

RÉPUBLIQUE ALGERIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
UNIVERSITÉ MOULOUD MAMMERRI DE TIZI-OUZOU
FACULTÉ DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET DES SCIENCES AGRONOMIQUES
DÉPARTEMENT MICROBIOLOGIE-BIOCHIMIE



Mémoire de fin d'études

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de

Master en Biotechnologie microbienne

Thème

**Essai de culture de *Spirulina platensis*
dans des milieux à base d'huile usagée et
des margines**

Présenté par : M^{elle} HAMMAS Lydia et M^{elle} BERKANI Zohra

Soutenu publiquement le : 03 / 07 / 2017

Devant le jury :

Mr METAHRI. M	Président	Maître de Conférences A à l'UMMTO
M ^{elle} BENAHMED DJILALIA	Promotrice	Maître de Conférences A à l'UMMTO
Mme TALEB. K	Examinatrice	Maître de Conférences B à l'UMMTO
Mme KESBIA.K	Examinatrice	Maître-assistant A à l'UMMTO

Année universitaire : 2016/2017

Remerciements

Merci à dieu pour tous ce qu'il nous a offert.

Au terme de ce travail, il nous est agréable d'exprimer nos profondes reconnaissances et nos gratitudeux aux personnes qui ont contribué à faciliter notre tâche et la mener à bien.

On tient à remercier tout d'abord M^{elle} BENAHMED DJILALI A. Maître de Conférences à l'UMMTO, qui nous a encadrés tout au long de ce travail en nous faisant bénéficier de ses connaissances scientifiques et ses conseils. On lui exprime nos profondes gratitudeux pour laide quelle nous a fournie pour la réalisation pour ce travail, quelle trouve ici l'expression de nos profonds respects et nos sincères reconnaissances.

On remercie Mr METAHRI M. Maître de Conférences «A» à l'UMMTO pour l'honneur qu'il nous a fait d'avoir accepté de juger ce travail et de présider le jury de ce mémoire.

Merci à Mme KESBIA K. Maître assistante «A» à l'UMMTO, de nous avoir fait l'honneur de se joindre au jury.

On remercie vivement Mme TALEB K. Maître de Conférences «B» à l'UMMTO d'avoir accepté de juger ce travail.

On doit également remercier le personnel de laboratoire de pédagogie, de microbiologie et physico-chimique à l'UMMTO, au département BMC pour leurs accueils et leurs sympathie.

Dédicaces

A mes très chers parents

Aucune dédicace aussi parfaite et douce soit-elle, ne saurait exprimer toute ma reconnaissance et tout l'Amour que je vous porte.

Ce travail représente le fruit de votre soutien, vos sacrifices et vos encouragements.

Jamais il n'aurait vu le jour sans les conseils que vous avez consentis pour mon éducation.

Que dieu vous protège et vous accorde une longue vie pleine de santé et de bonheur.

A mes très chers grands parents

A mon grand-père qui m'a toujours transmis son vaste savoir, sa joie de vivre et ses précieux conseils, je te dédie ce travail.

A ma grand-mère qui m'a toujours encouragé avec ses conseils précieux, je te dédie ce travail.

Que dieu vous protège et vous accorde une longue vie inchaAllah pleine de santé et de bonheur.

A mon très cher mari Mr HAMEG M.

Pour tes encouragements, ton dévouement et ton appui dans tous mes parcours. Je te remercie et que dieu te protège.

A mes deux frères et à ma petite sœur Fatma

A ma belle famille

A mes meilleurs amis

TINHINANE; TAOUS et KAMILIA, vous étiez toujours à mes côtés, merci.

A mes très chers tantes Nassima, Anissa et Dalila

A ma binôme et à toute sa famille.

H.Lydia

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail

A

Ma très chère mère

Mon très cher père

Mes chère grands- mères et grand-père

Mes très chers frères : Fatah et Hakim.

Mes très chères sœurs : Soraya, Souad, Noura, Naima.

Mon cher Oncle : Abdenour.

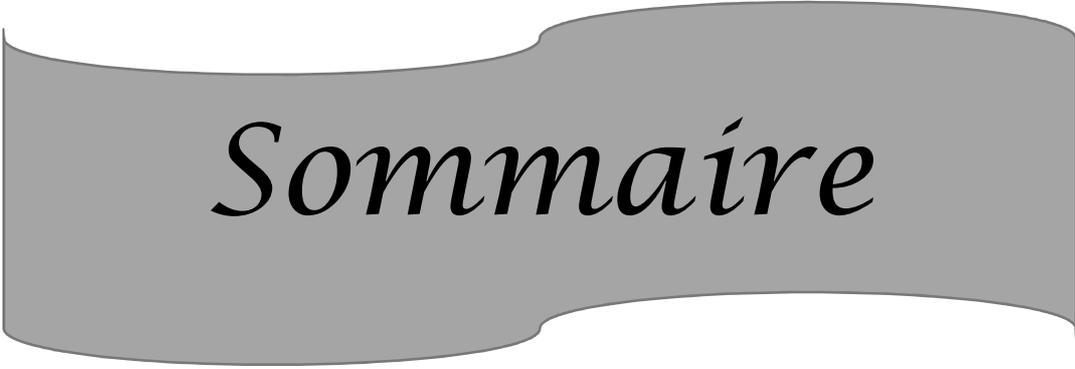
Mes chères tantes : Nouara, Fariza.

