sup>UFC/ml et Châal 3,81.10<sup>5</sup>

UFC/ml. Ainsi qu'elle est supérieure à ceux obtenus dans les effluents de différentes régions de Tunisie : Al Karib  $12.10^3$  UFC/ml, Téboursouk  $8.10^3$  UFC/ml (Zaier *et al.*, 2017), Ouazzane  $8,5.10^3$  UFC/ml, Fès boulomane  $2,87.10^2$  UFC/ml (Esmail *et al.*, 2014). Les valeurs obtenues sont supérieures à celles rapportées dans la littérature  $8,4.10^3$  UFC/ml (Aissam, 2003), pour les trois stations, et faible par rapport à celle enregistrée dans les effluents d'abattoir ( $1,23 \cdot 10^6$  UFC/ml) (Aissam, 2001).



**Figure 37:** Les résultats de dénombrement de la flore mésophile aérobie totale sur milieu TGEA.

La charge microbienne totale est évaluée par le dénombrement de la flore mésophile aérobie totale (FMAT). L'abondance de cette flore peut être liée essentiellement au procédé d'extraction, aux conditions opératoires adoptées de la région et également aux conditions de stockage des margines et aux caractéristiques physico-chimiques qui gênent la croissance des micro-organismes notamment, la présence des substances antimicrobiennes (pH, les composés phénoliques, les sels minéraux, les métaux lourds, tanins, les acides lactiques, les acides gras...) (Esmail *et al.*, 2014 ; Zaier *et al.*, 2017).

#### III.1.2.1.2. Dénombrement des coliformes totaux, Coliformes et streptocoques fécaux

Pour vérifier s'il y a une éventuelle contamination fécale par les germes fécaux, nous avons procédé à la recherche des coliformes totaux (CT), des coliformes fécaux (CF) et des streptocoques fécaux (SF). Les résultats obtenus (Tab.07) ont montré l'absence totale de ces germes dont ils sont

similaires aux études réalisées par les autres chercheurs **Millan et al., (2000)**, **Aissam et al., (2003)**, **Esmail et al., (2014)** ; **Zaier et al., (2017)**.

Une étude microbiologique est effectuée sur des olives crues a montré la présence d'une flore très diversifiée (**Asehrou, 1993**). Les coliformes fécaux sont présents et leur concentration peut atteindre  $2,8.10^4$  UFC.  $g^{-1}$  d'olive, cette flore pourrait provenir en grande partie du sol, des insectes volants, tels que les coléoptères et les hyménoptères (**Mundt, 1970**) ou des mains des ouvriers lors de la récolte. Par conséquent, l'absence totale de ces germes dans les margines ne pourrait être expliqué que par une inhibition de leur croissance par les composés phénoliques et les pigments bruns ou catéchol-mélaninique. Ainsi qu'à leur sensibilité aux faibles valeurs de pH (**Ranalli, 1991a**).

#### III.1.2.1.3. Recherche de la flore pathogène (Salmonelles et Staphylocoques)

Dans notre échantillons de margines, nous avons marqué l'absence totale des germes pathogènes y savoir : Salmonelles et staphylocoques (**Tab.07**). Ces résultats sont comparables à celle trouvées par **Aissam, (2007)** ; **Esmail et al., (2014)**.

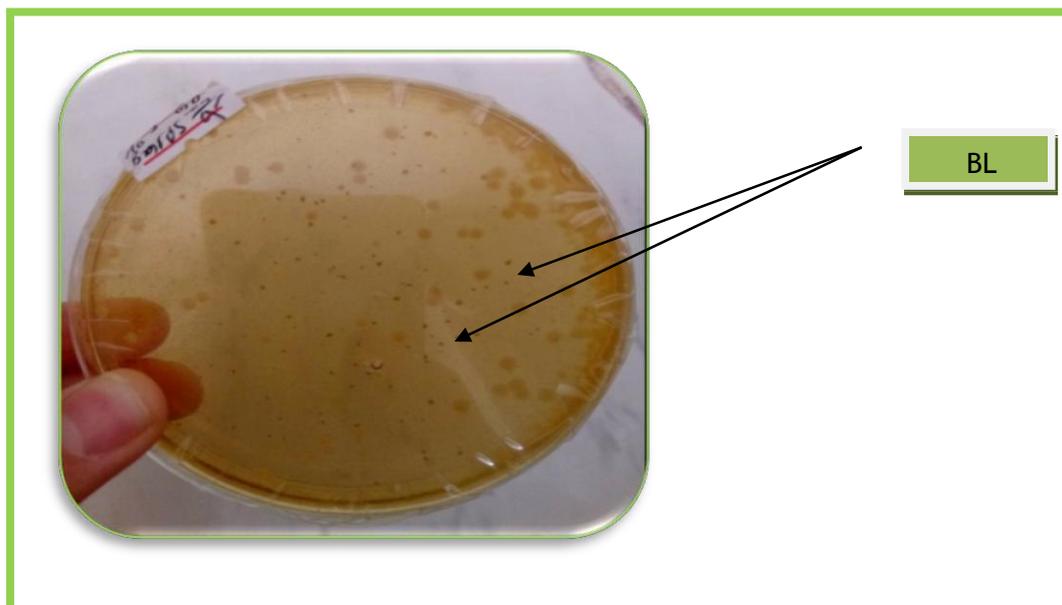
L'absence totale des Salmonelles et des Staphylocoques est dû essentiellement à leur sensibilité aux composés phénoliques qui confèrent aux margines un pouvoir antibactérien (**Singleton et al., 1957** ; **Ranalli, 1991**) vis-à-vis plusieurs espèces bactériennes. D'une part ces composés sont caractérisés par une très forte réticulation et une dénaturation des protéines, d'une autre part en raison de leur chaîne latérale acide (**Esmail et al., 2014**). Les acides phénoliques sont beaucoup moins polaires. Cette propriété peut faciliter le transport de ces molécules à travers la membrane cellulaire. Ils interagissent avec les lipides de la membrane par la neutralisation de son potentiel électrique après pénétration de la molécule. Leur activité est probablement due à leur capacité à se complexer avec les protéines extracellulaires solubles et aussi avec les parois bactériennes c'est le cas des quinones et les flavonoïdes (plus lipophiles) (**Firas, 2008**). Ainsi qu'aux interactions non spécifiques telles que l'établissement d'une liaison hydrogène avec des protéines ou des enzymes de la paroi cellulaire, la chélation des ions métalliques, l'inhibition du métabolisme bactérien, ou séquestration de substances nécessaires à la croissance des bactéries (**Ranalli, 1991**).

Vaquez Rancero *et al.*, (1974) Fadil *et al.*, (2003), ont identifié un certain nombre de flavonoïdes, des phénols et de glucosides phénoliques dans les sous-produits oléicole, Il s'agit en particulier, de l'oleuropéine. ainsi que Les données obtenues par Fadil *et al.*, (2003), suggèrent la présence des composés toxiques dans ces effluents tels que des tanins et des composés phénoliques simples.

Les bactéries Gram<sup>+</sup> sont plus sensibles que les Gram<sup>-</sup> (Obied *et al.*, 2007). Certains composés phénoliques comme le méthylcatéchol et le O-quinone inhibent la croissance des bactéries Gram positives (Staphylocoques) et Gram-négatives (Salmonelles) (Capasso *et al.*, 1995, Capasso, 1997), en dénaturant leurs protéines cellulaires, en abîmant leurs membranes et en affaiblissant leur tension superficielle, ce qui augmente l'action antibactérienne (Ranalli, 1991a, 1991c). La sensibilité ou la résistance, peut s'attribuer à la différence de structure de la paroi cellulaire des bactéries. Les bactéries à Gram négatif, en plus de la membrane cellulaire, possèdent une couche externe imperméable à la plupart des molécules (Georgantelis *et al.*, 2007). L'absence de cette barrière chez les bactéries à Gram positif permet le contact direct des constituants des extraits avec la bicouche phospholipidique de la membrane cellulaire bactérienne, entraînant une augmentation de la perméabilité aux ions et la fuite des constituants intracellulaires vitaux ou l'altération des systèmes enzymatiques bactériens (Wendakoon et Sakaguchi, 1995). Par ailleurs, la sensibilité des staphylocoques (*Staphylococcus aureus* notamment) aux acides créés par les bactéries lactiques peut expliquer leur inhibition (Abidi, 2001).

#### III.1.2.1.4. Dénombrement des Bactéries lactiques (BL)

Les micro-organismes isolés de ces margines peuvent être considérés comme les plus adaptés et résistants à la toxicité de ces rejets (Aissam, 2007) entre eux les bactéries lactiques qui sont abondantes dans les margines étudiées (Fig.38). Les valeurs trouvées sont :  $1,87 \cdot 10^5$  UFC/ml et  $3,2 \cdot 10^4$  UFC/ml pour les stations de Tizi-Ouzou et Boumerdes, respectivement. Ces valeurs sont légèrement supérieure à celles trouvées par Esmail *et al.*, (2014) dont  $1,1 \cdot 10^3$  UFC/ml,  $211,7 \cdot 10^3$  UFC/ml et  $204 \cdot 10^3$  UFC/ml).



**Figure 38** : Les résultats de dénombrement des bactéries lactiques des margines sur milieu MRS.

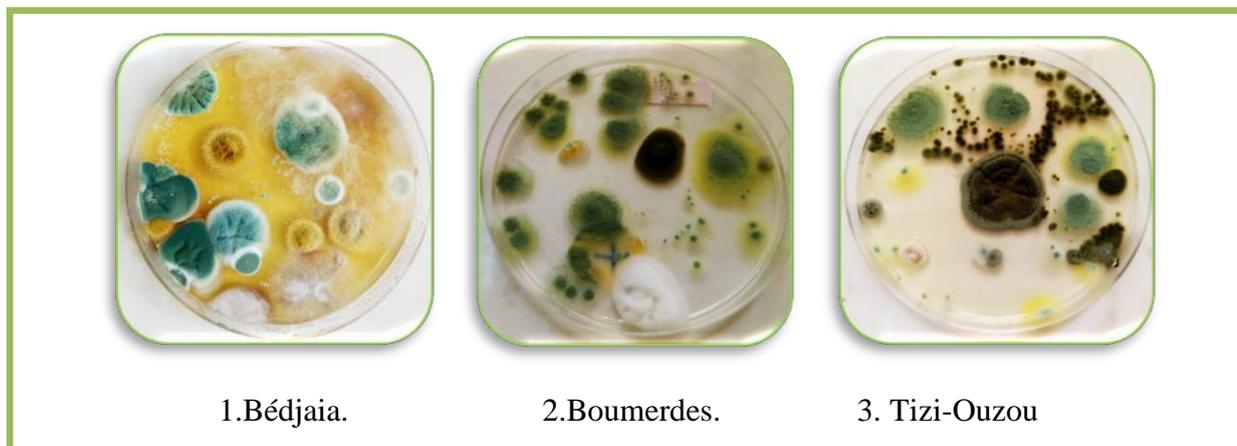
La présence des bactéries lactiques dans les margines étudiées est un témoin de leur résistance en milieux acide. En effet, les BL peuvent se développer même à des pH inférieurs à 4, cette résistance diminue en fonction du temps, et par conséquent leur disparition devient normale avec le temps. Le facteur de disparition est probablement lié à la présence des composés phénoliques (**Esmail *et al.*, 2014**). C'est le cas des margines de la région de Bejaia ou nous avons détecté l'absence totale de ces bactéries.

#### III.1.2.1.5. Dénombrement des levures et des moisissures mésophiles

Les résultats du dénombrement des germes (**Tab.07**) montrent que les levures et les moisissures mésophiles représentent la flore majoritaire des margines de différentes régions. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus par plusieurs auteurs qui ont montré que les champignons et les levures sont capables de se développer plus mieux que les bactéries dans les margines (**Fig.39**) (**Millan *et al.*, 2000 ; Galanakis, 2010 ; Esmail *et al.*, 2014 ; Zaier *et al.*, 2017**). Les valeurs des moisissures mésophiles obtenues à partir de notre échantillon sont :  $2,2 \cdot 10^2$  UFC/ml,  $3 \cdot 10^1$  UFC/ml et  $3 \cdot 10^4$  UFC/ml respectivement pour les trois stations Bejaïa, Tizi-Ouzou et Boumerdes. La valeur de Boumerdes est supérieure légèrement à celle trouvée par **Esmail *et al.*, (2014)**  $7,44 \cdot 10^3$  UFC/m ainsi qu'aux deux autres stations que nous avons étudié ( $216,9 \cdot 10^4$  UFC/ml et  $325 \cdot 10^4$  UFC/ml). Le dénombrement des levures (**Fig.40**) a révélé :  $3 \cdot 10^2$  UFC/m  $5 \cdot 10^3$  UFC/m  $6 \cdot 10^4$  UFC/ml respectivement pour les trois stations : Bejaia, Tizi-Ouzou et Boumerdes. Ces résultats sont

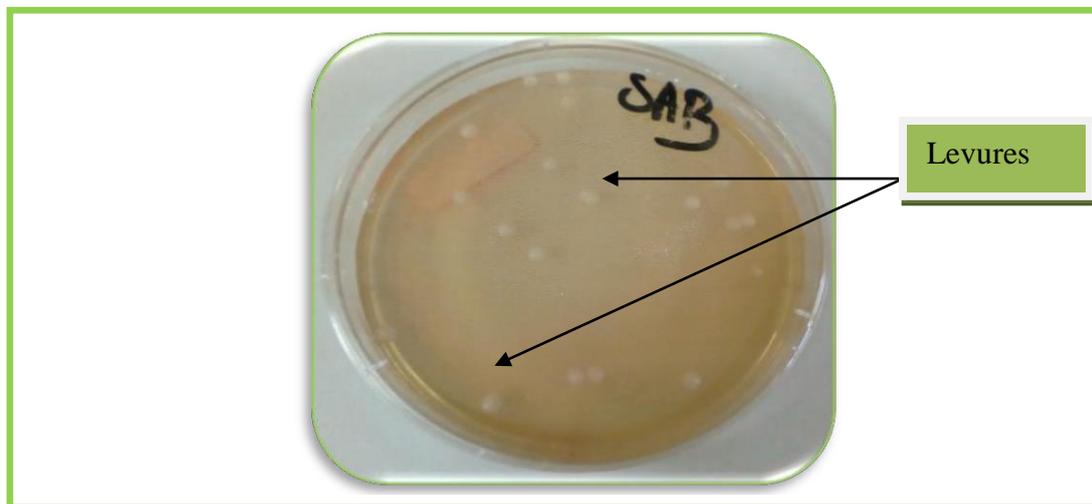
inférieure à celles trouvés par **Zahier et al., (2017)**  $2,74 \cdot 10^3$ UFC/ml et  $3,54 \cdot 10^3$ UFC/ml, et sont semblables à celles trouvés par **Aissam (2003)**  $7,6 \cdot 10^3$ UFC/ml,  $4 \cdot 10^2$ UFC/ml. Ils sont également comparables à ceux obtenus par plusieurs auteurs **Moncif et al., (1993)** et **Millan et al., (2000)**.

#### ❖ Dénombrement des champignons



**Figure 39:** Les résultats de dénombrement des moisissures mésophiles dans les trois régions sur milieu PDA.

#### ❖ Dénombrement des levures



**Figure 40:** Les résultats de dénombrement des levures des margines sur milieu Sabouraud.

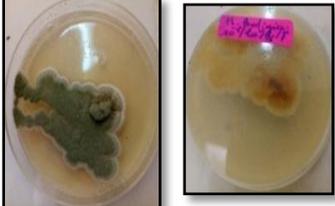
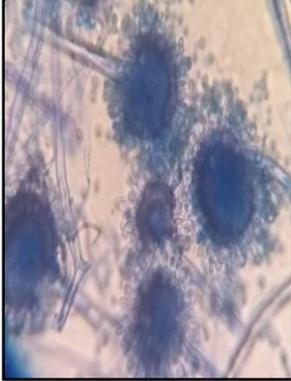
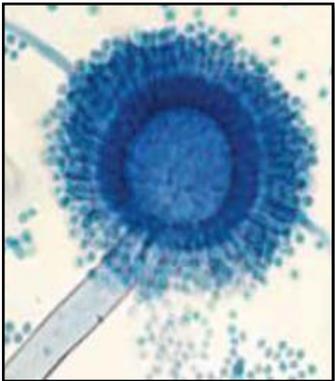
En effet, Les levures et les moisissures mésophiles semblent être les mieux adaptés aux caractéristiques physico-chimiques des margines telles que l'acidité, la salinité élevées et la toxicité des substances antimicrobiennes (composés phénoliques, tanins...). Le pouvoir tolérant des moisissures et des levures est un caractère génétique. Il pourrait être utilisé pour réussir les activités de traitement souvent mal menées ou non accomplies (**Esmail et al., 2014**). La flore fongique se compose essentiellement d'*Aspergillus flavus*, *Aspergillus candidus*, *Penicillium negricans*, et *Alternaria. sp*

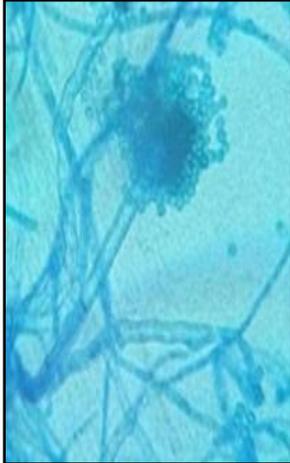
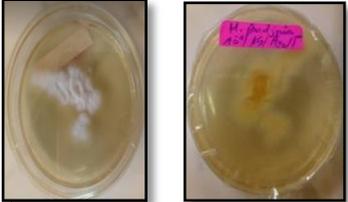
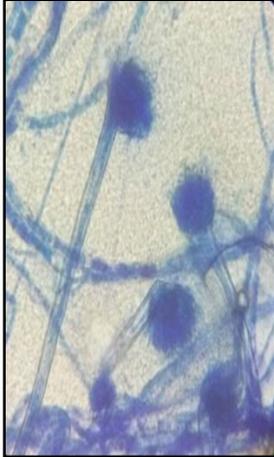
(Zaier *et al.*, 2017). Les micro-organismes les plus sensibles sont les champignons, mais cette règle souffre de très nombreuse exploitation. On cite que les champignons appartenant aux genres *Penicillium* et *Aspergillus* résistent bien à des teneurs élevées de Na Cl (10 à 20%) de sorte que la salinité ne joue pas toujours un rôle déterminant dans la distribution de la microflore fongique (Dommergues, 1970).

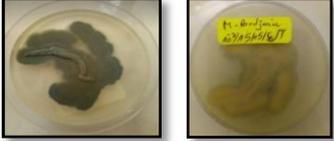
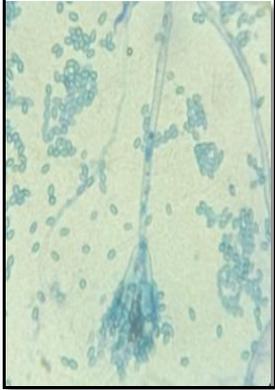
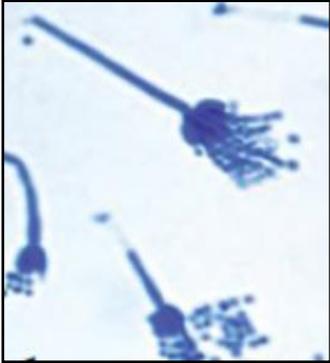
#### III.1.2.1.6. L'isolement et l'identification des souches fongiques

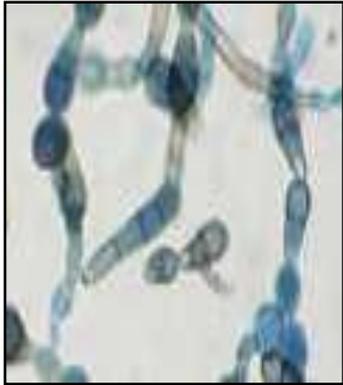
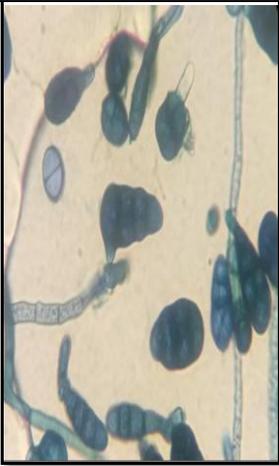
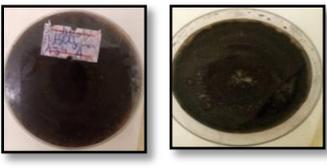
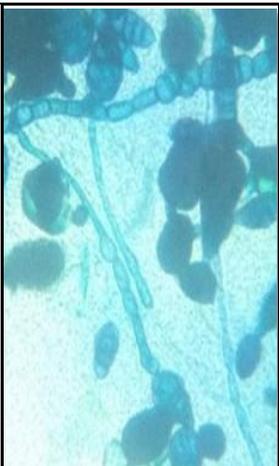
Sur la base des caractères macroscopiques et microscopiques des colonies observées (Tab. 07) qui donne des différents aspects entre les résultats de l'ensemencement, suite à des dilutions décimales différentes pour chaque échantillon nous avons isolé 55 souches réparties en fonction des sites d'échantillonnage (Tab.08) qui sont regroupées en 14 genres y savoir : *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Mucor*, *Phytium*, *Chrysonilia*, *Alternaria*, *Scedosporium*, *Rhizoctonia*, *Corenospora*, *Bispora*, *Metahresium*, et *Paecilomyces*. Il faut noter qu'on n'était pas en mesure d'identifier les espèces rencontrées, alors on les a appelées, espèce 1, espèce 2... etc. Les souches de moisissures identifiées des trois margines sont décrites dans le tableau suivant :

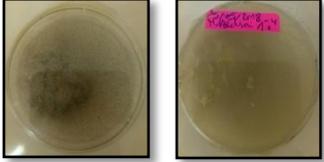
**Tableau 08 :** Résultats de l'identification morphologique des moisissures mésophiles isolées à partir des margines de région de Bejaïa.

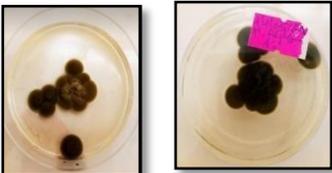
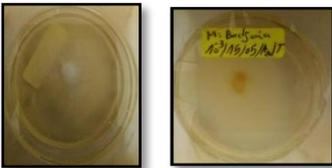
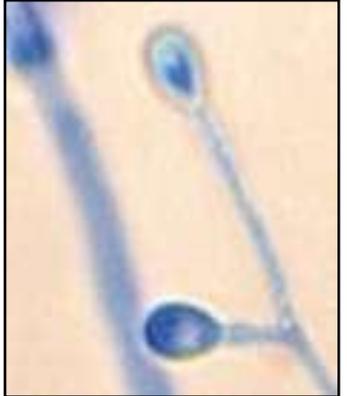
Code	Aspect macroscopique Mycéliums aériens Revers des mycéliums	Aspect microscopique	Photo de référence	Identification préssumé de genre (Gr x 100)
S 01	 <ul style="list-style-type: none"> <li>- Mycéliums aériens velouté vert.</li> <li>- Croissance non homogène.</li> <li>- Le revers est habituellement jaune.</li> <li>- Absence de pigmentation</li> </ul>		 <ul style="list-style-type: none"> <li>- Thalle long, cloisonné, lisse.</li> <li>- Conidiophore se termine par une vésicule ovale.</li> <li>- Phialides porté directement par la vésicule, dressée densément, groupée.</li> <li>- Conidies globuleuse echinulées.</li> </ul>	<p><i>Aspergillus sp</i> 1. <b>(Raper et Fennel, 1977)</b></p>
S 02	 <ul style="list-style-type: none"> <li>- Mycéliums aériens velouté vert.</li> <li>- Croissance homogène.</li> <li>- Le revers est jaune.</li> <li>- Absence de pigmentation</li> </ul>		 <ul style="list-style-type: none"> <li>- Conidiophore long cloisonné hyalin, qui se termine par une vésicule sphérique</li> <li>- Phialides directement insérées sur la vésicule ou portées par des métules</li> <li>- Conidie globuleux, echinulées</li> </ul>	<p><i>Aspergillus sp</i> 2. <b>(Chabasse et al., 2002).</b></p>

<p>S 03</p>	 <p>-Mycéliums aériens velouté blanc. -Colonies non homogène. -Le revers est jaune. -Absence de pigmentation.</p>		 <p>-Conidiophore petit, brun lisse et sinueux qui se termine par une vésicule sphérique - Phialides portées par des métules insérées sur la partie supérieure de la vésicule. - Conidie rondes, verte, échinulées souvent disposées en chaîne.</p>	<p><i>Aspergillus</i> <i>Sp 3.</i> (Chabasse <i>et al.</i>, 2002)</p>
<p>S 04</p>	 <p>-Mycéliums aériens velouté blanc. -Colonies non homogène. -Le revers est blanc à jaune. -Absence de pigmentation.</p>		 <p>-Thalle cloisonnée -Conidiophores lisses et incolores. -La vésicule hémisphérique -Phialides portés directement par la vésicule, dressée densément groupée. -Conidies globuleuse échinulées. -Sporulation lâche.</p>	<p><i>Aspergillus sp</i> <i>4.</i> (Chabasse <i>et al.</i>, 2002)</p>

<p><b>S 05</b></p>	 <ul style="list-style-type: none"> <li>-Mycéliums aériens vert foncé, duveteux à croissance lente non homogène</li> <li>-Revers des cultures vert foncé</li> <li>-Présence de pigmentations</li> </ul>			<p><i>Penicillium sp</i> 01.</p> <p>(Chabasse <i>et al.</i>, 2002)</p>
<p><b>S 06</b></p>	 <ul style="list-style-type: none"> <li>-Mycéliums aériens vert foncé, poudreuse à croissance lente non homogène</li> <li>-Revers des cultures jaune</li> <li>-Présence Pigmentations</li> </ul>		 <ul style="list-style-type: none"> <li>-Hyphe septé hyalin</li> <li>-Conidiophores monovercillés.</li> </ul>	<p><i>Penicillium sp</i> 02.</p> <p>(Chabasse <i>et al.</i>, 2002)</p>
<p><b>S 07</b></p>	 <ul style="list-style-type: none"> <li>-Mycéliums aériens vert gris, duveteux à croissance lente non homogène</li> <li>-Revers des cultures jaune</li> <li>-Présence de pigmentations</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>-Conidies rondes à ovoïdes, disposées en très longues chaînes basipetales.</li> </ul>	<p><i>Penicillium sp</i> 03.</p> <p>(Chabasse <i>et al.</i>, 2002)</p>

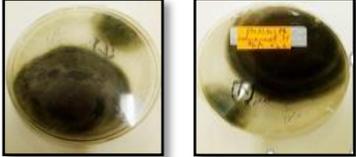
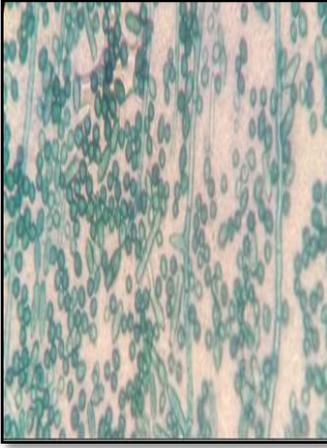
<p><b>S 08</b></p>	 <p>-Mycélium aérien avec un centre marron foncé au bord beige -Colonie duveteuse à laineuse homogène. -Surface flexueux avec plusieurs pores. -Pas de pigment.</p>			<p><i>Alternaria sp</i> 01 (Chabasse <i>et al.</i>, 2002)</p>
<p><b>S 09</b></p>	 <p>-Mycélium aérien vert foncé à noir. -Colonie duveteuse à laineuse homogène. -Surface flexueux avec plusieurs pores. -Pas de pigment. Rever esr vert foncé jaune qux bord</p>		<p>-Les hyphes septes, simple ou ramifier, laineux, gris vert - Les conidies sont brunes, pluricellulaires (dictyospores) d'aspect piriforme ou ovoïdes, allongées, lisse, regroupées en chaines à maturité, caractrisées par la présence d'un bec plus au moins marqué cloisons transversale oblique ou longitudinales.</p>	<p><i>Alternaria sp</i> 02. (Chabasse <i>et al.</i>, 2002)</p>
<p><b>S 10</b></p>	 <p>-Mycélium aérien noir. -Colonie duveteuse à laineuse homogène. -Surface flexueux avec plusieurs pores. -Recto noir foncé comme le revers -Pas de pigment.</p>		<p>-Les hyphes septes, simple ou ramifier, laineux, gris vert - Les conidies sont brunes, pluricellulaires (dictyospores) d'aspect piriforme ou ovoïdes, allongées, lisse, regroupées en chaines à maturité, caractrisées par la présence d'un bec plus au moins marqué cloisons transversale oblique ou longitudinales.</p>	<p><i>Alternaria sp</i> 03 (Chabasse <i>et al.</i>, 2002)</p>

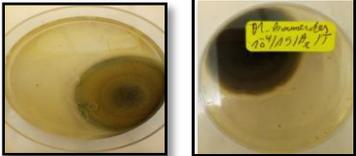
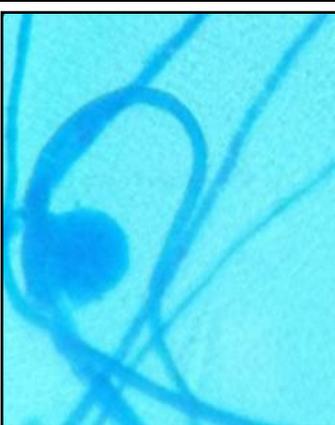
<p><b>S 11</b></p>	 <p>-Mycélium aérien blanc qui devint gris à brun. -Colonie laineuse envahissante surélevée. -Recto incolore à gris. -Pas de pigmentation.</p>		 <p>-Filaments larges septés. -Sporocystophores se terminent par une columelle ovoïde sans apophyse. -Sporocystes globuleux ornementés de spicules. -Spore ronde, -Pas de stolons ni de rhizoïdes.</p>	<p><i>Mucor sp 01</i> <b>(Chabasse et al., 2002)</b></p>
<p><b>S 12</b></p>	 <p>-Mycélium aérien blanc. -Colonie laineuse envahissante surélevée. - Recto incolore à blanc. -Pas de pigmentation.</p>		<p>-Sporocystophores se terminent par une columelle ovoïde sans apophyse. -Sporocystes globuleux ornementés de spicules. -Spore ronde, -Pas de stolons ni de rhizoïdes.</p>	<p><i>Mucor sp 02</i> <b>(Chabasse et al., 2002)</b></p>
<p><b>S 13</b></p>	 <p>-Mycélium aérien blanc qui devint gris à brun avec centre gris. -Colonie laineuse envahissante surélevée. -Revers blanc à beige. -Pas de pigmentation.</p>		 <p>-hyphes ramifiés, cloisonnés, subhyalins à bruns, à parois lisses -Conidiophores émergeant seuls ou plus souvent en touffes denses d'hyphes superficielles ou de cellules stromales, érigées ou ascendantes, simples, droites ou flexueux, brun pâle à brun foncé, cloisonné, avec jusqu'à quatre proliférations cylindriques successives.</p>	<p><i>Corenospora</i> <i>Corenospora</i> <b>(Chabasse et al., 2002)</b></p>

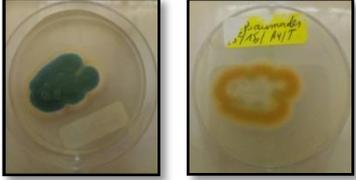
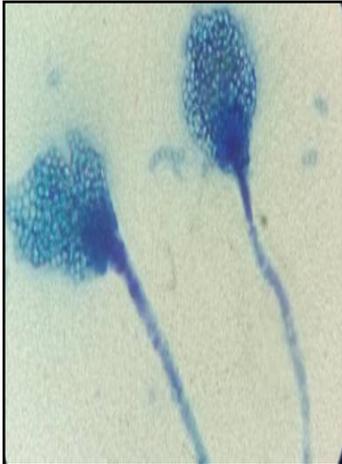
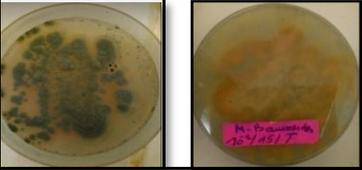
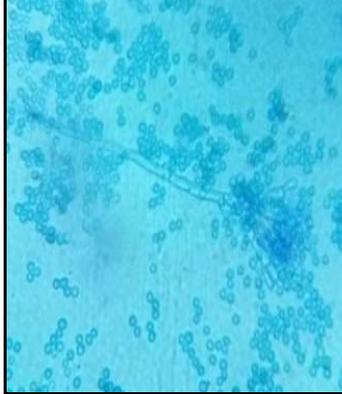
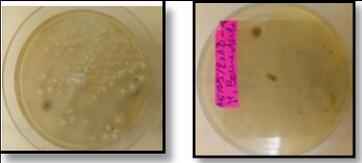
<p><b>S 14</b></p>	 <ul style="list-style-type: none"> <li>-Mycélium aérien vert foncé.</li> <li>-Colonie non homogène.</li> <li>-Recto jaune.</li> <li>-Pas de pigmentation</li> </ul>		 <ul style="list-style-type: none"> <li>-Hyphes ramifiés, cloisonnés,</li> <li>-Disposition binaire des spores qui sont ovoïdes</li> </ul>	<p><i>Bispora sp.</i> <b>(Chabasse et al, 2002)</b></p>
<p><b>S 17</b></p>	 <ul style="list-style-type: none"> <li>-Mycélium aérien vert olive au brin noir foncé.</li> <li>-Colonie duveteuse non homogène.</li> <li>-Surface plat.</li> <li>-Pas de pigmentation</li> </ul>		 <ul style="list-style-type: none"> <li>-Hyphes septées.</li> <li>-Conidiophores ramifiés et allongés.</li> <li>-Conidies en chaîne acropétale, septées avec plusieurs sites conidiogènes.</li> </ul>	<p><i>Cladosporium sp 1.</i> <b>(Chabasse et al, 2002)</b></p>
<p><b>S 18</b></p>	 <ul style="list-style-type: none"> <li>-Mycélium aérien blanchâtre</li> <li>-Colonie cotonneuse homogène.</li> <li>-Surface plat.</li> <li>-Revers blanc.</li> <li>-Pas de pigmentation</li> </ul>		 <ul style="list-style-type: none"> <li>- Conidies ovoïdes hyalines puis brunes, aleuries terminales ou latérales naissent directement sur les côtés des</li> </ul>	<p><i>Scedosporium sp.</i> <b>(Chabasse et al., 2002)</b></p>

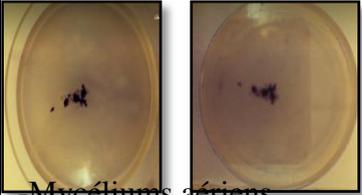
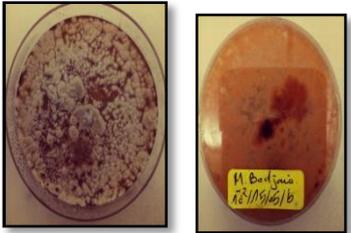
			filaments végétatifs ou à l'extrémité de courts conidiophores. -Conidiogènes de type thalique solitaire avec production d'aleuries toujours unicellulaires ou types blastique annellidique pour certaines souches.	
S 19	 <p>-Mycélium aérien marron au bord beige. -Colonie duveteuse. -Croissance homogène -Pas de pigmentation</p>		 <p>-Agencement des chaînes porteuses de phialides, - des colonies de conidies cylindriques ou légèrement ovotides, sèches et généralement de couleur verte - Les colonies sont formées d'une agrégation de ces chaînes conidiennes</p>	<p><i>Metahresium</i> sp. (Chabasse et al., 2002)</p>
S 20	 <p>-Mycélium aérien blanc cotonneuse. -Revers de couleur jaune à orange -Les colonies envahissantes. -Absence de pigmentation -Absence d'exudation.</p>		 <p>-Hyphe non cloisonné hyalin et bien ramifié. -Sporange rond contient une vésicule à paroi mince dans laquelle les zoospores se différencient.</p>	<p><i>Phytium</i> sp. Vander et al., (1991)</p>

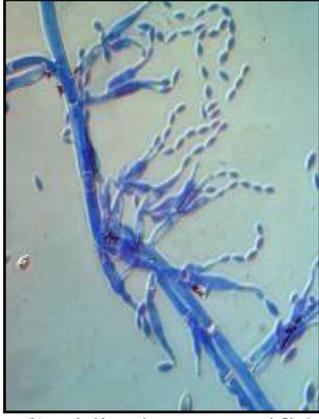
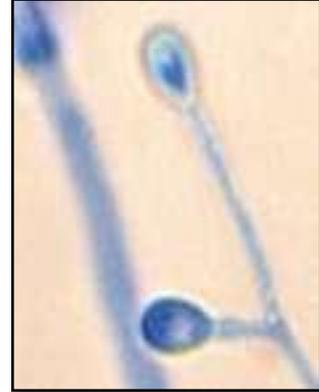
**Tableau 09** : Résultats de l'identification morphologique des moisissures isolées a partir des margines de région de Boumerdes.

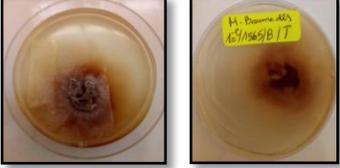
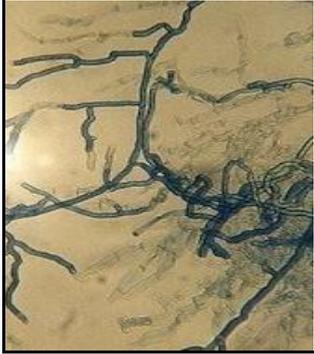
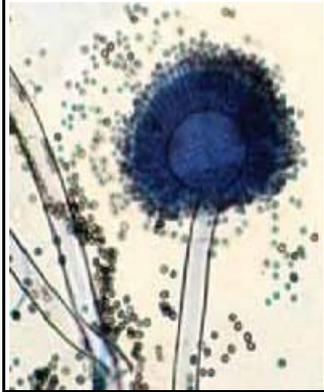
Code	Aspect macroscopique Mycéliums aériens Revers des mycéliums	Aspect microscopique	Photo de référence	Identification préssumé de genre (Gr x 100)
S 21	 <p>-Mycélium aérien vert foncé à noir. -Colonie duveteuse à laineuse non homogène. - Verso noir foncé - Pas de pigmentation</p>		 <p>-Les hyphes septes, simple ou ramifier, laineux, gris vert - Les conidies sont brunes, pluricellulaires (dictyospores) d'aspect piriforme ou ovoïdes, allongées, lisse, regroupées en chaînes à maturité, caractérisées par la présence d'un bec plus au moins marqué cloisons transversale oblique ou longitudinales.</p>	<p><i>Alternaria sp.</i> <b>(Chabasse et al., 2002)</b></p>
S 22	 <p>-Mycélium aérien vert olive au brin noir foncé. -Colonie duveteuse non homogène. -Recto noir. -Pas de pigmentation</p>		 <p>-Hyphe septé. -Conidiophores ramifiés et allongés. -Conidies en chaîne acropétale, septés avec plusieurs sites conidiones</p>	<p><i>Cladosporium sp</i> <b>1(Chabasse et al., 2002)</b></p>

<p><b>S 23</b></p>	 <p>-Mycélium aérien vert jaunâtre. -Colonie duveteuse homogène. -Recto vert foncé. -Pas de pigmentation</p>		 <p>-Hyphe septé. -Conidiophores ramifiés et allongés. -Conidies en chaîne acropétale, septés avec plusieurs sites conidionnes</p>	<p><i>Cladosporium sp</i>(Chabasse et al ., 2002)</p>
<p><b>S 24</b></p>	 <p>-Mycélium aérien blanc qui devient gris à brun -Colonie laineuse duveteuse homogène envahissant surélevée. -Recto blanc à gris. -Pas de pigment</p>		 <p>-Filaments larges peu ou pas septés. Sporocystophores se terminent par une columelle ovoïde sans apophyse -Sporocystes globuleux. -Spores rondes à ellipsoïdales, lisses ou ornementées de spicules. -Pas de stolons ni de rhizoïdes</p>	<p><i>Mucor sp.</i> (Chabasse et al ., 2002)</p>

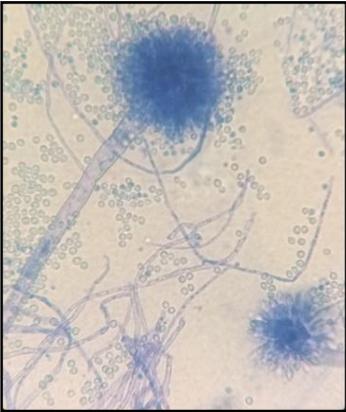
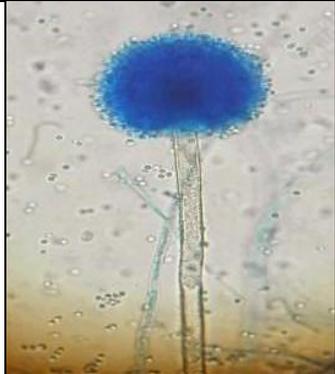
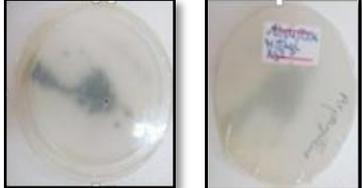
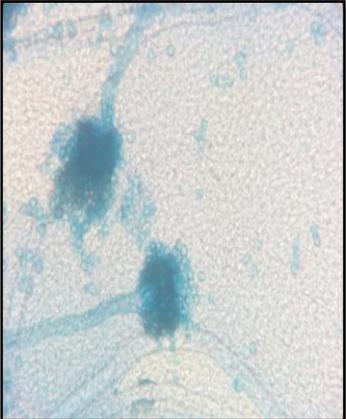
<p>S 25</p>	 <p>-Mycéliums aériens bleu-vert à vert foncé à gris turquoise velouté. -Croissance non homogène. -Le revers est habituellement jaune. -Absence de pigmentation.</p>		 <p>-Conidiophore long, lisse jaunâtre porte une vésicule ovale -Les phialides portées par des métules insérées sur tout le pourtour de la vésicule -Conidies globuleuses échinulées.</p>	<p><i>Aspergillus sp.</i> <b>(Chabasse et al., 2002)</b></p>
<p>S 26</p>	 <p>-Mycéliums aériens vert clair, poudreuse à croissance lente non homogène -Revers des cultures jaune -Absence de Pigmentations</p>			<p><i>Penicillium sp</i> <i>1</i> <b>(Pit, 1979)</b></p>
<p>S 27</p>	 <p>-Mycéliums aériens blanc qui deviennent vert, duveteux à croissance non homogène. -Revers des cultures jaune.-Présence de pigmentations</p>		<p>-Hyphe septé hyalin -Conidiophores monoverticillé. -Conidies rondes à ovoïdes, disposées en très longues chaînes basipetales.</p>	<p><i>Penicillium</i> <i>Sp 2</i> <b>(Pit, 1979)</b> <b>et</b> <b>(Samson, 1996)</b></p>