Ma chère binôme : Lydia ainsi que toute sa famille.

A tous mes amis que j'ai connus dans ma vie.

Aussi ma dédicace à tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin à réaliser ce travail.

B.ZOHRA



Sommaire

Sommaire

Liste des abréviations

Index des figures et des tableaux

Résumé

Abstract

SOMMAIRE

PARTIE 1: Synthèses bibliographique

Introduction générale..... 1

Chapitre I: Généralités sur la spiruline

I.1 Définition	3
I.2 Composition biochimiques	4
I.2.1 Protéines.....	4
I.2.2 Phycocyanine	4
I.2.2.1 Structure chimique	5
I.2.2.2 Production de la phycocyanine	5
I.2.2.3 Spectre d`absorption de la phycocyanine.....	5
I.2.3 Lipides	5
I.2.4 Caroténoïdes	6
I.2.5 Vitamines	6
I.2.6 Minéraux et oligoéléments	7
I.3 Culture de la spiruline	8
I.4 Utilisation de la spiruline.....	9

Sommaire

Chapitre II : Généralités sur les margines et les huiles usagées

II.1 Margines.....	10
II.1.1 Définition.....	10
II.1.2 Origine	10
II.1.3 Composition générale.....	11
II.1.3.1 L'eau	11
II.1.3.2 Composition minérale.....	11
II.1.3.3 Composition organique.....	12
II.1.4 Impact des margines sur l'environnement	13
II.1.4.1 Pollution des eaux.....	13
II.1.4.2 Pollution des sols	13
II.2 Huiles usagées.....	14
II.2.1 Définition	14
II.2.2 Composition.....	14
II.2.3 Effet des huiles usagées sur l'environnement	14
II.3 Traitement des huiles usagées	15

PARTIE 2: Étude expérimentale

Chapitre III: Matériel et méthodes

II.1 Matériel biologique	16
III.1.1 Spiruline	16
III.1.2 Cendres de bois de figuier	16
III.1.3 Margines	17
III.1.4 Huiles usagées	17
III.2 Méthodes d'analyses	18
III.2.1 Réactivation de la spiruline sur milieu liquide	18
III.2.2 Caractérisation physico-chimique de la spiruline	19
III.2.2.1 Mesure du pH.....	19
III.2.2.2 Dosage colorimétrique de la phycocyanine	20

Sommaire

III.2.3	Préparation des milieux de culture.....	20
III.2.3.1	Préparation de la solution de cendre de bois de figuier	20
III.2.3.2	Préparation des mélanges à base de la solution des cendres de bois de figuier, les margines et les huiles usagées	20
III.2.4	Culture de la spiruline.....	22
III.2.5	Suivi de la culture	22
III.2.5.1	Mesure du pH.....	22
III.2.5.2	Estimation de la phycocyanine	23
III.2.5.3	Analyse de la composition chimique de la spiruline obtenue (IR).	23
III.2.5.4	Rendement en spiruline.....	23
III.2.5.5	Test de l'activité antimicrobienne des poudres de spiruline obtenues.....	24
III.2.6	Recyclage des milieux margine et vidange pour la culture de spiruline à 37°C et à température ambiante.....	24
III.2.6.1	Suivi de la culture	24
III.7.2	Rendement en spiruline	24

PARTIE 3: Résultats et discussion

IV.1	Caractérisation des matières premières	25
IV.1.1	Caractérisation physico-chimique de la poudre de spiruline.....	25
	➤ Le pH.....	25
	➤ Dosage colorimétrique de la phycocyanine.....	25
IV.1.2	Caractérisation physicochimique des milieux préparés	25
IV.1.2.1	Le pH.....	25
IV.2	Suivi de la culture de la spiruline	26
IV.2.1	Évaluation de la culture de spiruline dans les milieux a base des margines et les huiles usagée à 37°C.....	26
IV.2.2	Évaluation de la culture de spiruline dans les milieux a base des margines et les huiles usagée à température ambiante	28

Sommaire

IV.2.3	Recyclage des milieux pour la culture de la spiruline à 37°C et à température ambiante	30
IV.3	Rendement en spiruline	31
IV.3.1	Analyse de la composition chimique de la spiruline.....	33
IV.3.2	L`activité antimicrobienne de la spiruline.....	34

Conclusion générale

Références bibliographiques

Annexes

Liste des abbreviations

ADN: acide désoxyribonucléique.

IR: infra rouge.

DO: densité optique.

MF: matière fraîche.

MS: matière sèche.

Liste des figures

N°	Intitulés	Page
01	<i>Spirulina platensis</i> vue au microscope photonique	3
02	Structure chimique de la phycocyanine	5
03	Diagramme des flux pour la culture de la spiruline	8
04	Étapes du processus de traitement.	14
05	Aspect de la poudre de la spiruline (<i>Spirulina platensis</i>)	16
06	Cendres de bois de figuier de la région de Tizi-Ouzou	17
07	Photo représentant la margine	17
08	Huile usagée (huile de moteur)	18
09	Poudre de bicarbonate de sodium	18
10	Inoculum obtenu après réactivation de la spiruline	19
11	Solution de cendres de bois de figuier	20
12	Photo des milieux de la margine	21
13	Photo des milieux préparés à base d`huile usagée	22
14	photo du pH mètre de type (Inolab).	22
15	Spectrophotomètre (VIS-7220G).	23
16	Séparation de l`huile usagée de la spiruline au moyen d`une ampoule à décanter	24
17	Évolution du pH et de la croissance de la spiruline dans les milieux à base des margines (a) et l`huile usagée (b).	27
18	Évolution du pH et la croissance de la spiruline dans les milieux à base des margines (a) et l`huile usagée (b) à température ambiante.	29
19	photo représentant la matière sèche de la spiruline (à gauche matière sèche issue du milieu de margine; à droite matière sèche issue de huile usagée)	32

Liste des figures

	(originale).	
20	Spectre d`absorption IR de spirulines issues des milieux à base des margine et d`huile usagée.	33
21	Photo montrant les zones d`inhibition de la poudre de spiruline issue du milieu à base d`huile usagée <i>Candida</i> ; <i>E. Coli</i> et <i>S. Aureus</i> (de gauche à droite).	35

Liste des tableaux

N°	Intitulé	Page
I	La composition en acides aminés de <i>Spirulina platensis</i>	4
II	Vitamines liposolubles contenues dans la biomasse de <i>Spirulina platensis</i> .	6
III	Vitamines hydrosolubles contenues dans la biomasse de <i>Spirulina platensis</i>	7
IV	Minéraux et oligoéléments contenus dans <i>Spirulina platensis</i>	7
V	Composition des margines	11
VI	Les substances minérales des margines	12
VII	Les substances organiques des margines	12
VIII	Résultat du pH obtenu	26
IX	Résultat de culture de spiruline dans les milieux à base de margine et d'huile usagée à 37°C	27
X	Résultat de la culture de la spiruline dans les deux milieux à base de margine et huile usagée à température ambiante	29
XI	Recyclage des deux milieux à 37°C	31
XII	Recyclage des deux milieux à température ambiante	31
XIII	Taux de croissance de la spiruline cultivée dans les deux milieux optimisés.	32
XIV	Matière fraîche et matière sèche de la spiruline obtenues dans les deux milieux à base de margine et d'huile usagée à 37°C.	32
XV	Matière fraîche et matière sèche de la spiruline obtenues dans les deux milieux à base de margine et huile usagée à température ambiante.	33
XVI	Diamètre moyen d'halo d'inhibition en mm de la poudre de spiruline (0,2mg/ml, Ø=7mm, V=20µl).	35

Résumé

Résumé

La culture de spiruline a été réalisée dans deux milieux préparés à base des margines et des huiles usagées et les cendres de bois de figuier.

Dans un premier temps, cette culture est lancée dans une étuve à 37°C. A la fin de la culture, les deux milieux ont été réutilisés pour lancer une nouvelle culture de spiruline sous les mêmes conditions opératoires et à température ambiante. Le suivi de la culture a été réalisé en suivant l'évolution du pH, production de phycocyanine, et le rendement en spiruline. L'analyse IR des poudres de spirulines issues des deux milieux a été réalisée ainsi que leur activité antimicrobienne vis-à-vis des souches pathogènes. Les résultats montrent que, le milieu à base de l'huile usagée donne un meilleur rendement en spiruline en comparaison avec ceux obtenus en utilisant les milieux recyclés. L'analyse IR des poudres de spirulines obtenues révèle la prédominance des groupes hydroxyles et des groupes carbonyles. Enfin, la sensibilité des trois souches (*Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* et *Escherichia Coli*), vis-à-vis de la poudre de spiruline issue du milieu préparé à base des huiles usagées semble meilleure. D'autres paramètres restent à étudier, afin d'évaluer la qualité et le rendement en spiruline en valorisant les deux déchets difficilement dégradables par la spiruline.

Mots clés: spiruline, huile usagée, margine, phycocyanine, cendres de bois de figuier, pollution.