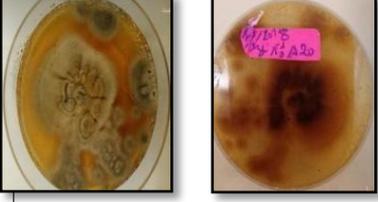
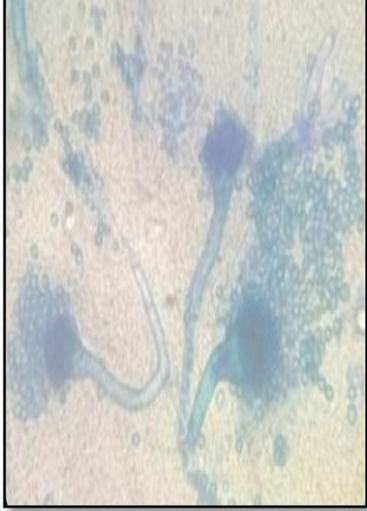
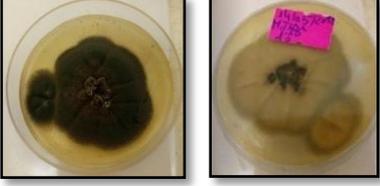
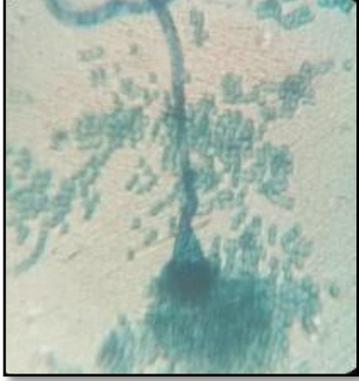
<p>S 28</p>	 <p>-Mycéliums aériens transparents à vert, duveteux à croissance non homogène. -Revers des cultures transparent. -Présence de pigmentations</p>			<p><i>Penicillium</i> <i>Sp 1</i> <b>(Chabasse et al., 2002)</b></p>
<p>S 29</p>	 <p>Mycéliums aériens beige, duveteux à croissance homogène. -Revers des cultures jaune. -Absence de pigmentations</p>		<p>-Hyphe septé hyalin. -Conidiophores biverticillé asymétrique. -Conidies rondes à ovoïdes, disposées en très longues chaînes basipetales</p>	<p><i>Penicillium</i> <i>Sp 2</i> <b>(Chabasse et al., 2002)</b></p>
<p>S 30</p>	 <p>-Mycéliums aériens, beige rougeâtre, duveteux à croissance non homogène. -Revers des cultures jaune. -Présence de pigmentations</p>		 <p>Hyphe septé hyalin -Conidiophores triiverticillé asymétrique. -Conidies rondes à ovoïdes, disposées en très longues chaînes basipetales.</p>	<p><i>Penicillium</i> <i>Sp 01</i> <b>(Chabasse, 2002)</b></p>

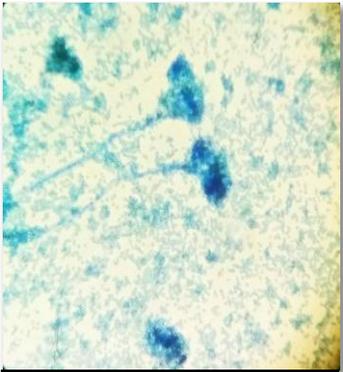
<p>S 31</p>	 <p>-Mycéliums aériens, beige rougeâtre, duveteux à croissance non homogène. -Revers des cultures jaune. -Présence de pigmentations</p>		 <p>- Conidiophores ramifiés en verticilles, portent à leurs extrémités des phialides - Les conidies sont unicellulaires, globuleuses ou ovales, rugueuses et disposées en chaînes. - Les phialides sont cylindriques ou renflées dans la partie inférieure et terminées par un long col effilé et étroit regroupées en pinces</p>	<p><i>Paecilomyces</i> sp. (Chabasse et al., 2008)</p>
<p>S 32</p>	 <p>-Colonies d'aspect cotonneux, laineux blanchâtres au début et deviennent grises en vieillissant. - Revers blanc - Pas de pigmentation</p>		 <p>-Conidies ovoïdes hyalines puis brunes, Aleuries terminales ou latérales -Conidiogènes de type thalique solitaire avec production d'aleuries toujours unicellulaires ou types blastique annellidique pour certaines souches.</p>	<p><i>Scedosporium</i> sp.  (Chabasse et al., 2002)</p>

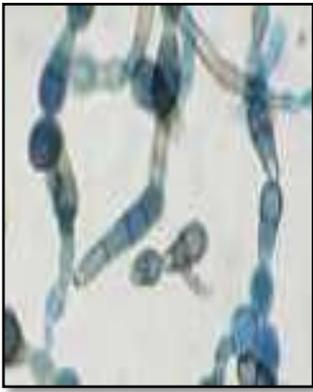
<p>S 33</p>	 <p>-mycélien régulier, dense ayant une couleur grisâtre à brunit. -Le revers de la colonie est orange foncé. -Absence de pigmentation et d'exsudation.</p>	 	 <p>-Présence d'un mycélium stérile, constitué de plusieurs hyphes hyalins à brun clair, ramifiés -On trouve de fréquentes constrictions au niveau des septa, et des ramifications -Les ramifications forment des angles de 45° à 90°, et sont souvent coenocytiques</p>	<p><i>Rhizoctonia</i> <i>sp.</i> <b>(Chabasse et al., 2002)</b></p>
<p>S 34</p>	 <p>-Mycélium aérien blanc aux départs et entièrement noir. -Colonie floconneuse non homogène, aspect poudreux, -Surface épaisse et uniforme. -Pas de pigmentation. -Le revers est de couleur grise.</p>		 <p>-Mycélium cloisonné très long, lisse, hyalin. -Conidiophores nombreux, dressés et non ramifiés, terminés par une vésicule globuleux. -Phialides insérées sur la vésicule par l'intermédiaire de métules. -Conidies globuleux brun fortement échinulées en chaîne divergente.</p>	<p><i>Aspergillus</i> <i>sp 1</i> <b>(Chabasse et al., 2002)</b></p>

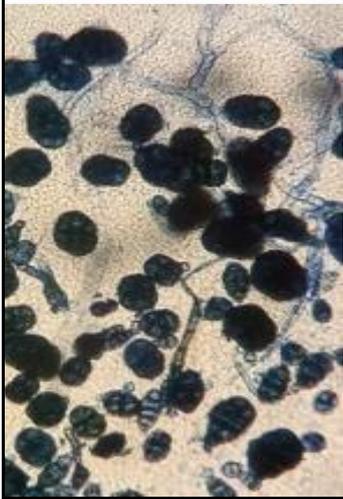
**Tableau 10 :** Résultats de l'identification morphologique des moisissures isolées à partir des margines de région de Tizi-Ouzou.

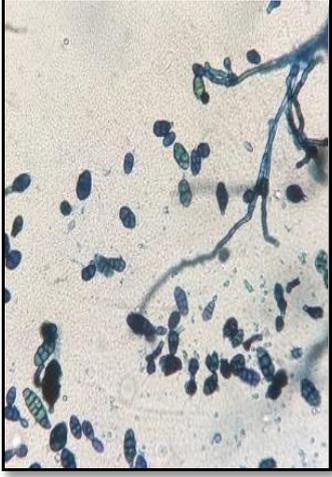
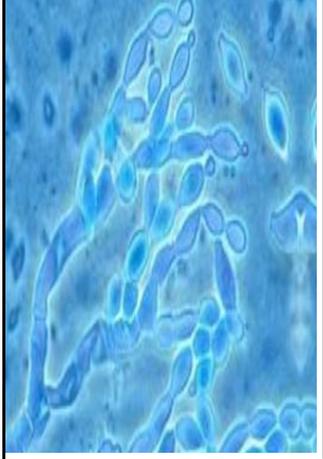
Code	Aspect macroscopique Mycéliums aériens Revers des mycéliums	Aspect microscopique	Photo de référence	Identifica tion présumé de genre (Gr x 100)
S 35	 <ul style="list-style-type: none"> <li>-Mycéliums aériens velouté vert claire à bord blanc</li> <li>-Croissance non homogène.</li> <li>-Le revers est habituellement blanc.</li> <li>-Absence de pigmentation</li> </ul>		 <p>Thalle long, cloisonné, lisse. -Conidiophores se termine par une vésicule ovale. -Phialide porté directement par la vésicule, dressées densément groupée. -Conidies globuleuse échinulées.</p>	<p><i>Aspergillus</i> <i>s</i> <i>sp 1</i></p> <p>(Chabasse <i>et al.</i>, 2002)</p>
S 36	 <ul style="list-style-type: none"> <li>-Mycéliums aériens velouté vert claire</li> <li>-Croissance non homogène.</li> <li>-Le revers est de couleur vert claire.</li> <li>-Absence de pigmentation</li> </ul>		 <p>-Thalle cloisonnée -Conidiophores lisses et</p>	<p><i>Aspergillus</i> <i>s</i> <i>sp 2</i></p> <p>(Chabasse <i>et al.</i>, 2002)</p>

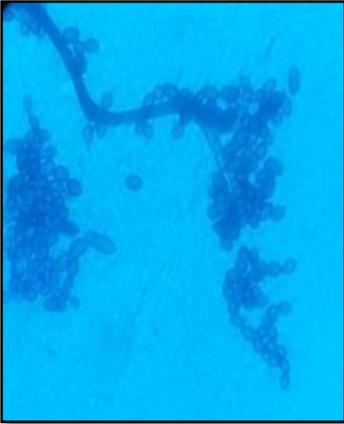
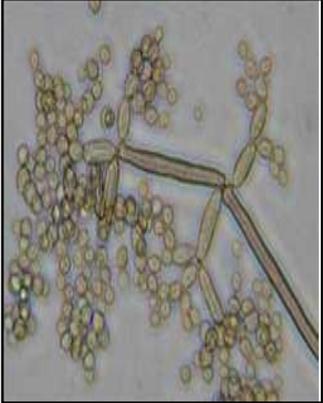
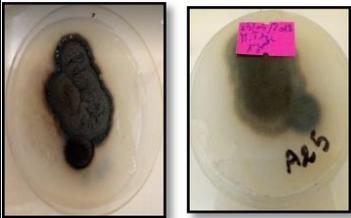
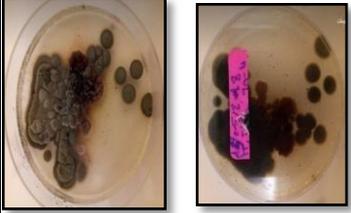
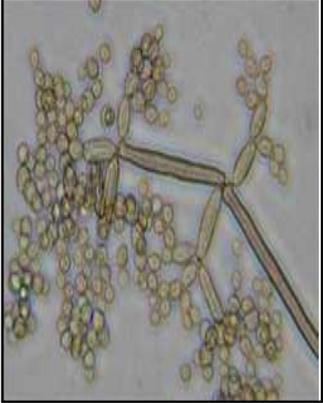
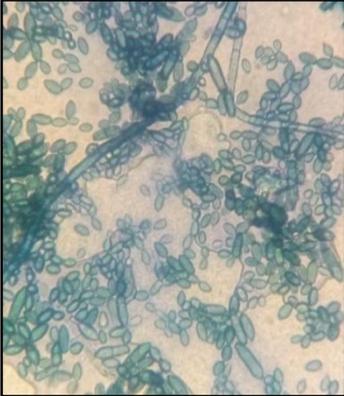
<p>S 37</p>	 <p>-Mycéliums aériens velouté blanc rougeatre claire à centre noire -Croissance homogène. -Le revers est habituellement jaune. -Absence de pigmentation</p>		<p>incolores. -La vésicule hémisphérique -Phialides portés directement par la vésicule, dressée densément groupée. -Conidies globuleuse échinulées. -Sporulation lâche.</p>	<p><i>Aspergills</i> <i>sp 3</i> <b>(Chabasse et al., 2002)</b></p>
<p>S 38</p>	 <p>-Mycéliums aériens velouté vert claire au bord blanc. -Croissance non homogène. -Le revers est vert claire. -Absence de pigmentation</p>			<p><i>Aspergills</i> <i>sp 4</i> <b>(chabasse et al., 2002)</b></p>
<p>S 39</p>	 <p>Mycéliums aériens velouté bége à vert. -Colonies souvent granuleuses non homogène. -Le revers jaune foncé. -Présence de pigmentation.</p>		<p>-Absence de pigmentation. -Thalle cloisonnée -Conidiophores lisses et incolores. -La vésicule hémisphérique -Phialides portés directement par la vésicule, dressée densément groupée. -Conidies globuleuse échinulées. -Sporulation lâche.</p>	<p><i>Aspergillus</i> <i>s</i> <i>Sp 4</i> <b>(chabasse et al., 2002)</b></p>
<p>S 40</p>	 <p>-Mycéliums aériens velouté vert foncé à noir. -Colonies souvent granuleuses non homogène. -Le revers jaune claire.</p>		<p>-Absence de pigmentation. -Thalle cloisonnée -Conidiophores lisses et incolores. -La vésicule hémisphérique -Phialides portés directement par la vésicule, dressée densément groupée. -Conidies globuleuse échinulées. -Sporulation lâche.</p>	<p><i>Aspergillus</i> <i>s</i> <i>Sp 5</i> <b>(chabasse et al., 2002)</b></p>

<p>S 41</p>	 <p>-Mycéliums aériens beige rougeatre. -Colonies velouté coutouneuse non homogène. -Le revers jaune. -Absence de pigmentation.</p>		 <p>-Thalle cloisonnée -Conidiophores long, hyalin, -Vésicule sphérique. -Phialides insérées sur la vésicule par l'intermédiaire des métules. -Conidies globuleuses echinulées.</p>	<p><i>Aspergillus sp 6</i> <b>(chabasse et al., 2002)</b></p>
<p>S 42</p>	 <p>-Mycéliums aériens vert, poudreuse à croissance non homogène. -Revers des cultures jaune. -Présence de pigmentations</p>			<p><i>Penicillium sp 1</i> <b>(chabasse et al., 2002)</b></p>
<p>S 43</p>	 <p>-Mycéliums aériens vert gris, duveteux granuleuse à croissance lente non homogène -Revers des cultures jaune -Présence de pigmentations</p>		<p>-Hyphe septé hyalin -Conidiophores monoverticillé. -Conidies rondes à ovoïdes, disposées en très longues chaînes basipetales.</p>	<p><i>Penicillium sp 2</i> <b>(chabasse et al., 2002)</b></p>

<p>S 44</p>	 <p>-Mycéliums aériens de couleur vert à gris, granuleuse à croissance nonhomogène. -Revers des cultures jaune. -Présence de pigmentations</p>		 <p>Hyphe septé hyalin -Conidiophores triiverticillé asymétrique. -Conidies rondes à ovoïdes, disposées en très longues chaînes basipetales.</p>	<p><i>Penicillium</i> <i>m sp.</i> <b>(chabasse et al., 2002)</b></p>
<p>S 45</p>	 <p>-Mycéliums aériens vert à gris, granuleuse à croissance non homogène. -Revers des cultures jaune. -Présence de pigmentations</p>		 <p>-Hyphe septé hyalin. -Conidiophores biverticillé asymétrique. -Conidies rondes à ovoïdes, disposées en très longues chaînes basipetales.</p>	<p><i>Penicillium</i> <i>m sp 1</i> <b>(chabasse et al., 2002)</b></p>
<p>S 46</p>	 <p>-Mycélium aérien beige gris avec un centre noir foncé -Colonie duveteuse à laineuse homogène. -Surface flexueux avec plusieurs pores. -Pas de pigment.</p>		 <p>-Les hyphes septés, simple ou ramifié,</p>	<p><i>Alternaria</i> <i>sp 1</i> <b>(chabasse et al., 2002)</b></p>

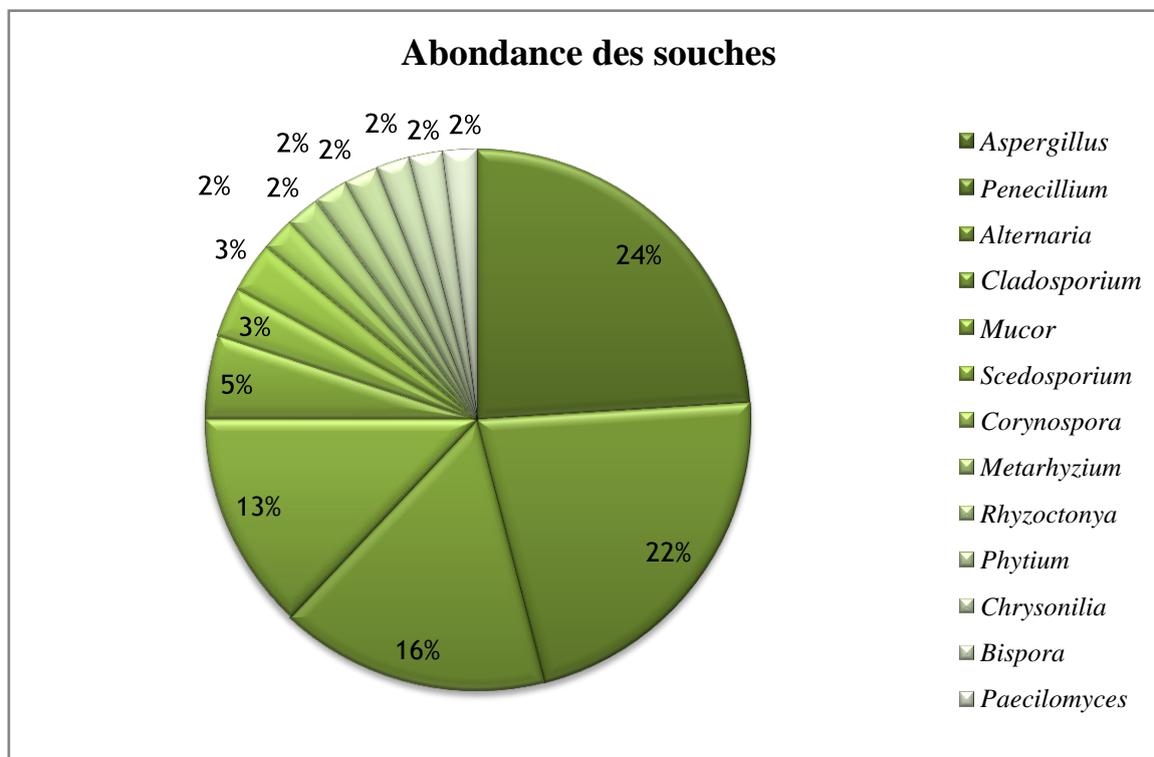
<p>S 47</p>			<p>laineux, gris vert - Les conidies sont brunes, pluricellulaires (dictyospores) d'aspect piriforme ou ovoïdes, allongées, lisse, regroupées en chaînes à maturité, caractérisées par la présence d'un bec plus au moins marqué cloisons transversale oblique ou longitudinales.</p>	<p><i>Alternaria</i> <i>sp 2</i> <b>(chabasse et al., 2002)</b></p>
<p>S 48</p>			 <p>-Les hyphes septés, simple ou ramifier, laineux, gris vert - Les conidies sont brunes, pluricellulaires (dictyospores) d'aspect piriforme ou ovoïdes, allongées, lisse, regroupées en chaînes à maturité, caractérisées par la présence d'un bec plus au moins marqué cloisons transversale oblique ou longitudinales.</p>	<p><i>Alternaria</i> <i>sp 3</i> <b>(chabasse et al., 2002)</b></p>
<p>S 49</p>			<p>brunes, pluricellulaires (dictyospores) d'aspect piriforme ou ovoïdes, allongées, lisse, regroupées en chaînes à maturité, caractérisées par la présence d'un bec plus au moins marqué cloisons transversale oblique ou longitudinales.</p>	<p><i>Alternaria</i> <i>sp 4</i> <b>(chabasse et al., 2002)</b></p>

<p><b>S 50</b></p>	 <p>- Mycélium aérien noir. - Colonie duveteuse à laineuse homogène. - Surface flexueux avec plusieurs pores. - Recto noir foncé comme le revers - Pas de pigment.</p>			<p><i>Alternaria</i> <i>sp 5</i></p> <p><b>(Chabasse et al., 2002)</b></p>
<p><b>S 51</b></p>			 <p>- Thalle à paroi épaisse, septé, claire - Les arthrospores sont hyalines portées sur des conidiophores non différenciés. Les spores se séparent facilement et présentant entre elles un filament protoplasmique émis par le pore central de la double cloison intermédiaire</p>	<p><i>Chrysonily</i> <i>a sp</i></p> <p><b>(Botton et al., 1990).</b></p>