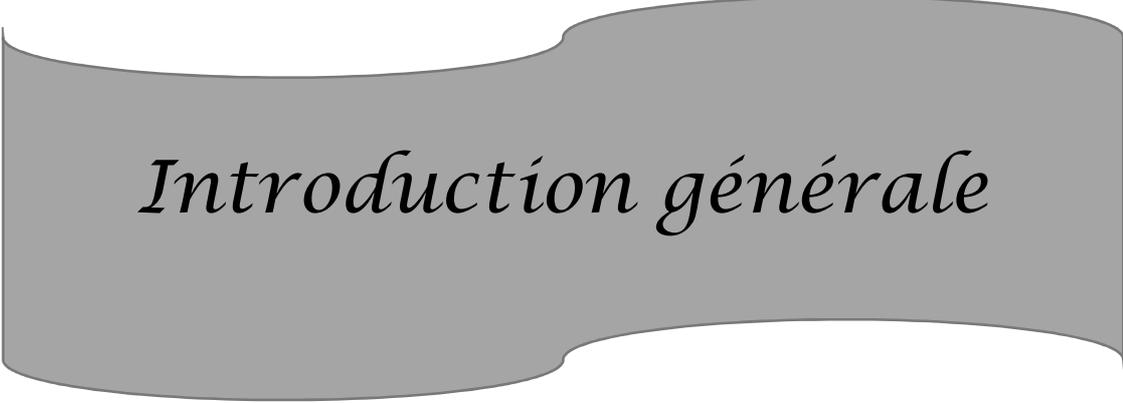
Abstract

Abstract

The cultivation of spirulina culture was carried out in two media prepared from margines and waste oils and fig wood ash.

In a first step, this culture is launched in an oven at 37° C. At the end of the culture, the two media were reused to launch a new culture of spirulina under the same operating conditions and at ambient temperature. The follow-up of the culture was carried out following the evolution of the pH, production of phycocyanin, and the yield of spirulina. The IR analysis of the spirulina powders from the media was carried out as well as their anti-microbial activity against the pathogenic strains. The results show that the waste oil medium gives a better yield of spirulina compared to those obtained using the recycled media. The IR analysis of the spirulina powders obtained reveals the predominance of hydroxyl groups and carbonyl groups. Finally, the sensitivity of the three strains (*Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* and *Escherichia Coli*), versus the spirulina powder from the prepared oil-based medium appears to be better. Other parameters remain to be studied in order to evaluate the quality and the yield of spirulina by valorising the two waste products which are difficult to degrade with spirulina.

Key words: spirulina; used oil; cinders of fig wood; phycocyanine; pollution.



Introduction générale

Introduction générale

I. Introduction générale

La spiruline est considérée comme une source alimentaire qui peut contenir jusqu'à 70% de protéines, elle est riche en sels minéraux, oligo-éléments et contient de nombreuses vitamines (B1, B2, B12, E, ...) (SHALL *et al.*, 1999).

En plus de la chlorophylle, la spiruline contient de la phycocyanine qui est un pigment connu possédant un pouvoir antioxydant intéressant (CHEN et WONG, 2008). Compte tenu de ses caractéristiques, la culture de la spiruline pourrait être une solution pour améliorer la santé humaine, la nutrition notamment dans les pays du tiers-monde et également pour développer des cultures industrielles (SGUERA, 2008).

C'est une espèce d'algue qui se développe dans des lacs alcalins, à proximité des cratères de volcan, et le désert notamment. L'Algérie fait partie des rares pays cultivant de la spiruline dans le monde. A cet effet, des chercheurs algériens, ont découvert que la wilaya de Tamanrasset qui se situe au niveau du sud algérien, un lieu idéal favorisant sa culture. (SAGGAI, 2008).

Dans le but de produire une spiruline bio, nous nous sommes intéressés à valoriser les sous-produits agricoles, tels que les margines et les huiles usagées.

L'industrie oléicole, en plus de sa production principale qui est l'huile d'olive vierge, génère des sous-produits liquides appelées les eaux de végétation ou les margines. Ces effluents ont jusqu'à présent peu de valeur économique en Algérie (BERNOU et BOUCENDALA 2015).

En effet les margines sont rejetées soit dans des cours d'eaux, soit répandues sur le sol. Ces effluents fortement chargés en matière organique, affectent la qualité des eaux dans lesquelles elles sont déversées constituant ainsi un déchet polluant (KEBBAB, 2014).

En outre, il existe d'autres polluants naturels qui entraînent aussi la pollution des eaux et les sols, sont les huiles usagées des moteurs qui sont devenues impropres à l'usage (BLIEFERT et PERRAUD, 2001). Ces huiles sont classées comme déchets dangereux (MOLETTA, 2009). Néanmoins, elles constituent une catégorie importante de matériaux susceptibles d'être récupérés par des traitements appropriés. Cette récupération est une nécessité pour protéger l'environnement. (MAZOUZI *et al.* 2014).

Introduction générale

Plusieurs chercheurs ont travaillé sur la culture de la spiruline dans des milieux synthétiques (JOURDAN, 2006), naturel ou semi-synthétiques en valorisant des ressources agricoles citant: BENAHMED DJILALI et BENAMARA, (2013), ont réussi la culture de la spiruline dans un milieu à base de l'eau de mer et la solution des cendres de bois de figuier, d'olivier et de palmier. D'autres chercheurs Saoudiens ont pu cultiver la spiruline dans un milieu à base de substrats de croissances différents à base du palmier dattier (ADEL, 2014).

C'est dans ce sens que notre travail s'inscrit, et qu'a pour objectif de cultiver la micro algue «*Spirulina platensis*» originaire de Burkina Faso toute en valorisant des déchets locaux de la région de Tizi-Ouzou à savoir les margines et les huiles usagées en vue leur dépollution.

Ce travail comporte deux parties, la première partie est relative à l'étude bibliographique et la seconde est réservée à l'étude expérimentale.