<p>S 52</p>	 <ul style="list-style-type: none"> <li>-Colonies verdâtre foncé à noir.</li> <li>-Croissance homogène.</li> <li>-Colonies velouté poudreuse.</li> <li>-Revers noir à reflets vert.</li> <li>-Pas de pigmentation</li> </ul>			<p><i>Cladosporium sp 1</i> (<b>chabasse et al., 2002</b>)</p>
<p>S 53</p>	 <ul style="list-style-type: none"> <li>-Colonies verdâtre foncé.</li> <li>-Croissance hétérogène.</li> <li>-Colonies granuleuses.</li> <li>-Revers noir à reflets vert.</li> <li>-Pas de pigmentation</li> </ul>		<p>Hyphe septé.                  -Conidiophores ramifiés et allongés.                  -Conidies en chaîne acropétale, septés avec plusieurs sites conidiogènes.</p>	<p><i>Cladosporium sp 2</i> (<b>chabasse et al., 2002</b>)</p>
<p>S 54</p>	 <ul style="list-style-type: none"> <li>-Colonies verdâtre foncé.</li> <li>-Croissance hétérogène.</li> <li>-Colonies granuleuses.</li> <li>-Revers noir à reflets vert.</li> <li>-Pas de pigmentation</li> </ul>			<p><i>Cladosporium sp3</i> (<b>chabasse et al., 2002</b>)</p>
<p>S 55</p>	 <ul style="list-style-type: none"> <li>-Colonies verdâtre foncé à noir.</li> <li>-Croissance hétérogène.</li> <li>-Colonies velouté.</li> <li>-Revers noir à reflets vert.</li> <li>-Pas de pigmentation</li> </ul>		<p>-Hyphe septé.                  -Conidiophores ramifiés et allongés.                  -Conidies en chaîne acropétale, septés avec plusieurs sites conidiogènes.</p>	<p><i>Cladosporium Sp 4</i> (<b>chabasse et al., 2002</b>)</p>

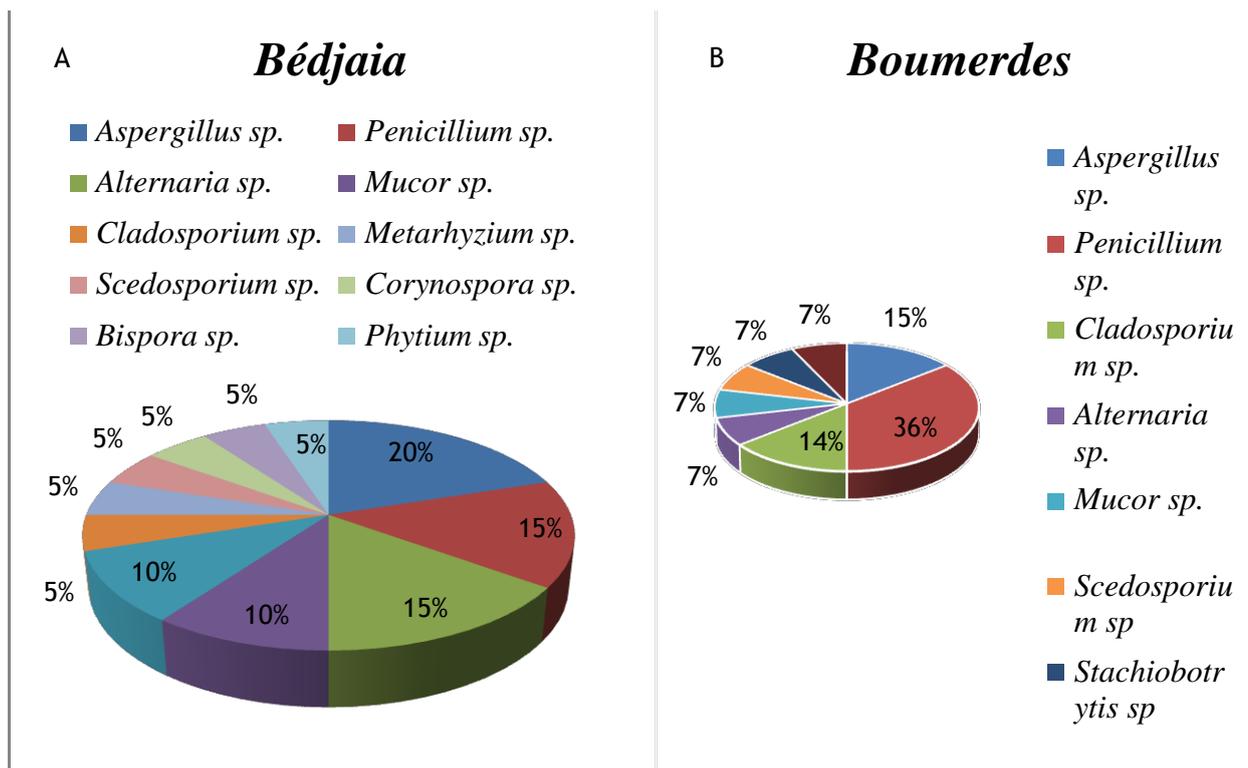
### III.I.2.1.2. Le relevé de souches fongiques les plus abondantes

Les pourcentages de différents genres isolés à partir des margines de 3 régions ainsi qu'à l'étude de leur abondance sont regroupés dans le spectre suivant :

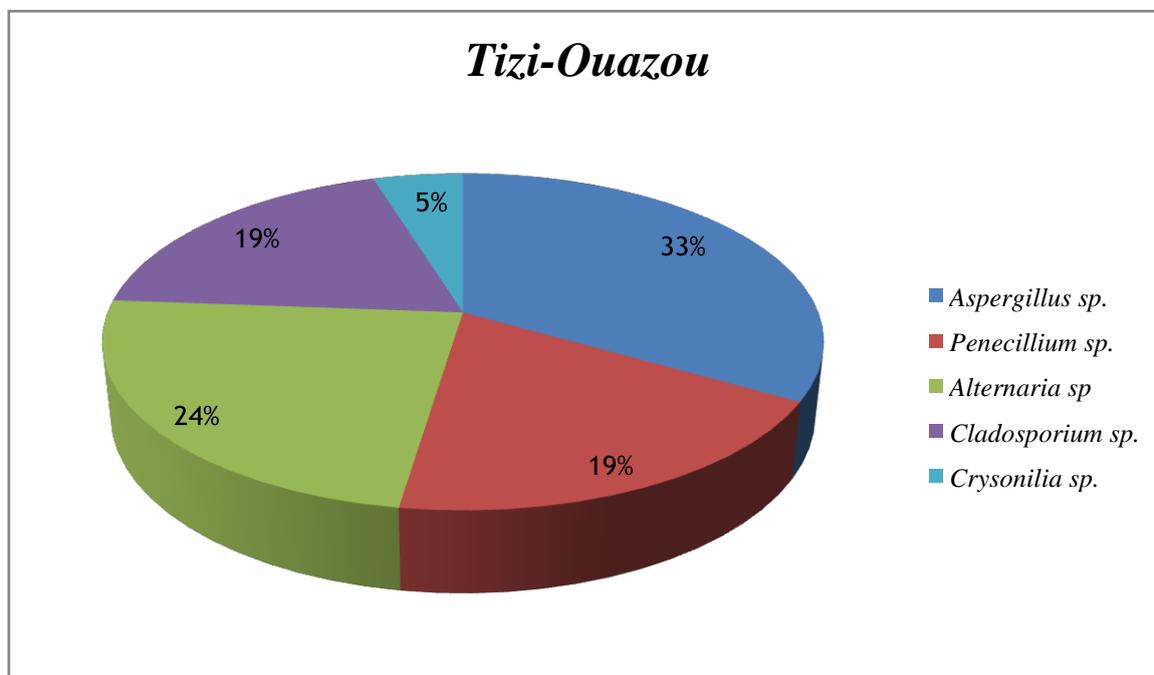


**Figure 41:** L'abondance des genres identifiés à partir de 3 échantillons des margines

Le pourcentage d'abondance calculé pour les trois régions, représente le nombre d'isollements positifs des moisissures mésophiles rapporté au nombre d'isollements effectués. Il est variable et composé de plusieurs genres avec des degrés indiquant l'abondance des deux genres *Aspergillus* (24%) et *Penicillium* (22%), cependant d'autres champignons ont été aussi isolés et identifiés en particulier : *Alternaria*, *Cladosporium*, *Mucor*, *Scedosporium*, *Rhizoctonia*, *Phytium*, *Chrysonilia*, *Bispora*, *Corynospora* et *Metarhizium* avec des pourcentages respectifs de (16%, 16%, 13%, 6%, 4%, 2%, 2%, 2%, 2%, 2% et 2%, 2%). Par ailleurs le nombre des genres isolés dans les margines de chaque région : Bejaia, Boumerdes et Tizi-Ouazou ont été déterminées et sont présentés sous forme des spectres suivants (**Fig.42 et Fig.43**) :



**Figure 42 :** Répartition des moisissures mésophiles isolés des margines de la wilaya de : A- Bejaia B- Boumerdes



**Figure 43 :** Répartition des moisissures mésophiles isolés de margine de la wilaya de Tizi-Ouzou

Les margines de la région de Bejaia ont permet d’isoler un taux élevé de souches reparties en 10 genres avec la prédominance de genre *Aspergillus*. Cependant, les margines de la région de Boumerdes ont un nombre un peu faible que celui de Bejaia, ils nous ont permet d’isoler 11 souches reparties en 8 genres avec la prédominance de genre (*Penicillium*) par contre, les effluents

issus de Tizi-Ouzou ont un taux faible en moisissure comparativement à celle de Bejaia et Boumerdes ils sont présents en 5 genres avec la prédominance de genre (*Alternaria*)

Sur la base de caractères microscopiques et macroscopiques, nous sommes arrivés à identifier 14 genres (**Tab.08, 09,10**), avec une répartition en quantité et en qualité différente. La littérature rapporte un certain nombre de travaux mentionnant la contamination des olives et leurs dérivés par des moisissures très diverses (**Florenzano et Materassi, 1965**). La prédominance des différentes genres isolés de notre margines revient à leur caractères physiologiques les résultats obtenus sont comparables a ceux trouvés par **Ntougias et al., (2013)** ; **Mann et al., (2010)** notamment les *Aspergillus* qui sont capables de vivre en saprophyte dans le sol au niveau de la rhizosphère, mais aussi à la surface du sol, sur les végétaux en voie de décomposition. Nous avons noter également la présence de genre *Penicillium* qui comporte plus de 200 espèces, il est très répandus dans la plupart des environnements terrestres, mais il a aussi été isolé comme endophyte à partir de plusieurs plantes médicinales (**Botton et al., 1990** ; **Kharwar et al., 2008** ; **Mohanta et al., 2008** ; **Rakotoniriana et al., 2008** ; **Ilyas et al., 2009** ; **Petit et al., 2009** ; **Abdel-Motaal et al., 2010** ; **Bhagobaty et al., 2010** ; **Khan et al., 2010** ; **Nagaraja et Devkar, 2010**; **Shankar et Shashikala, 2010**).

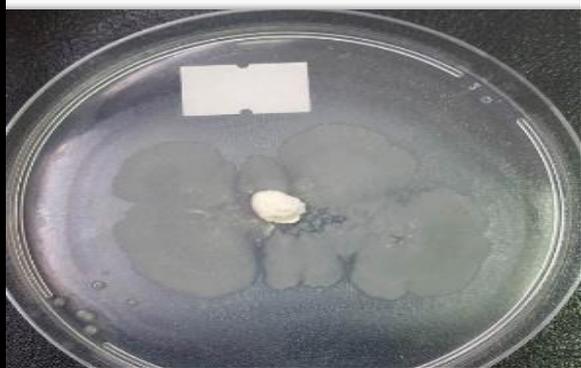
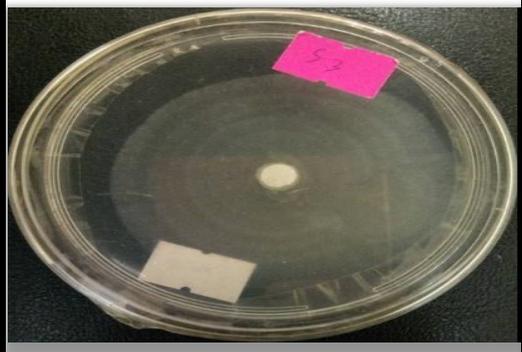
L'isolement a révélé également la présence *Cladosporium*, c'est un genre mondialement répandu, il regroupe environ 35 espèces parasites de végétaux ou saprophytes très communs (**BOTTON et al., 1990**). Ainsi que Le genre *Alternaria* qui regroupe plus de 100 espèces ubiquitaires extrêmement répandues dans les sols, la végétation, l'air ou les aliments (**Simmons, 1993**). Cependant la majorité des espèces du genre *Alternaria* sont des champignons phytopathogènes inféodés à une famille de plantes ou à une plante spécifiquement. Ainsi que nous avons remarqué la présence le genre *Phytium* qui occupe une place de marque en raison de sa grande dispersion dans le monde et son impact considérable sur l'économie agricole (**Djouamaa et al, 2008**).

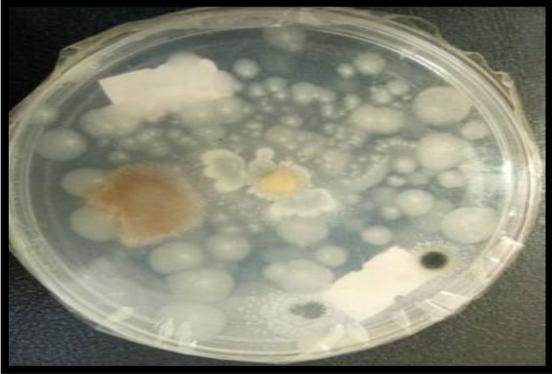
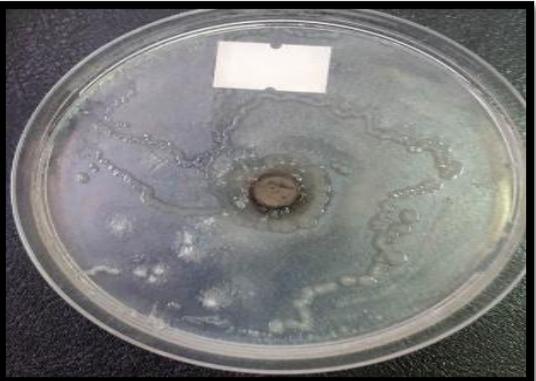
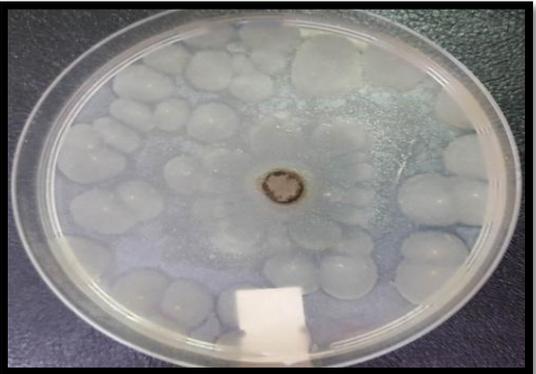
#### III.1.2.1.6. La mise en évidence de l'activité lipolytique

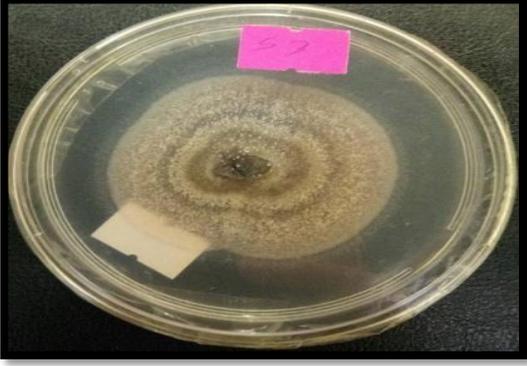
La mise en évidence de l'activité lipolytique des isolats de moisissures mésophiles nous a permis de distinguer la présence d'un précipitât autour des colonies et donc la dégradation des lipides chez 11 isolats. Durant la période d'incubation, nous avons suivi cette activité lipolytique dans chaque 24h et l'apparition du précipitât a lieu après (4jours). Parmi les 10 souches testées on a sélectionné les trois souches les plus performantes qui sont : (S8), (S46) et (S47). Le développement des souches montre une croissance rapide et remarquable de la souche (S7) et une croissance moyenne des souches (S 44), (S10) et (S45) dans les boites. Contrairement à la souche (S 05) qui ont d'une

croissance très lente sauf que la souche (S 32) est envahissante dans toutes les boîtes tandis que la croissance de la souche (S 21) est limitée qu'aux alentours de l'ensemencement.

**Tableau 11 : Résultat de la mesure de diamètre de la mise en évidence de l'activité lipolytique des souches.**

jours Souche	1 <sup>er</sup> jour	2 <sup>eme</sup> jour	3 <sup>eme</sup> jour	4 <sup>eme</sup> jour	Photo de 7 <sup>eme</sup> jour
Les souches qui ont une croissance seulement					
S 05 <i>Aspergillus sp.</i>	1 cm	1,9 cm	2,5 cm	3,7 cm	
S 32 <i>Scedosporium sp.</i>	1,8	2,8	3,5	4,8	
S 21 <i>Alternaria sp.</i>	2,2	2,3	2,5	2,5	

<p>S 55 <i>Cladosporium</i> <i>sp.</i></p>	<p>1,5</p>	<p>2,2</p>	<p>3</p>	<p>3,6</p>	
<p><b>Les souches moyennement estirasiques</b></p>					
<p>S 44 <i>Penicillium</i> <i>sp.</i></p>	<p>1</p>	<p>1,3</p>	<p>2</p>	<p>3,2</p>	
<p>S 10 <i>Alternaria</i> <i>sp.</i></p>	<p>1,7</p>	<p>3,2</p>	<p>4,3</p>	<p>4,5</p>	
<p>S 45 <i>Aspergillus</i> <i>sp.</i></p>	<p>1</p>	<p>2.8</p>	<p>3.35</p>	<p>3.8</p>	

Les souches fortement estirasiques					
S 08 <i>Alternaria</i> sp.	2	3	3,6	4,4	
S 47 <i>Alternaria</i> sp.	1	1,9	2,4	3	
S 46 <i>Aspergillus</i> sp.	1	1.6	1.9	2.3	

Les résultats obtenus révèlent une activité lipolytique des moisissures testés, traduite par la dégradation de lipide (**Fig. 48, 49**). Cette activité est plus importante chez les souches d'*Alternaria* sp., et d'*Aspergillus* sp. autour de laquelle une zone de dégradation de 4,4 cm, 3 cm, 2.3 cm respectivement a été observée avec des cristaux visible a l'œil nu. Les autres souches sont également capables de dégrader la matière grasse présente dans le milieu de culture en développant une zone de dégradation moyenne entre 3,2 cm à 4,5 cm de diamètre. Ces souches ont une activité moins importante par rapport aux autres.

L'activité estérasiques (dégradation de lipase) est mise en évidence chez toutes les souches fongiques testées et plus particulièrement chez les souches mentionnés ci-dessus cela pourrait être due à la capacité de ces genres à produire plus d'enzymes extracellulaires. Ces isolats ont montré une activité lipolytique par l'apparition d'un précipité visible, résultant du dépôt des cristaux du sel de calcium qui sont formé par la libération des acides gras par les lipases (**Guessas *et al.*, 2012**). Par contre les autres souches sont développées sur milieu à base de tween mais sans formation des précipitations, donc se sont des souches produisant une lipase intracellulaire (**Maria *et al.*, 2005**).

# Conclusion

---

## Conclusion

Le rejet des déchets liquides (margines) des industries productrices d'huile d'olives est un problème majeur surtout pour les pays du bassin méditerranéen du fait qu'elles renferment une fraction organique importante qui provoquent plusieurs types de pollution.

A l'issue de notre travail, concernant l'étude physico-chimique et microbiologique des margines de trois régions afin de déterminer leurs degrés de pollution et d'étudier leur biodiversité fongique en isolant des moisissures qui peuvent être utiles les résultats obtenues pour les régions de Bejaia ; Boumerdès et Tizi-Ouazou respectivement signent qu'ils ont un effluent très acide ( 4.52 , 4,43, et 4.61) salin ( 13 ms•cm<sup>-1</sup>, 15 ms•cm<sup>-1</sup> et 14 ms•cm<sup>-1</sup>) et beaucoup chargé en matières organiques exprimée par la DBO<sub>5</sub>, la DCO et le spectre infrarouge et en polyphénols totaux et sont également riche en MES ( 22 g.l<sup>-1</sup>, 18 g.l<sup>-1</sup> et 15 g.l<sup>-1</sup>) et en MM ( 12 g.l<sup>-1</sup>, 9 g.l<sup>-1</sup> et 7 g.l<sup>-1</sup>) et MVS ( 10 g.l<sup>-1</sup>, 9 g.l<sup>-1</sup> et 8 g.l<sup>-1</sup>) .

L'activité et la croissance des micro-organismes est probablement altérée par la présence de forte teneur en composés phénoliques. L'étude microbiologique de nos margines a révélé que ce rejet renferme une charge microbienne importante par rapport aux autres effluents industriels prédominé par un taux considérable des moisissures (2 10<sup>3</sup> UFC.ml<sup>-1</sup>, 3 10<sup>3</sup> UFC.ml<sup>-1</sup> et 3 10<sup>3</sup> UFC.ml<sup>-1</sup>). Et des levures (3 10<sup>3</sup> UFC.ml<sup>-1</sup>, 5 10<sup>3</sup> UFC.ml<sup>-1</sup> et 6 10<sup>4</sup> UFC.ml<sup>-1</sup>) dans les margines de trois régions et semblent être les mieux adaptées à l'acidité, la salinité et la toxicité de cet effluent. la FMAT (1,25 10<sup>5</sup> UFC.ml<sup>-1</sup>, 1,45 10<sup>5</sup> et 3,8 10<sup>5</sup>) et les bactéries lactiques sont présentes dans les régions de Tizi-Ouazou et Boumerdès (1,87 10<sup>4</sup> UFC.ml<sup>-1</sup> et 3,2 10<sup>4</sup> UFC.ml<sup>-1</sup>) et sont totalement absentes dans les margines de Bejaia. Nous avons pu montrer également l'absence totale des germes fécaux (coliformes fécaux et coliformes totaux) et pathogènes (salmonelles et staphylocoques) dans les margines de toutes les régions. De ce fait les margines étudiées, ne présentera probablement pas de problèmes sanitaire et hygiénique majeurs sur les milieux récepteurs.