L'étude bibliographique comprend deux chapitres, le premier présente des généralités sur la spiruline, le second est réservé aux généralités sur les margines et les huiles usagées.

En ce qui concerne l'étude expérimentale, elle porte sur les différentes expérimentations faites concernant les essais de la culture de *Spirulina platensis* dans les milieux naturels préparés à base des margines, les huiles usagées et la solution des cendres de bois de figuier de la région de Tizi-Ouzou ainsi que les différents résultats obtenus.

Enfin, nous terminons notre étude par une conclusion générale où sont récapitulés les principaux résultats obtenus.

Partie I

Étude bibliographique

I.2 Définition

La spiruline (*Spirulina platensis*) est cyanobactérie, filamenteuse (DANSOU, 2002). Elle appartient à la famille des Cyanophycées. Vu que son biotope est assez particulier, elle pousse naturellement dans les lacs aux eaux natronées et au pH alcalin des régions chaudes (CHARLEMAGNE, 2008).

Datant d'environ 3,5 milliards d'années, la spiruline est parmi les êtres vivants qui ont créé la vie sur terre (LEMKADEM, 2015).

FOX, (1999) a classé la spiruline comme suit:

Règne..... Monera ou Bacteria
 Sous-règne.....Prokaryota
 Phylum ou Division.....Cyanophyta ou Cyanobacteria
 Classe..... Cyanophyceae
 Ordre..... Oscillatoriales
 Famille..... Oscillatoriaceae
 Genre..... *Spirulina*
 Espèce..... *Platensis*

D'après LEMKADEM (2015), la spiruline est plus riche en protéines que la viande, et fait partie de la nourriture traditionnelle des aztèques du Mexique et des kanembus du Tchad.

Le service d'hygiène avait classé la spiruline comme étant un aliment en 1989 (CHARLEMAGNE, 2008).



Figure 1: *Spirulina platensis* vue au microscope photonique (JOURDAN, 2011)

I.2 Composition biochimique

De forts changements dans la composition biochimique des spirulines sont provoqués facilement par les variations de conditions de culture (LEMKADEM, 2015).

La spiruline en poids sec, contient en moyenne jusqu'à 70% de protéines, 11% de lipides, 15 à 25% de glucides, ainsi que des vitamines, des minéraux, de la chlorophylle et des phycobiliprotéines (SGUERA, 2008).

I.2.1 Protéines

Selon les souches et les conditions de culture, la quantité de protéines d'*Arthrospira platensis* varie de 55 à 70 % du poids sec (SGUERA, 2015).

Tableau I: La composition en acides aminés de *Spirulina platensis*. BABADZHANOV et al (2004).

Acides aminés	%	Acides aminés	%
Asparagine	0,9	Méthionine	0,8
Thréonine	0,5	Isoleucine	1,3
Serine	0,6	Leucine	0,8
Glutamine	1	Tyrosine	3,3
Proline	0,3	Phénylalanine	2,5
Glycine	0,6	Histidine	4,7
Alanine	1	Lysine	1,9
Valine	1,3	Arginine	2,1

I.2.2 Phycocyanine

Le mot phycocyanine est originaire du grec, il est divisé en deux mots: «phyco» qui veut dire algue, et «cyanine» qui vient de la couleur cyan, dérivé aussi du grec «kyanos» qui signifie bleu vert (WIHITTON et POTTS, 2000).

Selon RICHMOND et GROBBELAAR (1986), lors de sa dissolution dans l'eau, le pigment donne une couleur bleue brillante avec fluorescence rouge. La phycocyanine est légèrement sucrée, elle n'est pas toxique et ne possède pas d'odeur particulière.

1.2.2.1 Structure chimique

La phycocyanine appartient à un groupe de protéines photorécepteurs appelées phycobiliprotéines (BENAHMED DJILALI, 2012). Ce groupe constitue un pigment le plus abondant de la spiruline représentant plus de 25% de son poids (SGUERA, 2008). (Figure 2)

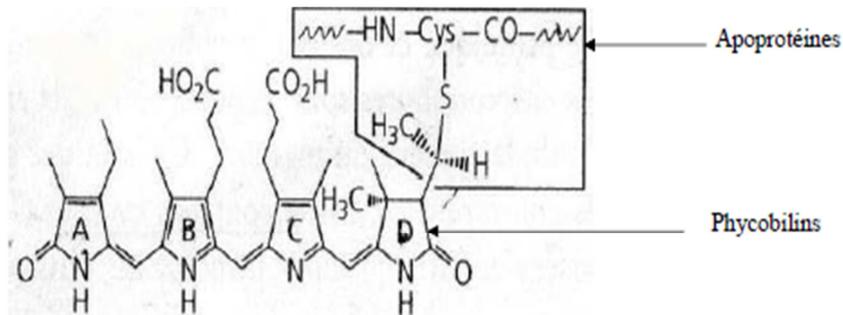


Figure 2: Structure chimique de la phycocyanine (BRUNO DE REVIERS, 2002)

1.2.2.2 Production de la phycocyanine

La production se fait dans des conditions bien déterminées par *Spirulina platensis*, en suivant trois procédés (BENAHMED DJILALI, 2012), (ADEL, 2014).

- Production phototrophe;
- Production hétérotrophe;
- Production mixotrophe.

La quantité de c-phycocyanine est beaucoup plus grande dans les cultures fermées plutôt que dans les cultures ouvertes.

1.2.2.3 Spectre d'absorption de la phycocyanine

Le spectre d'absorption de la phycocyanine montre une bande d'absorption forte à 650 nm, et une seconde plus faible à 550 nm (BENAHMED DJILALI, 2012).

La phycocyanine émet de la fluorescence à environ 650 nm (CONTRERAS *et al.* 2007).

1.2.3 Lipides

La spiruline est considérée comme l'une des meilleures sources alimentaires connues d'acide gras γ -linoléique, après le lait humain et quelques huiles végétales (CRUCHOT, 2008). Ces lipides ne sont pas synthétisés par les animaux, ils sont nécessaires à la croissance normale, au

transport du cholestérol, au développement de la peau, à la digestion (BENAHMED DJILALI, 2012).

I.2.4 Caroténoïdes

Les caroténoïdes sont de longues molécules très hydrophobes, colorées (Jaune à rouge) et possédant un système de doubles liaisons conjuguées.

La spiruline renferme un spectre large de 10 caroténoïdes différents (DOUMENGE et al. 1993).

L'ensemble de ses caroténoïdes travaille en synergie au niveau de l'organisme, pour en augmenter la protection face à l'agression des radicaux libres oxygénés (CRUCHOT, 2008).

I.2.5 Vitamines

Il existe 13 vitamines, 4 liposolubles (A, D, E, K) et 9 hydrosolubles (B1, B2, B5, B6, B12, C, PP). La spiruline contient de nombreuses d'entre elles et spécialement des vitamines B dans des proportions optimales (CHARPY et al. 2008).

Les tableaux ci-dessous résument quelques vitamines constituant la spiruline.

Tableau II: Vitamines liposolubles contenues dans la biomasse de *Spirulina platensis*.
(BABADZHANOV et al 2004).

Vitamines liposolubles	Quantités (mg/100g de matière sèche)
β -carotène (provitamine A)	64 à 200
Tocophérol (vitamine E)	10 à 19
Vitamine D	0,3

Tableau III: Vitamines hydrosolubles contenues dans la biomasse de *Spirulina platensis*.
(BABADZHANOV et al 2004).

Vitamines hydrosolubles	Quantités (mg/100g de matière sèche)
Acide ascorbique (vit C)	195,3
Nicotinamide (Vit B3 ou PP)	0,9
Pyridoxine (Vit B6)	0,5
Riboflavine (Vit B2)	0,2
Thiamine (Vit B1)	0,8
Cyanocobalamine (Vit B12)	0,3
Acide folique (Vit B9)	0,6

I.2.6 Minéraux et oligoéléments

Les minéraux se différencient des oligoéléments par les quantités quotidiennes que nous devons apporter à notre organisme. Les besoins en macroéléments sont de l'ordre du gramme (g) ou du dixième de gramme par jour tandis que ceux en oligoéléments sont de l'ordre du milligramme (mg) ou du centième de milligramme (μg) (SGUERA, 2008).

Tableau IV: Minéraux et oligoéléments contenus dans *Spirulina platensis* (AVINO et al. , 2000).

Éléments	Quantités en (mg/kg) de biomasse sèche
Cr	11,3 à 14,2
Fe	900 à 1176
Mn	554 à 592
Zn	21 à 375
Ca	4320
Cl	4890
K	9000
Mg	670 à 2700
Na	2350 à 4500
P	6700 à 9000

I.3 Culture de la spiruline

Arthrospira (*Spirulina platensis*) est une micro algue procaryote qui est très cultivée dans le monde (BENAHMED DJILALI, 2012). Elle peut être cultivée en milieu naturel, semi naturel (ADEL et al. 2014), ou dans des milieux synthétiques contrôlés par une production à divers échelles (DANSOU, 2002; JOURDON, 2006).

Lorsque tous les éléments nécessaires à la croissance de la spiruline dans un milieu synthétique sont fournis aux bassins de culture on aura une bonne croissance, et ces conditions sont les suivantes: (LEMKADEM, 2015)

- Bassin artificiel;
- Eau et sels minéraux;
- Une source de gaz carbonique qui est nécessaire à la photosynthèse;
- Le CO_2 nécessaire doit se trouver dans le milieu sous forme d'ions carbonate (CO_3^-) ou bicarbonate (HCO_3^-);
- Une source d'azote ;
- Inoculum spiruline (souche);
- Lumière;
- Une agitation ou une roue à aube pour que l'utilisation de la lumière et les sels minéraux par les algues soit optimale;
- Température comprise entre 25 à 40°C, et un pH basique variant de 8,5 à 11.