L'aspect important de ce travail réside dans l'identification des micro-organismes isolés des margines notamment les champignons filamenteux mésophiles. L'étude de la biodiversité de ces derniers dans nos échantillons de margines (55 souches répartie en 13 genre), confirme la richesse de cet effluent par des genres fongiques dont certains présentent un intérêt biotechnologique déjà mentionné dans la bibliographie (*Métarhizium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Alternaria*...).

## Conclusion

---

La croissance des moisissures isolés des margines sur le milieu lipidique comme sources de carbone a révélé que les espèces: *Alternaria sp* .et *Aspergillus sp* sont les souches les plus performantes dans l'assimilation des composés lipidiques grâce à leur équipement enzymatique.

La variabilité des résultats obtenus à partir des échantillons de margines est due essentiellement a une différence de nature géographique et climatiques de chaque région étudiée. Ainsi que la qualité de la méthode utilisée dans le procédé d'extraction d'huile d'olive qui représente l'élément le plus important , ainsi que la stade de maturation des olives, la variété des oliviers, des systèmes de culture et la méthode et le temps de stockage des olives avant la trituration dans les bassins couverts ou les piscines(Temps de décantation).

L'ensemble des résultats obtenues dans cette étude ne constitue qu'une ébauche dans la valorisation des margines. Toutefois, il serait intéressant de compléter ce travail par :

- L'identification moléculaire des souches fongiques.
- Recherche des champignons filamenteux thermophiles
- Etendre la recherche de la biodiversité aux levures et aux bactéries
- L'évaluation de l'activité antimicrobienne des margines vis-à-vis des bactéries et des champignons pathogènes et définir leur mode d'action, et même de la confirmer par sa mise en évidence in vivo.
- Optimisation des conditions de culture des moisissures lipolytiques (l'agitation, l'aération, la charge de l'inoculum, la concentration en margine, ...).
- En ce qui concerne la teneur en matière minérale des margines et leur richesse en sucre totaux, nous suggérons leur utilisation comme supplément minéral ou énergétique avec d'autres matrices fourragères en blocs multi-nutritionnels.
- Valorisation, après extraction et purification, les composés phénoliques des margines dans la récupération d'énergie perdue par méthanisation, et prévoir un procédé biotechnologique pour le conditionnement de ces substances bioactives afin de les introduire en alimentation animale.
- Purification et caractérisation (chimique et moléculaire) de l'enzyme lipolytique des ces moisissures
- Optimisation de la production des enzyme.
- Exploitation de la biodiversité enzymatique de souches fongiques identifiées (cellulases, amylases....)

## Référence bibliographiques

---

(A)

**Abe C.A.L., Faria C.B., de Castro .F., de Souza S.R., Santos F.C., da Silva C.N., Tessmann D.J. and Barbosa-Tessmann I.P.2015.**Fungi isolated from maize (*Zea mays* L.) grains and production of associated enzyme activities. *Int. J. Mol. Sci.*, 16: 15328–15346.

**Achak A., Ouazzani N., Yaacoubi A et Mandi L. 2008.** Caractérisation des margines issues d'une huilerie moderne et essai de leur traitement par coagulation-floculation par la chaux et le sulfate d'aluminium. *Rev. Sci. Eau.* 21: 53-57.

**Achak M., Hafidi A., Ouazzani N., Sayadi S et Mandi L .2009.** Low cost biosorbent "banana peel" for the removal of phenolic compounds from olive mill wastewater: Kinetic and equilibrium studies. *Journal of Hazardous Materials.*166: 117–125.

**Achak M., Ouazzani N., Yaakoubi A et Mandi L .2008.** Modern olive mill effluent characterization and their treatment by couagulation-floculation using lime and alumunium sulfate. *Revue des sciences de l'eau.* 21 : 53-67 .

**AFNOR .2004.** Sciences Appliquées Agro-alimentaire, Agronomie, Agriculture

**AFNOR.1983.** Recueil de normes françaises : eau, méthodes d'essai, 2e Édition, Paris, France, 621 p.

**Aggelis G ., Margariti N., Kralli C. et Flouri F. 2000 .** Growth of *Candida boidinii* on methanol and the activity of methanol-degrading enzymes as affected from formaldehyde and methylformate. *J. Biotechnol.* 80(2):119-25.

**Aggoun-Arhab .M .2016.** Caractérisation de la composition en micro constituants des margines issues de la production oléicole et utilisabilité comme complément dans la ration chez la vache laitière. Thèse de doctorat. Université Frères Mentouri Constantine, 10-42p.

**Aissam H., Errachidi F., Merzouki M et Benlemlih M .2002.**Identification des levures isolées des margines et étude de leur activité catalase. *Cahiers de l'Association Scientifique Européenne pour l'eau et la Santé.*7: 23-30.

**Aissam H., Penninckx M et Benlemlih M.2007.** Reduction of phenolics content and COD in olive oil mill wastewaters by indigenous yeasts and fungi. *World. J. Microbiol Biotechnol.* 23: 1203-1208.

## Référence bibliographiques

---

- Aissam H.2003.**Etude de la biodégradation des effluents des huileries (margines) et leur .  
thèse de doctorat, Faculté des sciences, Dhar El Mehraz, Fes.
- Akar T., Tosun I., Kaynak Z., Ozkara E., Yeni O., Sahin EN et Akar ST .2009.** An attractive agro-industrial by-product in environmental cleanup: Dye biosorption potential of untreated olive pomace. *J Hazard Mater.*166: 1217-1225.
- Alloue M., Aldric J.M., Destain J., Boutahir Y et Thonart P. 2005.** Traitement biologique d'un effluent de l'industrie des olives. *La Tribune de l'eau.* 58(636): 37-43.
- Alloue W ., Aguedo M., Destaine J et Ghalfi H. 2008.** Les lipases immobilisees et leurs applications. *Biotechnologie ,Agronomie , Societe et environnement ;* 12 (1) 57-68.
- Al-Malah K., Azzam M et Abu-Lail NI .2000.**Olive mills effluent (OME) wastewater post-treatment using activated clay, *Separation and Purification Technology.*20: 225-234.
- Amic A et Dalmasso C.2013.** Unité de valorisation complète de déchets oléicoles par lombric compostage : Production de produits à haute valeur ajoutée : lombricompost, savon, collagène et lombrics. Mémoire de mastère. Université Aix-Marseille (AMU). Faculté des sciences et techniques Saint-Jérôme, 32p.
- AOAC., 1975.** Official methods of anlysis. Association of Agricultural Chemists, 2<sup>nd</sup> ed, Washington D.C.832 p
- Aouadi A.2012.** Impact de contenu phénolique extrait de margine issues de deux modes de trituration sur la méthanogènes ruminale in vitro. Université de Tébessa, 4-5p.
- Apariclo R. and Harwood J., 2013.** Handbook of Olive Oil, Analysis and Properties. Second Edition, P: 772.
- Arda Y., Nazli B. P et Semra Y .T.2010.** Performance evaluation on the treatment of olive mill waste water in vertical subsurface flow constructed wetlands. *Desalination.* 262: 209-214.
- Asehraou A., Faid M et Akhartouf R.1993.** Pure culture fermentation of green olives by lactobacilli strains. *Microbiologie-Aliments-Nutrition.*11: 221-228.
- Assas N., Ayed L, Marouani L, Hamdi M.2002.** Decolorization of fresh and stored and stored-black olive mill wastewaters by *Geotrichum candidum*. *Process Biochemistry* 38:361–365.

## Référence bibliographiques

---

**Asses N., Ayed L., Bouallagui H., Sayadi et Hamdi M .2009.** Biodegradation of different molecular-mass polyphenols derived from olive mill wastewaters by *Geotrichum candidum*. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 63: 407–413. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2008.11.005>.

**Avril J.L., Dabernat H., Denis Fet Monteil H.1992.** Bacteriologie clinique. 2éme Ed, Paris 9\_149.

**Azbar N., Keskin T et Catalaya E .2008.** Improvement in anaérobic degradation of olive mill effluent by chemical pretreatment using batch systes. *Biochemical engineering journal* .38 : 379-383.

### (B)

**Bataiche I. 2014.** Recherche de nouvelles potentialités de *Yarrowia lipolytica*, isolé de différents milieux naturels pour des applications biologiques. Thèse de doctorat. Université Constantine, 4-5-40p.

**Benabid H.2009.** Caractérisation de l'huile d'olive Algérienne, Apport des méthodes chémiométriques. Thèse de doctorat. Université De Mentouri Constantine ,245p.

**Benlemlih M et Ghanam J.2012.** Polyphénols d'huile d'olive trésors santé. *Medicatrix*.128p.

**Benrachou N., 2013.** Etude des caractéristiques physicochimiques et de la composition biochimique d'huiles d'olive issues de trois cultivars de l'Est Algérien. Thèse de doctorat, Université Badjaia Mokhtar Annaba, 112p.

**Benrouina B , S Bedbabis , M Boukhris et G Ferrara.2014.** Effects of orrigation with treated wastwater on soil chemical properties and infiltration rate. *Journal of environmental management* , 133; 45-50.

**Ben-Sassi A., Ouazzani N., Walker G.M., Ibsouda S., El-Mzibri M et Boussaid A .2008.** Detoxification of olive mill wastewaters by Moroccan yeast isolates *Yeast* .Springer-Verlag.19: 337–346. <http://dx.doi.org/10.1007/s10532-007-9140-8>.

**Benyahia N et Zein K .2003.** Analyse des problèmes de l'industrie de l'huile d'olive et solutions récemment développées. Contribution spéciale de Sustainable Business Associates, Suisse.

**Bleve G., Lezzi C., Chiriatti M.A., D'Ostuni I., Tristezza M., Venere D., Sergio L., Mita G ., Grieco F .2011.** Selection of non-conventional yeasts and their use in immobilized form

## Référence bibliographiques

---

for the bioremediation of olive oil mill wastewaters. *Bioresour Technol.* 102 : 982–989.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.09.059>.

**Blika p.s., Stamatelatou K., Kornaros M et Lyberato G. 2009.** Anaerobic digestion of olive mill wastewater. *Global N est Journal.* 11 (3) : 364-372.

**Borja R., Banks C.J. et Alba J. 1995.** A simplified method for determination of kinetic parameters to describe the aerobic biodegradation of two important phenolic constituents of olive mill wastewater treatment by a heterogeneous microbial culture. *Environ. Sci. Health*

**Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy P. H., Larpent J. P., Reymond P., Sanglier J. J., Vayssier Y. et Veau P. 1990.** Moisissures utiles et nuisibles d'importance industrielle. 2<sup>ème</sup> édition, Masson, Collection Biotechnologies, Paris, 34-381p.

**Boudoukhana H. 2008.** Impacts des margines sur les eaux de oued Bouchtata (Wilaya de Skikda). Mémoire de Magister en pollution chimique et environnement. Université 20 Août 1955 Skikda, 23 -101p.

**Bourgeois C. N., Mescmle J. F. et Zucca J. 1996.** Microbiologie alimentaire. Tome 1 « Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments ». Edition Technique et Documentation Lavoisier, Paris, 672 p.

**Bourgeois C.M. et Leverau J.Y.1980.** Technique d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaire. Tome 3. Contrôle microbiologique. Edition technique et documentation. Lavoisier . Paris.

**Boutkhil S. 2012.** Les principales maladies fongiques de l'olivier ( *Olea europea L.*) en Algérie : répartition géographique et importance. Mémoire de Magister en Biotechnologie Université d 'Oran Es- Senia .

**Brahimi S. 2015.** Isolement et caractérisation biotechnologiques des bactéries lactiques isolées à partir des margines d'olive «AMOREDJ» fermentés. Mémoire de Magister. Université D'Oran 1 Ahmed Ben Bella, 172p

**Bugnicourt. 1995.** Dictionnaire de microbiologie générale. Edition Ellipses Marketing, Paris, 991 p.

(C)

**Cai G., Gale L.R., Schneider R.W., Kistler H.C., Davis R.M., Elias K.S et Miyao E.M.2003.** Origin of race 3 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* at a single site in California. *Phytopathology*, 93: 1014–1022.

## Référence bibliographiques

---

**Capasso R., De Martino A et Arienzo M. 2002.** Recovery and characterization of the metal polymeric organic fraction (polymerin) from olive oil mill wastewaters. *Journal Agrical Food Chemistry*. 50: 2846-55.

**Capasso R.1997.** The chemistry, biotechnology and ecotoxicology of the polyphenols naturally occurring in vegetable wastes. *Current Tropical Phytochemistry, Resesrtsh Trends*, 1,145-156.

**Caputo M.C., De Girolamo A.M et Volpe A .2013.** Soil Amendment with Olive Mill Wastes: Impact on Ground Water. *Journal of Environmental Management*.131: 216-221.

**Casas- Godoy L ., Duquesne S., Bordes F., Sandoval G et Marty A. 2012.** Lipases and Phospholipases: Methods and Protocols. *Meth. Mol. Bio*. 861.

**Celine I., Justino L., Pereira R., Ana C., Freitas Teresa A., Rocha-Santos.P., Teresa S. L. Panteleitchouk ., Armando C et Duarte.2012.** Olive oil mill wastewaters before and after treatment: a critical review from the ecotoxicological point of view. *Ecotoxilogy*. 21 : 615-629.

**Chaâri L., Elloumi N., Mseddi S., Gargouri K., Ben Rouina B., Mechichi T. and Kallel, M.2015.** Changes in Soil Macronutrients after a Long-Term Application of Olive Mill Wastewater. *Journal of Agricultural Chemistry and Environment*, 4, 1-13.

**Chabasse D., Bouchara J.P., de Gentile L., Brun S., Cimon B et Penn P. 2002.** Les moisissures d'intérêt médical. *Cahier de formation biologie médicale. Cahier de Formation Bi*  
Characterization of olive mill wastewater (alpechin) and its sludge for agricultural purposes.

**Chouchene A .2010.** Etude expérimentale et théorique de procédés de valorisation de sous-produits oléicoles par voies thermique et physico-chimique. Thèse de Doctorat de Génie Energétique-Génie des Procédés. Université de Haute-Alsace, France, 8- 10- 15p.

**Civantos L. 2008.** La olivicultura en el mundo y en España. In ; barranco D. Fernandez-Escobar R. Rallo L eds *El cultivo del olivo*. 6th edn. Junta de Andalucía and Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, 17-35p.

**COI .2005.** Conseil Oléicole International Amélioration de la qualité de l'huile d'olives. Madrid-Espagne, 10p. 79, 393-398.

**COI. « CONSEIL OLEICOLE INTERNATIONAL ».2017.** L'actualité du secteur sur *Olive News, la revue de presse du COI* : <http://www.scoop.it/t/olivenews>.

## Référence bibliographiques

---

(D)

- Daâssi D., Lozano-Sánchez J, Borrás-Linares I, Belbahri L, Woodward S, Zouari-Mechichi H., Mechichi T, Nasri M. et Segura-Carretero A.2014.** Olive oil mill wastewaters: Phenolic content characterization during degradation by *Coriolopsis gallica*. *Chemosphere*.113: 62–70.
- DSASI, (2015).** Série B, direction des statistiques agricoles et des systèmes d’information. Ministère de l’Agriculture, de Développement Rural et de la Pêche.
- De Felice B., Pontecorvo G et Carfagna, M. 1997.** Concentration of polyphénols from olive mill wastewaters by integrated membrane system. *Acta Biotechnol*.17: 231.
- Delarras C. 2007.** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire. Hanafi F., Sadif N., Assobhei O., Mountadar M., *Revue Des Sciences De L'eau / Journal of Water Science*.22: 473.
- Dermeche S, Nadour M, Larroche C, Moulti-Mati F et Michaud P .2013.** Olive mill wastes: Biochemical characterizations and valorization strategies. *Process Biochemistry*.48: 1532-1552.
- Di Bene C., Pellegrino E., Debolini M., Silvestri N and Bonari E. 2013.** Short- and Long-Term Effects of Olive Mill Wastewater Land Spreading on Soil Chemical and Biological Properties. *Soil Biology and Biochemistry*, 56, 21-33.
- Di Serio M.G., Lanza B., Mucciarella M.R., Russi F., Iannucci E., Marfisi P et Madeo A. 2008.** Effects of olive mill wastewater spreading on the physico-chemical and microbiological characteristics of soil. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 62: 403–407.
- Diaz A. 2012.** Olive. Technological innovations in major world oil crops, volume 1; breeding. Chapter 11, 267p.
- Djadoun S. SD.** Influence de l’hexane acidifié sur l’extraction de l’huile de grignon d’olive assistée par micro-ondes. Mémoire de magistère. Université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou. 23p.
- Djennane D., YanguelaY., Derriche F., Bouarab L et Roncales P.2012.**Extrait de feuilles d’olive, tests invitro vis-à-vis de *Staphulococcus aureus*, *Salmonella Enteritidis* et *Pseudomonas aeruginosa* , Application sur la viande de dinde link [springer.com](http://springer.com) ;phytotherapie ; 10(1)10-18.

## Référence bibliographiques

---

**Djouamaa M., Debabsa R et Bouasla S.2008.** Comportement morphologique, physiologique et biochimique de trois variétés de ble dur (*Triticum durum*.desf) sous traitement par un fongicide. (TILT 250EC). D.E.S Biologie et Médecine universitaire de Souk – Ahras ,41p.

**Dommergues J.O.1970.** Ecologie microbienne du sol. Ed. Presse Univ.(Paris). 783P.

**Doues F P et Ito K. 2001.**..Compendium de méthode pour l'examen microbiologique des aliments .4eme ed ,676p.

**Douzane M, Nouani A et Bellal M. 2010.** Influence de la variété. De la campagne oléicole et de la région sur la composition en acides gras de quelques huiles d'olives vierges algériennes. Eur.j.sc.res.46 (3) : 339-351.

**DSA. 2017.** Direction des services agricoles. Bedjaia.

**Dugat M. 2014.** Apport de la spectrométrie de masse et de la biologie moléculaire à l'identification des champignons filamenteuse au laboratoire de mycologie médicale.Thèse de doctorat .7(1), 439p.

### (E)

**El Hachemi C. 2010.** Effet de différents modes de séchage sur la stabilité des qualités nutritionnelles et microbiologiques du grignon d'olive durant 3 mois de stockage. Mémoire de Magister.Université d'Oran Es-Senia. 2p. (manque en science et en option)

**El-Abbassi A., Khayet M et Hafidi A. 2011.** Micellar enhanced ultrafiltration process for the treatment of olive mill wastewater. Water Res. 45: 4522–4530. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2011.05.044>.

**Ergüder TH., Güven E et Demirer GN.2000.** Anaerobic treatment of olive mill wastes in batch reactors. Process Biochemistry. 36: 243-248.

**Eroglu E., Eroglu I., Gunduz et Yucel M.2008.**Effect of clay pretreatment on photofermentative hydrogen production from olive mill wastewater. Bioresource Technology. 99: 6799-6808.

**Eroglu E., Eroglu I., Gunduz U et Yucel M.2009.** Treatment of olive mill wastewater by different physicochemical methods and the utilization of their liquid effluents for biological hydrogen production. Biomass Bioenerg.34: 701–5.

**Esmail A., Abed H., Firdaous M., Chahboun N., Mennane Z., Berny EH et Ouhssine M .2014.** Étude physico-chimique et microbiologique des margines de trois régions du Maroc. (Ouazzane, FèsBoulman et Béni Mellal). J. Mater. Environ. Sci.5:121-126.

## Référence bibliographiques

---

**Esmail A., Chahboun N., Mennane Z., Amiyare R., Abed H., Barrahi M., Qebibo A., Ouhssine M et Berny E.2015.** Étude de l'activité antimicrobienne des margines issues de Fès Boulman vis-à-vis de souches pathogènes. *J.Mater. Environ. Sci.* 6 (3) : 869-876.

### (F)

**Fabbri A ., Lambardi M et Tokatli Y.O .2009.** Breeding plantation tree crops ; tropical species. Chapter 12. Olive breeding.

**Fadil K., Chahlaoui A., Ouahbi A., Zaid A et Borja R.2003.** Aerobic biodegradation and detoxification of wastewaters from the olive oil industry. *International biodeterioration & biodegradation.* 51: 37-41.

**Fakharedine N., El Hajjouji H., Ait Baddi G., Revel J.C. and Hafidi M.2006.** Chemical and spectroscopic analysis of organic matter transformation during aerobic digestion of olive mill wastewaters. *Process Biochemistry,* 41, 398-404.

**Fezzni B et Ben Cheikh R .2009.** Extensions of the biodegradation odel N0.1 (ADM1) to include phenolic compounds biodegradation process for the simulation of anaerobic co-digestion of olive mill wastes at thermophilic temperature. *Journal of Hazardous Materials.* 162:1563-1570.

**Fickers P. , Benetti P-H., Wache Y., Marty A., Maurersberger S et Smit MS.2005.**Hydrophobic substrate utilization by the yeast *yarrownia lypolytica* and its potential applications.*FMS yeast research* 5(6-7), 527-543.