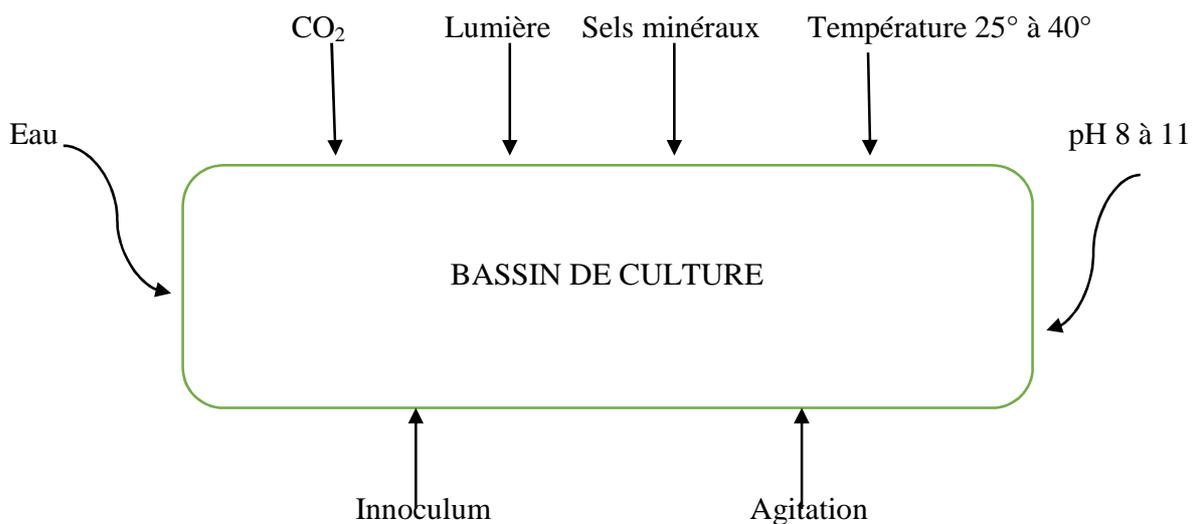


Figure 3: Diagramme des flux pour la culture de la spiruline. (LEMKADEM, 2015)

I.4 Utilisation de la spiruline

La spiruline est un aliment qui présente un intérêt nutritionnel connu, elle est recommandée comme complément alimentaire pour lutter contre la malnutrition. (BENAHMED DJILALI, 2012).

Suite à des recherches génétiques, les scientifiques ont découvert que la spiruline contient beaucoup d'enzymes, parmi elles trois endonucléases de restriction. Ces dernières agissent comme des ciseaux pour couper l'ADN des microbes envahisseurs qui pénètrent dans ses cellules (CRUCHOT, 2008).

Il est à noter que l'endonucléase «Spl-1» est spécifique car elle n'est pas retrouvée chez d'autres bactéries, champignons ou algues (QISHEN, 1988. *In* CRUCHOT 2008).

Généralement, ces enzymes sont utilisées dans des expériences de recombinaison génétique *in vitro* pour introduire des séquences d'ADN d'origine divers dans des plasmides (HENRIKSON.R, 2007. *In* CRUCHOT, 2008).

II.1 Margines

II.1.1 Définition

Les margines sont des effluents liquides, résiduels aqueux, de couleur brune rougeâtre, qui sont transformées en margine de couleur noire, d'aspect trouble. Elles sont caractérisées par un pH acide varie de 4 à 5 (NEFZAOUI, 1987; EROGLU et *al*, 2008 ; HACHICHA et *al*, 2009 ; YAAKOUBI et *al*, 2009 ; YALCUK et *al*, 2010), et parfois elles sont nommées Alpechine. (RAMOS-CORMENZANA et *al*. 1995).

II.1.2 Origine

Les margines sont obtenues lors de l'extraction de l'huile d'olive à partir de l'eau contenue dans le fruit et de l'eau ajoutée au cours du broyage et des étapes de trituration (GALANAKIS et *al* 2010). Elles sont généralement composées de particules de poussière ainsi que des petites quantités de matière grasse issue du fruit plus ou moins abimées. Voire leur faible contenu organique, ces eaux sont facilement recyclables par une décantation simple ou par filtration.

Le pressage de 01 tonne d'olives produit en moyenne de 1.5 tonne de margines avec les modes de production modernes (BENYAHIA et ZEIN, 2003).

On distingue quatre types d'eaux constituant les margines à savoir:

- Eaux de végétation du fruit;
- Eaux de lavage du fruit;
- Eaux de rinçage de trémies de stockage;
- Eaux ajoutées au cours du malaxage;
- Eaux de lavage d'huile.

Les eaux de végétation d'olive constituent 40 à 50% des margines, elles proviennent du fruit d'olive (NEFZAOUI, 1991). Les eaux de lavage sont issues de la dernière centrifugation d'huile suit à un lavage avec une proportion d'eau chaude. Elles représentent l'ensemble des déchets aqueux contenus dans l'huile d'extraction et de l'eau chaude ajoutée.

Les eaux de lavage sont additionnées au déchet liquide généré lors de l'extraction dans le premier décanteur et l'ensemble constituant la margine.

Par contre, dans le cas des huileries avec un système continu à deux phases, ces eaux constituent le seul déchet liquide et qu'il n'y a pas production de margine au cours d'extraction (BERNOU et BOUCENDALA, 2015).