**Fiestas Ros d'Ursinos JA et Borja-Padilla R.1992.** Use and treatment of olive mill wastewater, current situation and prospects in Spain, *Aceites.*43: 101-106.

**Fiestas Ros de Ursinos JA.1981.** Différentes utilisations des margines : recherche en cours, résultats et applications, Séminaire International sur la Valorisation des Sous-produits de l'Olivier PNUD/FAO. Monastir, Tunisie, 93-95.

**Fountoulakis MS., Dokianakis SN., Kornaros ME., Aggelis GG et Lyberatos G.2002.** Removal of phenolics in olive mill wastewaters using the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Water Res.* 36 (19): 4735-44.

### (G)

**G Reboux, A-P Bellanger, S Roussel , F Genouill et .L aurouce . 2010.** Moisissures et habitant risques pour la santé et espèces impliquées . *Revue française d'Allergologie.*50(8) 611-620 .

## Référence bibliographiques

---

- G Sbai et Loukili .2015.** Traitement des margines par un procédé conplant lacoagulation floculation et la voie electrochimique. European Scientifique journal ; ESJ 11(9)
- Galanakis C. M., Tornberg E et Gekas V .2010.** A study of the recovery of dietary fibres from olive mill wastewater and the gelling ability of the soluble fibre fraction. Food Science and Technologie.43:1009-1017.
- Garcia-Castello E ., Cassano A., Criscuoli A et Conidi C et Drioli E. 2010.** Recovery and concentration of polyphénols from olive mill wastewaters by integrated membrane system. Water research .44: 3883-3892.
- Garcia-Verdugo C., Forrest A.D., Balaguer L., Fay M.C et Vargas P.2009.** Parallel evolution of insular *Olea europea* subspecies based on geographical structuring of plastid DNA variation and phenotypic similarity in leaf traits. Bot. J. Linn. Soc . 162 : 54-63.
- Gelegenis J., Georgakakis D., AngelidakiIrini ., Christopoulou N., Goumenaki M. 2007.** Optimization of biogas production from olive-oil mill wastewater, by codigesting with diluted poultry-manure. Applied Energy. 84 : 646–663.
- Georgantelis D., Ambrosiadis I., Katikou P., Blekas G et Georgakis S.A.2007.** Effect of rosemary extract, chitosan and  $\alpha$ -tocopherol on microbiological parameters and lipid oxidation of fresh pork sausages stored at 4 °C. Meat Science. 76: 172-18
- Ghedira. K. 2008.** L'olivier. Phytotherapie. springer. 6 : 83-89.
- Ghezlaoui M .2012.** Influence de la variété, Nature du sol et les conditions climatiques sur la qualité des huiles d'olives des variétés Chemlal, Segoise et Oléastre dans la Wilaya de Tlemcen. Mémoire de Magister, Université Tlemcen, 213p.
- Gigon F et le Jeune R. 2010.** Huile d'olive, *Olea europea L.* phytothérapie. Springer-Verlag. France, 8 : 129-135.
- Gnagne ., Brissaud et Zerhouni.2003.** Caractérisation physico-chimique des eaux usées de la ville d'Azilal-Maroc-[Physico-chemical characterization of wastewater from Azilal city-Morocco-]. Innovative Space of Scientific Research Journals. 11: 556-566.
- Gonçalves C., Lopes M., Ferreira J. P et Belo I .2009.** Biological treatment of olive mill wastewater by non-conventional yeasts. Bioresource Technolog.100: 3759–3763.

## Référence bibliographiques

---

**Goncalves C., Pereira C., Belo I. 2010.** Comparison of batch and fed-batch lipase production from olive mill wastewater by *Yarrowia lipolytica* and *Candida cylindracea*. *J Biotechnol*, 150 S: S1–576.

**Guessas L. 2012.** Backstepping adaptatif pour le contrôle la poursuite et la synchronisation des systèmes dynamiques non linéaires chaotique. Thèse de doctorat. université de Biskra. 45P.

**Guiraud et Rosec. 2004.** *Pratique Des Normes En Microbiologie Alimentaire*, 300 p

**Guiraud J.P et Gazly P. 1980.** *L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires.* Les éditions de l'usine nouvelle. 239p.

**Guiraud J.P. 1998.** *Microbiologie alimentaire. Techniques d'analyse microbiologiques* 1ère ED, Dunod. Paris. 136-144p.

**Guiraud, 2003 :** Méthode d'analyse en microbiologie alimentaire. In : *Microbiologie alimentaire.* Tech et Doc . Dunod. Paris. 90-292p.

### (H)

**Hachicha R., Hachicha S., Trabelsi I., Steve Woodward B et Mechichi T . 2009.** Evolution of the fatty fraction during co-composting of olive oil industry wastes with animal manure: Maturity assessment of the end product. *Chemosphere*. 75 :1382-1386.

**Haddam M., Chimi H., el-antari A., Zahhouily M., Nouhibi R., Zaz A., Ibrahimi M et Amine A. 2014.** Caractérisation physico-chimique et stabilité oxydative des huiles d'olive des variétés picholine marocaine, haouzia, koroneiki et arbequine de la région oleicole centrale du Maroc (Chaoui-Ouadddigha). *Olivae ; journal officiel du conseil oleicole international*. 23-35p.

**Hamdi M. 1992.** Toxicity and biodegradability of olive mill wastewater's in batch anaerobic digestion. *Appl. Biotechnol*. 2155- 163.

**Hamdi M. 1993.** Valorisation et épuration des effluents des huileries d'olive : l'utilité de la microbiologie industrielle. *Olivae*. 46: 20-24.

**Hamdi M., Garcia J.L. 1991.** Comparison between anaerobic filter and anaerobic contact of olive mill wastewaters. *Appl. Microbial. Rev.*, 13 :125-135.

**Hamdi M. 1991.** Nouvelle conception d'un procédé de dépollution biologique des effluents liquides de l'extraction de l'huile d'olive. Thèse de doctorat Université de Provence, Aix Marseille, France 75p.

## Référence bibliographiques

---

**Hamdi M.1993.**Future prospects and constraints of olive mill wastewaters use and treatment, A review Bioproc. Eng. 8: 209-214.

**Hanafi F ., Sadif N., Assobhei O et Mountadar M .2009.** Traitement des margines par électrocoagulation avec des électrodes plates en aluminium. Revue des sciences de l'eau. 22: 473-485.

**Hanafi F., Sadif N., Assobhei O et Mountadar.2009.** Revue Des Sciences De L'eau / Journal of water Science. 22: 473.

**Hankin L et Angnostakis SL .1975.** The use of solid media for detection of enzyme production by fungi.Mycologia , 597-607.

**Hassan F., Ali Shah A et Hameed .2009.** Biotechnology advance ;27(6), 782-798.

**Hassan F., Ali shah A et Hameed A.2009.**Biotechnology advances; 27(6), 782-798.

### (I)

**Iboukhouléf H .2014.** Traitement des margines des huileries d'olive par les procédés d'oxydation avancée basés sur le système Fenton-like (H<sub>2</sub> O<sub>2</sub> / Cu). Thèse de doctorat Université Mouloud Mammri Tizi-Ouazou.In : <http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/p/41349.pdf>

**ISO 4833-2 .2013.** Microbiologie de la chaine alimentaire- Méthode horizontale pour le dénombrement des micro-organismes partie 2 : Comptage des colonies à 30 degrés C par la technique d'ensemencement en surface.

**ISO 6888-1 .1999.** Microbiologie des aliments- Méthodes horizontale pour le dénombrement des staphylocoques à coagulation positive (*Staphylococcus aureus* et autres espèces)- partie 1 : Techniques utilisant le milieu gélosé de Baird-Parker.

### (J)

**Jail A., Boukhoubza F., Nejmeddine A., Sayadi S et Hassani L. 2010.** Co-treatment of olive-mill and urban wastewaters by experimental stabilization ponds. Journal of Hazardous Materials. 176: 893–900.

**Jarrar H.2011.** Bioélectrodes enzymatiques pour des applications en biocapteurs et en biopiles. *Thèse de doctorat.* Ecole nationale supérieure de chimie de Montpellier.

## Référence bibliographiques

---

**Joyeux .H.,Benlemlih M,Ghanam J,SD.** Polyphenols d'huile d'olive trésors de santé médicatrice .2<sup>ème</sup> Ed,88-91p.

### (K)

**Kadereit W et Bresinsky A .2013.** Systematics and phylogeny. Strasburgers plant sciences. Springer-verlag berlin Heidelberg. 655-1037.

**Kapellakis I.E., Tsagarakis K.P et Crowther J.C .2008.** Olive oil history, production and by-product management. Reviews in Environmental Science and Biotechnology.7:1-26.

**Karpoozas DG., Ntougias S., Iskidou E et Rousidou C.2010.** Olive mill wastewater effects the structure of soil bacterial communities. Applied soil ecology ; (45)2 , 101-111.

**Kavadias V., Doulaa M.K., Komnitsas K et Liakopoulou N .2010.** Disposal of olive oil mill wastes in evaporation ponds: Effects on soil properties. Journal of Hazardous Materials. 182:144–155.

**Korpinen S., Meski L et Maria J H.2012.** Laaman. Human pressures and their potential impact on the Baltic Sea ecosystem. Ecological Indicators 15(1), 105-114, Science direct.com

**Koutrotsios G et Zervakis G.I .2014.** Comparative examination of the olive mill wastewater biodegradation process by various wood-rot macro fungi. Bio Med Research International, Article ID 482937 .14 .

### (L)

**Labdaoui D., HadjSmaha D., Larid M. and Gomez A. C. 2016.** The impact on the adoption of an olive extraction technique with a continuous Two- phases systems without pollution: Cas of study in two Mediterranean region, Bouira in Algeria and Cordoba in Spain. Jornal App.Biol.Sci 6(11): 56-62.

**Lafka T., Lazou A.E., Sinanoglou V. J et Lazos E. S .2011.** Phenolic and antioxidant potential of olive oil mill wastes. Food Chemistry.125: 92–98.

**Lakhtar H., Ismaili-Alaoui M., Philippoussis A., Perraud-Gaime I et Roussos S.2010.** Screening of strains of *Lentinula edodes* grown on model olive mill wastewater in solid and liquid state culture for polyphenol biodegradation. International Biodeterioration and Biodegradation. 64: 167–172.

**Lakrari K. 2013.** Contribution aux études de traitement et valorisation des huiles végétales d'intérêt écologique. Thèse de doctorat. Faculté des sciences-Rabat.

## Référence bibliographiques

---

**Lamrani K .2009.**Etude de la biodiversité des moisissures nuisibles et utiles isolées à partir des Maâsra du Maroc. Thèse de doctorat. Faculté des Sciences, université Mohamed V-AGDAL. Maroc, 6-7- 8p.

**Larif M., Zarrouk A., Soulaymani A et Elmidaoui A .2013.** New innovation in order to recover the polyphenols of olive mill wastewater extracts for use as a biopesticide against the *Euphyllura olivina* and *Aphis citricola*. Res. Chem. Intermed. 39 : 4303–4313.  
<http://dx.doi.org/10.1007/s11164-012-0947-5>.

**Lebres. 2002.** Manuel des travaux pratiques, cours national d'hygiène et de

**Leroy I. 2011.** L'huile d'olive dans tous ses états. Thèse de Doctorat d'Etat. Univ Lille 2, France ,143p.

**Leulmi N. 2011.** La valorisation nutritionnelle des margines et de leur impact sur la réduction de la méthanogénèse ruminale chez l'ovin. Mémoire de Magistères en Microbiologie appliquée. Université Mentouri Constantine ,100p.

**Levi-Minzi R., Saviozzi A., Riffaldi R., et Falzo L.1992.** Lo smaltimento in campo delle acque di vegetazione. Effetti sulle proprietà del terreno. *Olivae*. 40: 20-25.

**Linnaeus C.1764.** Species plantarum. 3<sup>rd</sup> edition, De trattner. Vienna.

**Liua C.H., Chena C.Y., Wang Y.W. et Changa J.S. 2011.** Fermentation strategies for the production of lipase by an indigenous isolate *Burkholderia* sp. C20. *Bioch. Eng. J.* 58– 59: 96– 102.

**Loussert M., et Brousse. 1978.** L'olivier. Ed. Moissonneuvre et Larose, Paris. 404p.

**Lykas C., Vagelas I. & Gougoulis N. 2014.** Effect of olive mill wastewater on growth and bulb production of tulip plants infected by bulb diseases. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 12(1), 233-243.

( M)

**M'Sadak Y., Makhoul M. et El Amrouni S. 2015.** Evaluation qualitative et possibilités de valorisation biologique de la biomasse oléicole reprise dans le Sahel Tunisien. *Journal of new sciences*. 18(4): 668-678.

**Mahmoud M ., Janssen M., Haboub N., Nassour A et Lennartz B .2010.** The Impact of Olive Mill Wastewater Application on Flow and Transport Properties in Soils. *Soil and Tillage Research*.107: 36-41.

## Référence bibliographiques

---

**Mahmoud M., Janssen M., Peth S., Horn R. et Lennartz B.2012.** Long-Term Impact of Irrigation with Olive Mill Wastewater on Aggregate Properties in the Top Soil. *Soil and Tillage Research*.124 :24-31.

**Mann M., Ramond P et R Slansky. 2010 .**Complex spiners and unified theories.. *World scientific.com* ;266-272.

**Marco., Lucas., Jose et Peres . 2009.** Removal of COD from olive mill wastewater by Fenton's reagent: Kinetic study ; *journal of hazardous Materials*, 168 : 1253-1259.

**Maria G. L., Sridhar K. R. and Raviraja N. S. 2005.** Antimicrobial and enzyme activity of mangrove endophytic fungi of southwest coast of India. *Journal of Agricultural Technology*. 1: 67-80.

**Mc Namara C.J., Anastasiou C.C., O'Flaherty V et Mitchell R .2008.** Bioremediation of olive mill waste water. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 61:127-134.

**Mechri B., chebab B., Fattia F., B Mariem., Braham M et Hammami M.2010.**Olive mill waste water effects on the microbial communities as studied in the field of olive trees by analysis of fatty acid signatures. *European journal of soil Biologi*; 46(5);312-318.

**Mekki H., Anderson M., Ben Zina M et Ammar E .2008.** Valorization of olive mill waste water by its incorporation in building bricks. *Journal of Hazardous Materials*. 158 : 308–315.

**Metahri M.S. 2012.** Elimination simultanée de la pollution azotée et phosphatée des eaux usées traitées, par des procédés mixtes. Cas de la STEP Est de la ville de Tizi-Ouzou. Thèse de doctorat. Université Mouloud Mammeri. Tizi-Ouzou.148p.

**Meyer A., Deiana J et Bernard A. 2004.** Cours de microbiologie générale avec problèmes et exercices corrigés. Ed, Doin. 423p.

**Millan B., Lucas R., Robles A., García T., Alvarez De Cienfuegos G et Gálvez, A. 2000.** Microbiologie des aliments, unité microbiologie des laits et des produits, laitiers, institut Pasteur d'Algérie.21-27p.

**Millan B., Lucas R., Robles A., García, T., Alvarez De Cienfuegos, G et Gálvez, A.2000.**A study microbiota from olive\_mill wastewater OMW disposal lagoons with emphasis on filamentous fungi and their biodegradative potential.*Microbiol Res*.155: 143-7.

**MM.2011.** Effects of agronomic application of olive mill wastewater in a field of olive trees on carbohydrate profiles, chlorophyll a fluorescence and mineral nutrient content. *Environ Exp Bot*.71 : 184–91.

## Référence bibliographiques

---

**Mokdad F. 2015.** L olivier, l'arbre fétiche de la méditerranée. Journal algérien réflexion. (<http://www.djazairess.com/fr/reflexion/33498>).

**Moraetis D., Stamati F.E., Nikolaidis N.P et Kalogerakis N. 2011.** Olive mill wastewater irrigation of maize: impacts on soil and groundwater. Agric. Water Manag. 98: 1125–1132. <http://dx.doi.org/10.1016/j.agwat.2011.02.006>.

**Morillo J. A., Antizar-Ladislao B., Monteoliva-Sánchez M., Ramos-Cormenzana A et Russell N. J .2009.** Bioremediation and biovalorisation of olive-mill wastes. Applied Microbiology Biotechnology.82: 25–39.

**Mouncif M, Tamoh S, Faid M, Achkari-Begdouri A ( 1993)** A study of chemical and microbiological characteristics of olive mill wastewater in Morocco, Grasas y Aceites, 44 : 335-338.

**Moussaoui R. , Siziani D., Youyou A., Sharrock P et Fiallo M .2010.** Antioxidant effect of phenolic compounds recovered from olive mill wastewater of Chemlal variety cultivated in Kabylia Algeria on the oxidative stability of virginolive oil. Journal of Food, Agriculture & Environment.8 (4): 86-89.

**Moussouni A .2013.** La réalisation d'une étude de faisabilité de nouvelles techniques pour la valorisation des déchets dans le secteur agroalimentaire au Maghreb, sous-secteur : huile d'olives. Reme. Algérie.

**Mundt JO .1970.** Lactic acid bacteria associated with raw plant food material. J. Milk Technol .33: 550-553.

**Murphy C. 2014.** Olives ; origins and development. institute of archeology, university college London, uk, c.smith ed ,encyclopedia of global archeology.

(N)

**Nadour M., Moulti-Mati F., Michaud P et Larroche C.2012.** Composition, structure, and valorisation of fibres from olive fruit and by-products. Agr. Food Industry. 23(6): 1340-1343.

**Nagaraja TG et Devkar PG.2010.**sasoanal occurrence of endophytic mycoflora of inner bark of medicinal plant Acacia catechu willd .Bioscan ; 5 , 243-5.

**NF EN 12880 Novembre 2000.** Caractérisation des boues- Détermination de la teneur en matière sèche et de la teneur en eau.

## Référence bibliographiques

---

**NF T90-105-2 Janvier 1997.** Qualité de l'eau- Dosage des matières en suspension- Méthode par centrifugation

**NM 08. 124 .2012.**Microbiologie des aliments : Dénombrement des coliformes thermotolérants par comptage des colonies obtenues à 44°C.

**NM ISO 15214-2007 :** Microbiologie des aliments-Méthode horizontale pour le dénombrement des bactéries lactiques mésophiles- techniques par comptage des colonies à 30°C ; (IC 08.0. 160) 11p

**Ntougias S., Bourtzis K et Tsiamis G .2013.** The microbiology of olive mill wastes. Biomed. Res. Int.1–16. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/784591>.

(O)

**Obeid H.k., Bedgood JR., Prenzler P.D et Robards K.2007.** Bioscreening of australian olive mill waste extracts : Biophenol content , antioxidant antimicrobial and molluscicidal activities .Food Chem.Tox.45 : 1238-1248.

**Obied H., Allen M., Bedgood D., Prenzler P., Robards K et Stockmann R .2005.** Bioactivity and analysis of biophenols recovered from olive mill waste, Journal of Agricultural Food Chemistr.53: 823-837.

**Obradors N., Montesinos J.L et Valero F.1993.** Effect of different fatty acids in lipase production by *Candida rugosa*. Biotech.letters. 15 :357-360.

**Ochando P., Javier M., Fragoso ., Rita M et Antónia . 2016.** A Brief Review on Recent Processes for the Treatment of Olive Mill Effluents. In: Products from Olive Tree. University of Granada. Spain, 284-300p.

**ONFAA.2016.** Observatoire National des Filières Agricole et Agroalimentaire.

**Ouabou E., Anouar A et Hilali S. 2014.**Traitement de la margine brute d'huile d'olive par distillation suivie de neutralisation par la chaux.Journal of applied biosciences ; 79(1), 6867-6872.

**Ouazzani N. 2012.** Valorisation des sous- produits de l'olivier pour une oléiculture durable respectueuse de l'environnement. Pole de compétence pour le développement et la promotion de la filière oléicole. p 1.

## Référence bibliographiques

---

**Ouzounidou G., Zervakis G.I et Gaitis F .2010.** Raw and microbiologically detoxified olive mill waste and their impact on plant growth. *Terrestrial and Aquatic Environmental Toxicology*.4: 21-38.

### (P)

**Parades C., Bernai M.P., Cegarra J., Roig A. 2002.** Bio-degradation of olive mill wastewater sludge by its co-composting with agricultural wastes. *Bioresource Technology* 85: 1-8.

**Parades C., Cegarra J., Bernai, M.P., Roig A. 2005.** Influence of olive mill wastewater in composting and impact of the compost on a Swiss chard crop and soil properties. *Environment International*, 31: 305-312.

**Parades C., Cegarra J., Roig A, Sanchez-Monedero M.A., Bernai M.P. 1999.** Characterization of olive mill wastewater (alpechin) and its sludge for agricultural purposes. *Bioresource Technol.* 67: 11-115.

**Paredes C., Cegarra, J., Bernal M.P et Roig A. 2005.** oxidation of fresh pork sausages stored at 4 °C. *Meat Science.* 76: 172-181.

**Pilet CH., Bourdon J-L., Toma B., Marchal N., Balbastre C., 1979.** Bactériologie médicale et vétérinaire - systématique bactérienne, 2ème édition. Doin éditeurs. 437 p.

**Pitt J. I. 1979.** The genus *Penicillium* and its teleomorphic states : *Eupenicillium* and *Talaromyces*. Academic Press, London, New York, Toronto, San Francisco, Sidney. 634p.

**Pitt, J.I. 1988.** A laboratory guide to common *Penicillium* species (2nd ed.). Commonw Scientif Ind Research Organisation, North Ride Australia, 197p.

### (R)

**Rakotoniriana EF., Munaut F., Decock C et Randriamampionona D.2008.**Endophytic fungi from leaves of centella asiatica : occurrence and potential interactions within leaves.*Antonie van leeuwenhoek*; 93(1-2), 27-36.

**Ramos-Coenzana A., juirez-jimCnez B et Garcia-Pareja. M.P.1996.**antimicrobial activity of olive mill wastewater (Alpechin) and biotransformed olive oil Mill Wastewater. *Journal of agrical Food Chemistry.* 58-67.

**Ranalli A. 1991.** L'effluent des huileries d'olive : Propositions en vue de son épuration. Références aux normes italiennes en la matière. Première partie. *Olivae*, 37-30-39p.

**Rappily F.1968.** les techniques de mycologie en pathologie vegetale .Ann . Epiphyt. 101 p.

## Référence bibliographiques

---

**Rigo E., Ninow J.L., Luccio M., Oliveira J.V., Polloni A.E., Remonato D., Arbter F., Vardanega R., Oliveira D. et Treichel H. 2010.** Lipase production by solid fermentation of soybean meal with different supplements. Food Sci. Techn. 43: 1132-1137.

**Rizoun L. 2012.** Situation environnementale de l'industrie oléicole en Algérie. Conférence Athènes. Source. <http://www.h2020.net/fr/library/publications/finish/161/1134.html>

**Rodier J. 1984.** L'analyse de l'eau : eaux naturelles, eaux résiduaires, eau de mer, 7e édition : Dunod, Bordas, Paris, France, 1365p.

**Rodier J., Legube B et Merlet N. 2009.** L'analyse de l'eau 9ème Ed., DUNOD. Paris, 1525p.

**Rodier J. 1996.** L'analyse de l'eau : eaux naturelles, eaux résiduaires, eaux de mer. Huitième édition DUNOD Paris, pp 1384.

**Romo-Sanchez S., Alves-Baffi M., Arévala villena M et Ubeda-Iranzo J. 2010.** Yeast Biodiversity from oleic ecosystems :study of their bioyechnological proprties. Food microbiology of their . 27(4), 487-492

**Rugini E., De pace C., Gutierrez-Pesce P et Muelo R. 2011.** Olea. In; wild crop relatives; genomic and breeding resources, temperate fruits, chittaranjan kole ed.springer.79-114.

(S)

**Saad D. 2009.** Etude des endomycorhizes de la variété sigoise dolivier (olea europea L) et essai de leur application a des boutures semi-ligneuses. Mémoire de magister universite doran. 98p.

**Sahli Z. 2009.** Le développement local durable des pays méditerranéens. Les produits de terroir. Les indications géographiques et développement local durable des pays méditerranéens. Options Mediterranean. 89: 306-316.

**Salihu A., Alam Md. Z., Abdulkarim M. I. et Salleh H. 2012.** Lipase production: An insight in the utilization of renewable agricultural residues. Res. Cons. Recy. 58: 36-44.

**Sarah Doudih. 2011.** Identification des moisissures et de leurs métabolites secondaire colonisant des supports papiers évaluation de la toxicité sur des cellules épithéliale respiratoire in vitro. Université paris est. Thèse de doctorat.

**Schaffer S., Muller W.E et Eckert G.P. 2010.** Cytoprotective effects of olive mill wastewater extract and its main constituent hydroxytyrosol in PC12 cells. Pharmacological Research. 62: 322-327.

## Référence bibliographiques

---

**Senani N et Moulti-Mati F.2011.** Etude du pouvoir antifongique des extraits phénoliques issus des margines de la variété Chamlal (*Olea europea*) sur deux souches, *Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus*. 6ème Congrès International: Qualité des produits et de l'Environnement-Traitement et Valorisation des Rejets et Effets sur la santé Humaine, Tunisie, 4p.

**Seraphim P., Maria G.P., Stylianos F, Michael K et George A .2008.** Citric acid production by *Yarrowia lipolytica* cultivated on olive-mill wastewater-based media. *Bioresource Technology*. 99: 2419–2428.

**Sidhoum M., 2011.** Contribution à l'étude pédologique et génétique de quelques variétés de l'olivier dans la wilaya de Tlemcen. Mémoire de Magister. Université Abou BekrBelkaid-Tlemcen.

**Sifoun N. 2008.** Traitement des effluents des huileries d'olive par oxydation au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Mémoire de magister. Université M'Hamed Bougara, Boumerdès, 90p.

**Simmons G.G.1993.** *Alternaria* themes and variation. *Mycotaxon*. 48, 109-140.

**SO 6888-1.1999.** Microbiologie des aliments- Méthodes horizontale pour le dénombrement des staphylocoques à coagulation positive (*Staphylococcus aureus* et autres espèces)- partie1 : Techniques utilisant le milieu gélosé de Baird-Parker.

(T)

**Tabet D., Saidi M., Houari M., Pichat P et Khalaf H .2006.** Fe-pillared clay as a Fenton-type heterogeneous catalyst for cinnamic acid degradation. *Journal of Environmental Management* 80:342-346.

**Treichel H., Oliveira D., Mazutti M.A., Luccio M.D. et Oliveira, J.V. 2010.** A Review on Microbial Lipases Production. *Food Biop. Technol.* 3:182–196.

**Trigui A .2008.** Etude en vue d'élaboration d'un plan d'action pour l'utilisation énergétique des sous-produits de l'oliveraie en Tunisie. PNUD-Tunisie. Projet (00058135).

**Tsiamis G., Tzagkaraki G., Chamalaki A., Xypteras N., Andersen G., Vayenas D et Bourtzis K .2012.** Olive-mill wastewater bacterial communities display a cultivar specific profile. *Curr. Microbiol.* 64: 197–203. <http://dx.doi.org/10.1007/s00284-011-0049-4>.

## Référence bibliographiques

---

**Tsioulpas A., Dimou D., Iconomou D et Aggelis G.2002.** Phenolic removal in olive mill wastewater bystrains of *Pleurotus* spp. In respect to their phenol Oxidase (laccase) activity. *BioresourceTechnology*. 84: 251-257.

(V)

**Vagelas I., Kalorizou H., Papachatzis A et Botu M .2009.** Bioactivity of olive oil mill wastewater against plant pathogens and post-harvest diseases. *Biotechnol. Equip.* 23 : 1217–1219. <http://dx.doi.org/10.1080/13102818.2009.10817641>.

**Vasquez Rancero, R Maestro-Duran et E Graciano-constante .1974.** componentes fenolicos de la aceituna.II.Polifenoles del alpeclsim. *Gasas y Aceites*.

**Veillet S.2010.** Enrichissement nutritionnel de l'huile d'olive : Entre Tradition et Innovation. Thèse de Doctorat en Sciences de l'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, Marseille 153p.

**Vercheure L et Marlier M .2006.** Les méthodes chimiques d'identification et de classification de champignons .BASE. Unité de chimie générale et organique. Faculté universitaire des sciences agronomiques de Gembloux. *Biotechnole. Agôn. Soc Environ . 6* (3) : 131-142.

**Vivas A., Moreno B., Garcia-Rodriguez S et Benitez E .2009.** Assessing the impact of composting and vermicomposting on bacterial community size and structure, and microbial functional diversity of an olive-mill waste. *Bioresour.Technol.* 100: 1319–1326. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2008.08.014>.

**Vossen P.2013.** Growing olives for oil. R. Aparicio and J. Harwood (eds.). *Handbook*.

(W)

**Wendakoon C.N et Sakaguchi M.1995.** Inhibition of amino acid decarboxylase activity of enterobacter aerogenes by active components in spices.*Journal of food protection* , 58(3) , 280-283.

(Y)

**Yaakoubi A., Chahlaoui A., Elyachioui M. & Chaouch A.2010.** Traitement des margines à pH neutre et en conditions d'aérobic par la microflore du sol avant épandage. *Bull. Soc. Pharm.Bordeaux*, 149 43-56.

**Yaakoubi A., Chahlaoui A., Rahmani M., El Yahiaoui M, Oulhote. Y .2009.** Effet de l'épandage des margines sur la microflore du sol. *Agro solutions*. 20(1) : 35-43.

## Référence bibliographiques

---

**Yahiaoui N .2012.** Etude de l'adsorption des composés phénoliques des margines d'olivier sur carbonate de calcium, Hydroxyapatite et charbon actif. Mémoire de magistère. Université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou, 129p.

**Yalcuck A., Baldon Pakdil N et Yaprak Turan S .2010.** Performance evaluation on the treatment of olive mill waste water in vertical subsurface flow constructed wetlands Desalination. Journal of agricultural Food Chemistry. 262: 209-214.

(Z)

**Zahari A., Tazi A et Azzi M .2014.** Optimisation des conditions de traitement des margines par un superoxydant  $K_3FexMnyO_8$  [Optimization of treatment conditions of Olive Oil Mill Wastewater by superoxidant  $K_3FexMnyO_8$ ] .J. Mater. Environ. Sci.5 (2): 484-489.7.

**Zaier H.,Chmingui W., Rajhi H., Bouzidi D.,Roussos S et Rhouma A.2017.**Journal of news sciences, Agriculture and Biotechnology. 48(2) 2897-2906.

**Zbakh H et El Abbassi A .2012.** Potential use of olive mill wastewater in the preparation of functional beverages: a review. J. Funct. Foods. 4: 53–65. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2012.01.002>.

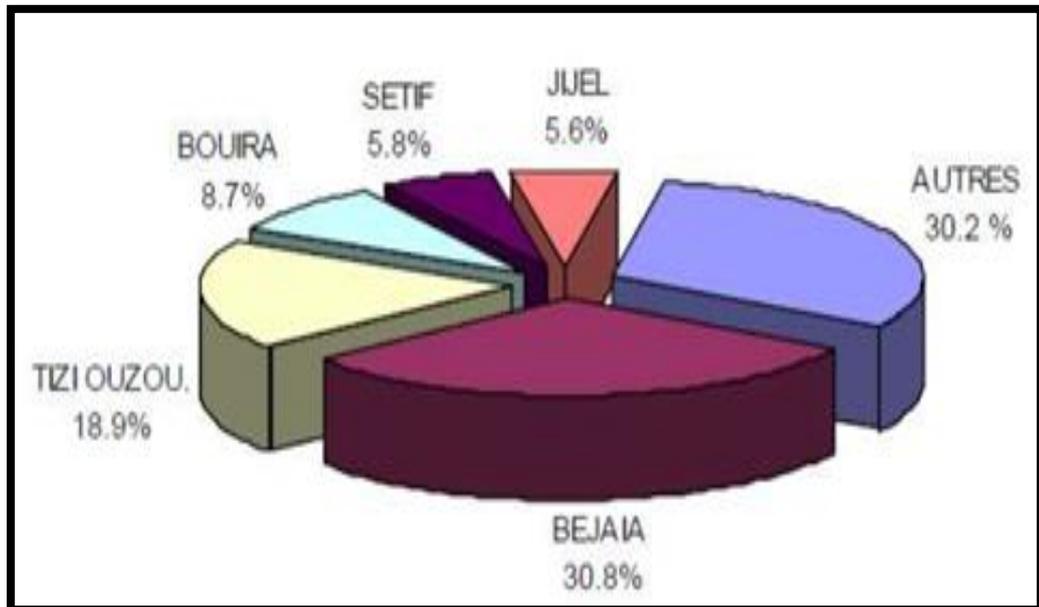
**Zhang Q., Zhang J., Yang L., Zhang L., Jiang D., Chen Wet Li, G. 2014.** Diversity and biocontrol potential of endophytic fungi in Brassica napus. Biological control. 72: 98-108.

**Zillinsky F.J.1983.** Maladies communes des céréales à paille. Guide d'identification.

## Annexe

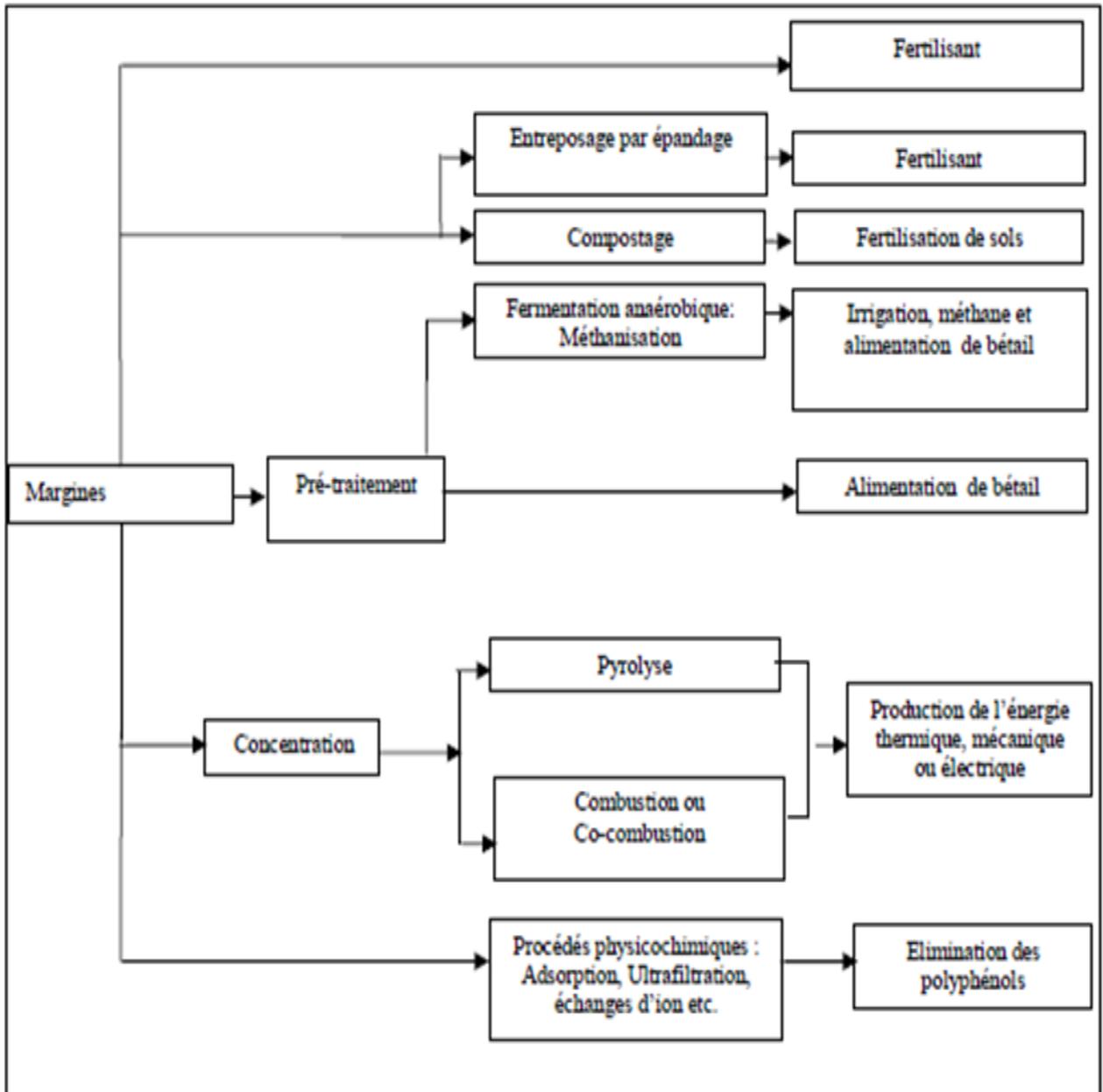


**Figure 01** : Distribution mondiale des principales espèces et sous-espèces du genre *Olea* (Rugini et al., 2011)



**Figure 02** : Répartition de la superficie d'olivier cultivées en Algérie (Benabid, 2009).





**Figure 05** : Différentes filières de valorisation des margines (Chouchene, 2010).

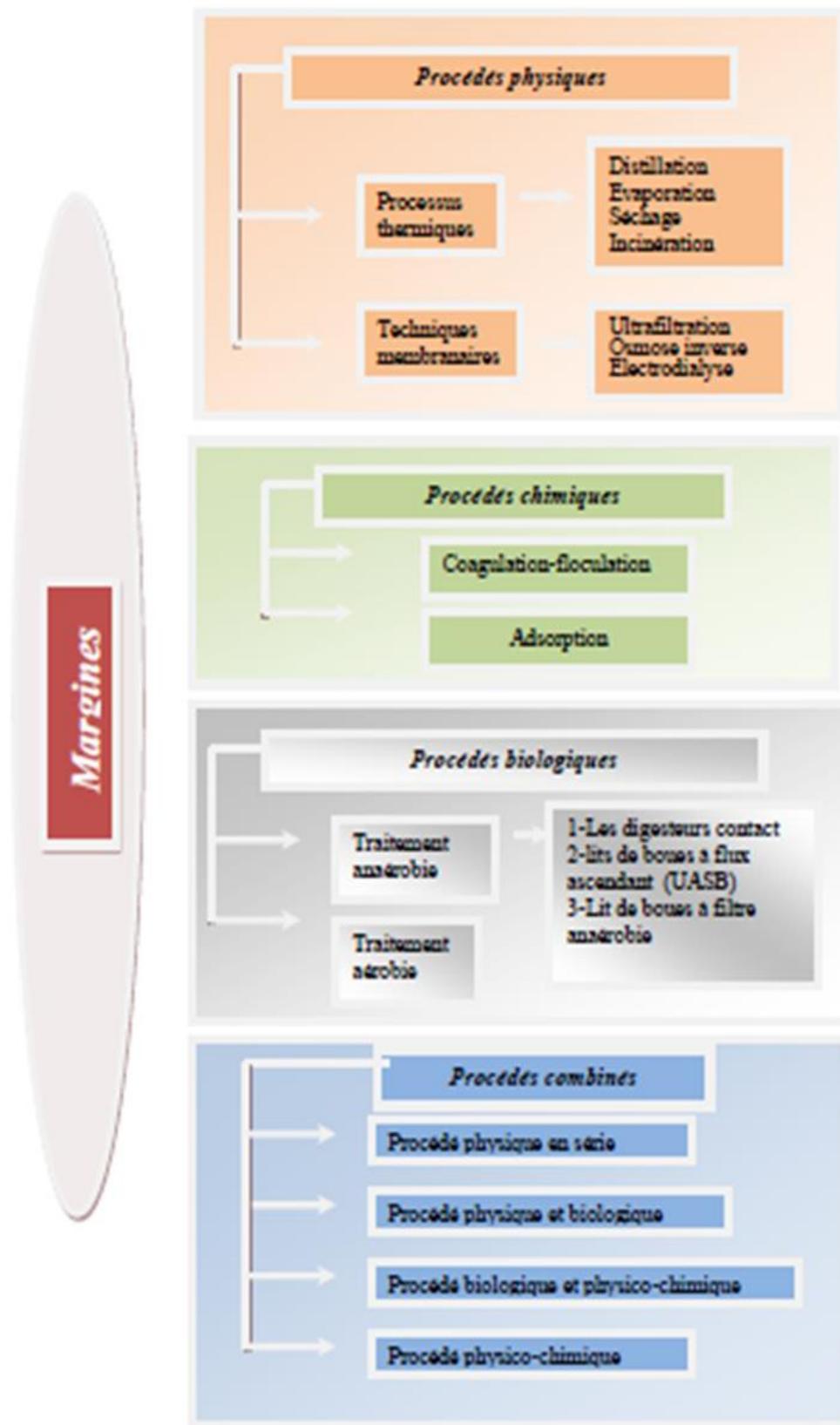


Figure 06: Les principales voies de traitement des margines (Ouali, 2012).

## Annexe

**Tableau I** : Les principales variétés cultivées en Algérie (locales et introduites) leur orientation ainsi que leur répartition (**Benrachou 2013**).

Varietes	Aire de culture	Destination	Observations
sigoise	Ouest algerien oranie telmcen	Table - huile	Tres estimee pour la conservation etl huilerie , rendement eleve en huile vaeriete autofertile
blanquette	Est algerien	Table-huile	-
Azeraj	Centre algerien	Table - huile	Tres bon pollinisateur de chemlal
Rougette	Est algerien	Huile	-
Chemlal	Centre algerien kabylie	Huile	Huile tres appereciee. Resiste en culture seche. Inconvenients ; autosterile, floraison tardive.
Limli	Est algerien	Huile	Variete conseilllee dans la regions de jijel a sidi-aich
Bouricha	Est algerien collo-oued el kebir	Huile	Cultivee dans les regions a forte pluviometrie
Cormicabra	Ouest algerien oranie, tlemcen	Table -Huile	
Ronde de miliana	Centre et ouest	Table -Huile	Tres localisee dans la region de miliana
Longue de miliana	Centre et ouest	Table -Huile	Tres localisee dans la region de miliana
Neb djmel	Sud est algerien	Table -Huile	Variete des regions presaharienne
Sevillane	Ouest algerien plaine d oran	Table	Tres interessante par le gros calibre des fruits
Picholine marocaine	Ouest du pays	Huile	Tres commune avec la sigoise meme caractere
Bouchouk la fayette	Centre algerien	Table-huile	Interessante pour la region de bougaa
Boukhenfas	Centre algerien	Table-huile	Donne les meilleurs resultats a la station de sidi-aich
Coratina	Centre et est	Huile	Variete italienne tres rigoureuse et tres productive
Frontoio	Centre et est	Huile	Vaiete italienne , bon fertilisateur de chemlal

## Annexe

**Tableau II** : les différentes techniques de récolte des olives ainsi que leur avantages et inconvénients (Lamrani, 2009; Veillet, 2010).

Méthode	L'outil	Avantages et inconvénients
traditionnelle	La récolte est à la main	La plus respectueuse de l'arbre mais la récolte est fastidieuse et très longue.
Peigne manuel	oléiculteurs déposent un filet sur le sol et utilisent un peigne qui va arracher les olives. La majorité des régions de production des olives utilisent le gaulage (90 %).	Le gaulage provoque la lésion des fruits. Ces lésions facilitent la pénétration et le développement des micro-organismes ce qui nuit considérablement à la qualité de l'huile d'olive. Lamrani, 2009.
peigne mécanique	d'un moteur faisant tourner les peignes au bout d'un manche télescopique.	une récolte plus rapide des olives et reste peu traumatisante pour les oliviers.
vibration des branches	des pinces métalliques viennent enserrer le tronc de l'olivier et une vibration à haute fréquence va être appliquée au tronc.	Le principal inconvénient de ce système, outre son coût à l'achat, est les dégâts qu'il peut occasionner aux jeunes rameaux des oliviers.

**Tableau III** : Principaux éléments minéraux des margines

Element	Unité	Mahmoud et al (2010)	Karouzas et al (2010)	Moraetis et al (2011)	Danellakis et al (2011)	Piotrowska et al (2011)	Dermeche et al (2013)	Intervalles de valeurs
Pb	g/l	/	/	6,7	10	/	/	6,7-10
Cd	g/l	/	/	0,03	1	/	/	0,03-1
Fe	Mg/l	/	6,5	/	8,88	20	+	0,45-20
Zn	Mg/l	/	3,4	2,94	4,98	/	+	1,7-4,98
Cu	Mg/l	/	2,4	/	2,96	/	+	0,49-2,96
Mn	Mg/l	/	0,9	1,61	2,7	20	+	0,46-20
Mg	g/l	0,17	0,12	0,11	0,11	0,03	+	0,03-0,17
Ca	g/l	0,14	1,1	0,15	0,29	0,03	+	0,03-0,29
K	g/l	1,05	6,1	4,22	0,7	3,47	+	0,73-6,1
Cl	g/l	0,76	/	/	/	1	/	0,76-1
Na	g/l	0,13	0,07	/	0,15	0,05	+	0,03-0,13

(+) : détecté. (/) : Non évoqué

## Annexe

---

**Tableau IV:** Moisissures potentiellement producteurs de lipases (**Rigo *et al.*, 2010**).

Moisissures	Références	
	Fermentation submergée	Fermentation solide
<i>Geotrichum sp.</i>	<b>Yan et Yan, 2008</b>	
<i>Rhizopus sp.</i>		<b>Martinez-Ruiz <i>et al.</i>, 2008</b>
<i>Penicillium simplicissimum</i>		<b>Vargas <i>et al.</i>, 2008</b>
<i>Aspergillus niger</i>		<b>Dutra <i>et al.</i>, 2008</b>
<i>Penicillium verrucosum</i>	<b>Pinheiro <i>et al.</i>, 2008</b>	<b>Kempka <i>et al.</i>, 2008</b>
<i>Rhizopus chinensis</i>	<b>Teng <i>et al.</i>, 2009</b>	

Tableau I : Matériels non biologiques

1. Appareils	2. Verreries	3. Autres
1. Autoclave	2. Tubes à essai	3. Glacière
4. L'étuve	5. Flacons	6. Boîtes de Pétri en plastique
7. Agitateur à plaque chauffante	8. Béchers	9. Pince
10. Plaque chauffante	11. Erlen Meyer de 1L	12. Spatule
13. Réfrigérateur	14. Pipettes Pasteur	15. Mortier
16. Balance	17. Lames	18. Ance de platine
19. Microscope optique	20. Dessiccateur	21. Bec Benzène
22. pH mètre		23. Portoir
24. Bain Marie		25. Papier d'aluminium
26. Vortex		27. Les ambons stériles.
28. Fur à moufle		29. Antibiotique
30. La presse		31. Antifongique
32. Conductimètre		33. Papier filme
34. Spectromètre		35. Micropipette de 1ml
		36. Micropipette de 0,1 ml
		37. Creuset en porcelaines
		38. Scotche

Tableau II : Produits et réactifs

Produit et réactifs	L'utilisation
L'huile a emersion.	Observation des champignons
L'eau physiologique L'eau distillée	la préparation des dilutions décimales La préparation des solutions d'antibiotiques, les milieux de culture ainsi que pour la détermination de pH
Bleu de méthylène.	L'identification des champignons


Tableau III : Les Milieux de culture

Milieu	Caractéristiques	Composition
<b>PDA</b> (Guiraud, 1998)	(Potato-Descrose- Agar)  Pour le dénombrement et l'isolement des champignons	Pomme de terre.....200 g Glucose.....20 g Agar.....20 g Eau distillée.....1L pH=7,0± 0,2. + Antibiotique Augmentin 0.25 g/l Autoclavage 20 min à 120 C°
<b>TGEA</b>	(Tryptone Glucose Extrait d'Agar)  Pour la recherche et le dénombrement de la flore mésophile aérobie totale	Pryptone de caseine.....5 g Extrait de levure.....1g Extrait de viande.....3g Glucose.....1 g Agar.....18 g L'eau distillée.....1L Ph=7,0 ± 0,2. Autoclavage 20 min à 120 C°
<b>Désoxycholate lactose</b> (LARPENT <i>et al</i> , 1997)	Pour la recherche et le dénombrement des coliformes totaux et fécaux	Bio-polytone .....10g Lactose.....10g Chlorure de sodium.....5g Citrate de sodium..... 2g Désoxycholate .....0.5g Rouge neutre.....0.0033g Agar ..... Eau distillée.....1000 ml
<b>Sabouraud</b> (Dongyou, 2010)	Pour le dénombrement des levures	Peptone.....10 g Glucose.....20 g Agar.....15g Eau distillée.....1L Ph=7 ± 0,2 + Augmentin 0.25 g/l Autoclavage 20 min à 120 C°
<b>MRS</b> (Marchal <i>et al</i> , 1982)	(Gélose de Man, Rogosa et Sharpe)  Pour l'isolement et le	Polypeptone.....10 g Extrait de viande.....10 g Extrait autolytique de levure.....5 g Glucose.....20 g Tween 80.....1 g Phosphate dipotassique.....2 g Acétate de sodium.....5 g

	dénombrement des bactéries lactiques	Citrate d'ammonium.....2 g Sulfate de magnésium.....0,20 g Sulfate de manganèse.....0,05 g Hydrogénophosphate de potassium.....2 g Agar agar.....15 g L'eau distillée.....1000ml Ph=5,7±0,1 Autoclavage 20 min à 120 C°
<b>Chapman (Marchal et al, 1982)</b>	Milieu sélectif pour l'isolement et l'enrichissement des <i>Staphylocoques</i> La forte concentration en chlorure de sodium inhibe la plupart des bactéries à Gram négatif et à Gram positive	Extrait de levure.....3g Extrait de viande.....3g Tryptone.....5g Peptone bactériologique.....10g NaCl.....10g Mannitol.....10g Rouge de phénol.....0,05g Agar.....18g L'eau distillée.....1L pH = 7,4±0,1 Autoclavage 20 min à 120 C°
<b>Hektöen (Joffin et Leyral, 2001)</b>	Milieu sélectif pour l'isolement et différenciation des Entérobactéries ( <i>Salmonella</i> )	Peptone de viande .....15g Extrait de viande.....3g Extrait de levure.....3g Na Cl.....5g Lactose.....12g Saccharose.....12g Sels biliaires.....4g Salicine .....2g Bleu de bromothymol.....0,064g Fuchsine acide.....0,1g Agar agar.....18g L'eau distillée.....1L pH=7,4 ± 0,2 Autoclavage 20 min à 120 C°
<b>Milieu lipase (Abe et al., 2015)</b>	Pour mettre en évidence l'activité lipolytiques	Tween 20.....10ml Peptone.....10g Na Cl.....5g CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O.....0.1g Agar.....17g Eau distillée.....1L pH=7,0±0,2. Autoclavage 20 min à 120 C°
<b>EPT Important</b>	<b>(Eau Peptone Tamponnée)</b> Pour le pré-enrichissement des Salmonelles	Bactopeptone.....20g Na Cl.....05g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....09g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....1.5g Eau distillée.....1L Ph=7.6 Autoclavage 20 min à 120 C°
<b>SFB important</b>	<b>(Bouillons au Sélénite de Sodium)</b>	Biopolytone.....5g Lactose.....4g

	Pour l'enrichissement des Salmonelles	Phosphate de sodium.....10g Sélénite acide de sodium.....4g Eau distillée.....1L Ph=7.2
<b>Roth (S / C) Institut Pasteur 2003</b>	Pour la recherche et dénombrement des streptocoques fécaux (test préemptif)	Peptone de caseine.....20g Glucose.....1.5g Glucose......4g Phosphate dipotassique.....2.7g Phosphate monopotassique.....2.7g Azide de sodium.....0.2g PH=6.9± 0,1
<b>Litsky Institut Pasteur 2003</b>	Permet la recherche et dénombrement des streptocoques fécaux utilisé pour le test de confirmation des résultats obtenus sur milieu de Roth	Tryptone.....20g Glucose.....5g Phosphate dipotassique.....2.7g Phosphate monopotassique.....2.7g Chlorure de sodium.....5g Azide de sodium.....0.4g Ethyle violet.....0.00083g Ph=7.4± 0,2
<b>Giolitti et Cantoni (Guiraud, 1998).</b>	Pour l'enrichissement des Staphylocoques	Tryptone .....10,0 g Extrait de viande .....5,0 g Extrait de levure .....5,0 g Glycine .....1,2 g Mannitol .....20,0 g Pyruvate de sodium.....3,0 g Chlorure de sodium .....5,0 g Chlorure de lithium .....5,0 g Tween 80.....1,0 g pH = 6

### Préparation de PDA

L'agar et le Glucose sont dissous à chaud dans l'extrait de pomme de terre puis le volume est complété à un litre d'eau distillée. Le pH est ajusté à 5 (Larpent, 1997).



Les différents milieux utilisés



Bain marie



Etuve 44°C



Etuve 37°C



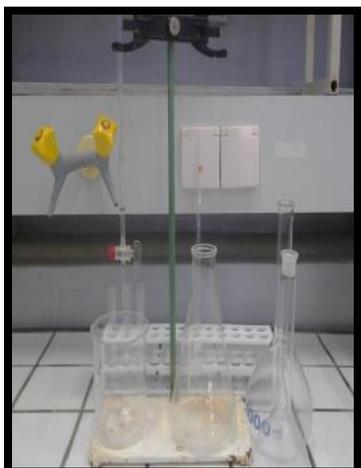
Compteur de la colonie



Microscope photonique



Balance



**Verreries**



**Conductimètre**



**Etuve de 28°C**



**Autoclave**



**Centrifugeuse**



**Flacon**

**Boite Pétrie**

**Bec Benzène**

**Tableau I : Dénombrement de la flore mésophile totale**

Régions	Boumerdes	Bejaïa	Tizi-Ouzou
Dilution	$10^{-3}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$
Nombre des colonies	138	125	145
Germes UFC /g	$13,8 \cdot 10^5$	$12,5 \cdot 10^5$	$14,5 \cdot 10^5$

$$\text{Nombre UFC/ml} = \text{Nombre de colonies} \times 1/V \times 1/D$$

**Tableau II : Dénombrement des levures et moisissures**

Régions	Boumerdès		Béjaïa		Tizi-Ouzou	
	Levure	Moisissure	Levure	Moisissure	Levure	Moisissure
Germes						
Dilution	$10^{-3}$	$10^{-1}$	$10^{-3}$	$10^{-2}$	$10^{-4}$	$10^{-3}$
Nombre des colonies	50	31	30	34	60	30
UFC / g	$5 \cdot 10^3$	$3,1 \cdot 10^1$	$3 \cdot 10^3$	$3,4 \cdot 10^2$	$6 \cdot 10^4$	$3 \cdot 10^3$

**Tableau III: Dénombrement des bactéries lactiques**

Régions	Boumerdes	Béjaïa	Tizi-Ouzou
Dilution	$10^{-4}$	$10^{-1}$ à $10^{-4}$	$10^{-4}$
Nombre des colonies	187	Absence	167
N UFC / g	$1,87 \cdot 10^5$	Absence	$1,6 \cdot 10^4$

**Tableau IV : Calcule de la matière en suspension**

	Boumerdes	Bedjaia	Tizi Ouzou
M1	55,49	61,56	62,05
M2	57,30	63,20	63,01
MES	<b>25,85</b>	<b>23,41</b>	<b>13,71</b>
M 3	56,35	62,30	62,65
Matière minérale en suspension	<b>12,27</b>	<b>10,57</b>	<b>8,57</b>
Matière volatile en suspension	<b>13,53</b>	<b>12,84</b>	<b>5,14</b>

$$\text{MES g/l} = (M1 - M2) / V. (10^{-3})$$

$$[\text{MMS}] (\text{g/l}) = (M_3 - M_1) / \text{VE}1000$$

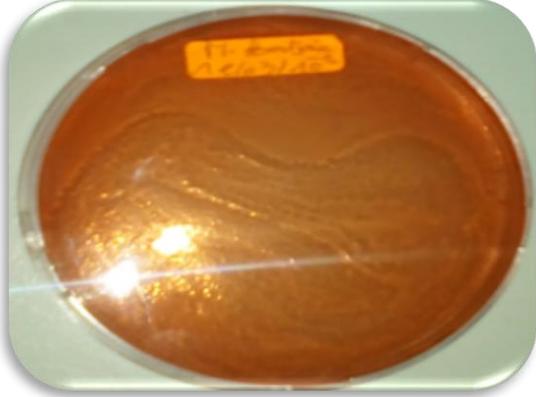
$$[\text{MVS}] (\text{g/l}) = (\text{MES} - \text{MMS}) / \text{VE} 1000$$

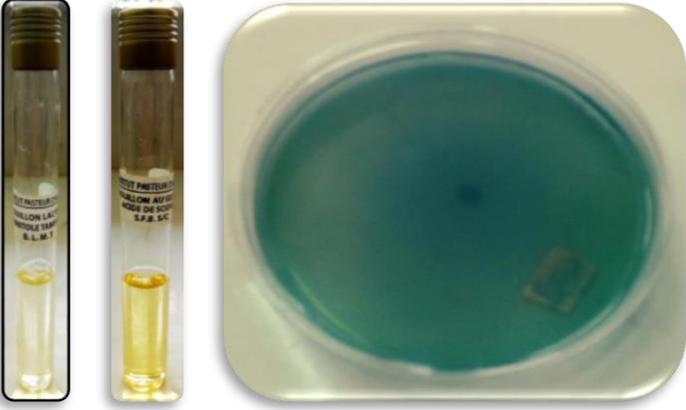
**Tableau V: Calcule de matière sèche**

	<b>Boumerdes</b>	<b>Bejaïa</b>	<b>Tizi Ouzou</b>
<b>M1</b>	55,49	61,56	62,05
<b>M2</b>	56,75	62,69	62,78
<b>Matière sèche</b>	42	31	24,33

$$\text{MES g/l} = (M1 - M2) / V. (10^{-3})$$

## Les différents résultats microbiologiques

Le germe a recherché	Aspect macroscopique	Résultats
FMAT		Résultat positive
Coliforme totaux		Résultat négative
Coliforme fécaux		Résultat négatif
<i>Staphylococcus</i> <i>sp</i> (sur milieu Giolitti Cantoni et Chapman)		Résultat négatif

<p>Salmonelle (sur milieu eau peptone, SFB et Hektöen)</p>		<p>Résultat négatif</p>
<p>Streptococcus fécaux (sur milieu Roth et Litsky)</p>		<p>Résultat négatif</p>
<p>Bactéries lactique (sur milieu MRS)</p>		<p>Résultat positive</p>

## Résumé

### Résumé : Etude de la biodiversité des moisissures utiles isolées à partir des margines issus des maâsras de trois régions : Boumerdes, Bédjaia et Tizi-Ouzou

Les analyses de la qualité physicochimique et microbiologique des margines des unités de trituration d'olives de différentes régions de l'Algérie (Bejaia, Boumerdès et Tizi-Ouzou), ont montré que les margines étudiées ont un pH acide et sont riches en matière organiques, qu'est exprimé par le spectre infrarouge, la DBO5 et la DCO. Le rapport de DCO/DBO5 est supérieur à 6 pour toutes les régions qui soulignent bien un caractère difficilement biodégradable. Les mesures de salinité, conductivité, MES, MVS, MMS et Mox ont été déterminés. Sur le plan microbiologique la recherche et le dénombrement des germes montre que les levures et les moisissures représentent la flore majoritaire des margines de différentes régions. L'analyse de FMAT a révélé leur présence dans les 3 régions. Cependant les bactéries lactiques sont absentes dans l'échantillon de Bejaia par rapport aux autres régions. Ce travail a montré également l'absence totale des germes fécaux, des staphylocoques et des salmonelles dans les margines de toutes les régions, signifiant probablement qu'elles ne présentent pas de problème sanitaire et hygiénique. L'isolement des moisissures a permis une identification microscopique et macroscopique de 13 genres caractérisées par la prédominance de *aspergillus* et *penicillium*, la croissance sur le milieu tween 20 comme source de carbone sur 11 espèces choisit de chaque région a révélé que *Alternaria sp.* et *Aspergillus sp.* Sont les plus performantes dans l'assimilation des composés lipidiques des margines.

**Mots clés :** Margine, Moisissures, Identification, Isolement, Physicochimiques.

#### Abstract

Analyses of the physicochemical and microbiological quality of the Olive mill wastewater (OMW) crushing units of different regions of Algeria (Bedjaia, Boumerdès and Tizi-ouazou) have shown that the Olive Mill Waste Water (OMW) studies of the different regions have an acidic pH and are rich in organic matter, which is expressed by the infrared spectrum the BOD5 and COD. The report COD/BOD5 is superior to 6 for all regions, which emphasize well a character not easily biodegradable. Salinity, conductivity, MES MVS MMS and Mox measurements have been determined. In microbiological level the research and count of germs shows that yeasts and moulds represents the majority flora of the OMW of different regions. The analyses of the total aerobic mesophilic flora revealed their presence in the 3 regions.

however lactic acid bacteria are absent in the sample of Bedjaia by contribution to other regions. This work has also showed the total absence of fecal germs, staphylococci and salmonella in OMW of all regions, which probably signifying they do not present a sanitary and hygienic problem.

Isolation of molds allows the microscopic and macroscopic identification of 14 genera characterized by the predominance of *Aspergillus* and *Penicillium*, growth on Tween 20 medium as source of carbone on 11 species selected from each region revealed that *Alternaria sp.* and *aspergillus sp.* are the most effective in the assimilation of lipid compounds of OMW.

Keys words: Olive mill waste water, mold, identification, isolation, physicochemical

#### المخلص

أظهرت التحاليل الفيزيوكيميائية والميكروبيولوجية لمورج الزيتون الذي جمع من مختلف مناطق الجزائر (بومرداس بجاية و تيزي وزو) ان هذه الأخيرة تتميز بدرجة حموضة عالية وهي غنية بالمواد العضوية التي عبر عنها بطيف الاشعة تحت الحمراء و dco و dco 5 و dco 6 لتفوق القيمة 6 لجميع المناطق المدروسة التي تبين ان التحلل الطبيعي لمورج الزيتون صعب جدا و تم أيضا تحديد قياسات الملوحة و الموصلة للمواد المعلقة و الطيارة و المعدنية. على الصعيد البيولوجي. أظهرت البحث للكائنات الدقيقة ان الفطريات و الخمائر تمثل الغالبية العظمى في جميع المناطق المدروسة. تحليل FMAT كشف عن وجود هذه الأخيرة في المناطق الثلاثة إضافة الى وجود حمض اللاكتيك في كل من عينة بومرداس و تيزي وزو مع غيابها في عينة بجاية. أظهرت هذه الدراسة الغياب التام لكل من البكتيريا البرازية, المكورات العنقودية والسلمونيلا في جميع العينات المدروسة و هذا يعني انها لا تمثل أي خطر على الصحة و النظافة. بعد عزل وتنقية الفطريات الخيطية, أجريت دراسة عينية و مجهرية لتحديد السلالات بالاعتماد على مفاتيح تحديد السلالات من بين هذه السلالات المعزولة. تم اجراء اختبار تفكيك الدهون (ليباز) من اجل تحديد السلالات التي لها القدرة على تفكيك الدهون و ذات الفائدة في التكنولوجيا الحيوية.

**الكلمات المفتاحية:** مورج الزيتون, الفطريات الخيطية. تحديد, عزل, فيزيوكيميائية



*Chapitre I:*

*Introduction*



*Chapitre II:*

*Matériels*

*Et*

*Méthodes*



*Chapitre III:*

*Résultats*

*Et*

*Discussion*



*Chapitre IV:*

*Conclusion*



*Chapitre I:*

*Annexes*



*Références*  
*Bibliographiques*





*Chapitre I :*  
*Synthèse bibliographique*



*Chapitre II:*

*Matériels*

*Et*

*Méthodes*



*Chapitre III:*

*Résultats*

*Et*

*Discussion*



# *Conclusion*



# *Annexes*





*Références*  
*Bibliographiques*



# *Introduction*