II.1.3 Composition générale

La composition générale des margines est résumée dans le tableau suivant:

Tableau V: Composition des margines (SANSOUCY, 1991).

Composant	Teneur en pourcentage (%)
Eau	83 - 88
Matières organique	10 - 15
Matières minérales	1,5 - 2
Matières azotée totales	1,25 - 2,4
Matières grasses	0,08 - 1
Polyphénols	1 - 1,5

II.1.3.1 L'eau

Les margines sont composées de 40 à 50 % de l'eau végétal qui provient de fruit (olive) et le reste constitue l'eau de fabrication ajoutée lors du processus de trituration (NEFZAOU, 1987).

II.1.3.2 Composition minérale

Généralement les margines sont composées de l'Azote, phosphate, potassium, magnésium (KARAPINAR et WORGAN, 1983).

Le tableau VI présente les teneurs de quelques minéraux présents dans la margine.

Tableau VI: La composition minérales des margines (LUTWIN et *al.* 1996).

Substances minérales	Valeurs (Kg/m ³)
Azote	0,6 à 2
Phosphore	0,5 à 0,1
Potassium	12 à 3,6
Magnésium	0,05 à 0,2

II.1.3.3 Composition organique

La partie organique des margines présente une composition complexe constituée principalement de: Lipides, tanins, sucres, polyphénols et autres composés cités dans le Tableau VII.

Tableau VII: Les substances organiques des margines (FIESTAS et BORJA, 1992).

Substances organiques	Valeurs (%)
Lipides	1 -14
Tannins	8 - 16
Polyphénols	2 - 15
Polyalcools	3 - 10
Protéines	8 - 16
Acides organiques	3 - 10

- **Polyphénols**

Les composés phénoliques (annexe 01) des margines sont très divers et leur structure est très variable. Ils proviennent de l'hydrolyse enzymatique des glucides et des esters de la pulpe d'olive au cours du processus d'extraction. Leur solubilisation dans l'huile est souvent inférieure à celle des eaux de végétation. Les polyphénols sont parfois plus abondants dans les margines que dans l'huile (RAMOS-CORMONZANA, 1986). La concentration en ces composés dépend aussi du temps de stockage avant l'extraction. Plusieurs monomères ont été identifiés dans les margines.

Les polyphénols identifiés dans les margines sont essentiellement : les anthocyanes, la lignine et les tanins (BERNOU et BOUCENDALA, 2015).

II.1.4 Impact des margines sur l'environnement

Les propriétés d'huileries d'olive rejettent leurs margines, chargées en matières organiques et substances toxiques, dans la nature ou dans un réseau de d'égouts sans aucun traitement ce qui détériore le milieu récepteur.

Les margines ont une forte charge polluante, 2Kg d'olives pressés correspondent à la pollution rejetée par une personne, donc l'activité des huileries ont une influence sur la qualité de notre environnement (SCANDIA CONSULT, 1992).

II.1.4.1 Pollution des eaux

Dans la plupart des cas les margines sont rejetées dans des récepteurs naturels (annexe 02) sans aucun contrôle préalable ce qui nuisent la qualité de ces eaux de surfaces .La forte charge en matière organique empêche ces eaux de s'auto-épurer et la pollution peut s'entendre sur de très longues distances (BOUB, 2012). En effet, les margines sont peu dégradables à cause des substances phytotoxiques et antimicrobiennes qu'elles contiennent (VASGUEZ, 1978).

II.1.4.2 Pollution des sols

L'impact direct des margines sur le sol est l'origine de nuisances diverses, leur pH acide, leur salinité élevée ainsi que leur abondances en composés phénoliques qui provoquent la destruction de la microflore du sol et induisent des effets toxiques aux cultures végétales. (FIESTAS, 1981), ceci entraine la stérilisation du sol et le déséquilibre de la symbiose entre la microflore du sol et les plantes. (MORISOT et TURNER, 1986).

II.2 Huiles usagées

II.2.1 Définition

Les huiles lubrifiantes sont des liquides visqueux, ces huiles sont utilisées pour la lubrification des parties mobiles des moteurs et des machines, après un certain temps d'utilisation elles se dégradent et on obtient une huile usagée (MAZOUZI *et al.* 2014)

Les huiles usagées sont définies comme étant des huiles minérales ou synthétiques, qui sont devenues impropres à l'usage auquel elles étaient destinées (DAMIEN, 2009).

II.2.2 Composition

Selon BLIEFERT et PERRAUD (2001), les principales composantes des huiles usagées consistaient en hydrocarbures aliphatique et aromatique, y a également la présence de composés organiques et inorganiques tel que le chlore, le soufre, le phosphore, le brome, l'azote et de métaux, comme le zinc, le magnésium, le baryum et le plomb issus d'additifs et de la contamination en cours de l'utilisation ou l'élimination.

Ces huiles usagées sont de même nature que les huiles lubrifiants introduites initialement dans le moteur, ce qui fait la distinction entre les deux types d'huiles sont les additifs et la viscosité plus élevée. (MOHELLEBI *et al.* 1999).

II.2.3 Effets des huiles usagées sur l'environnement

Les huiles usagées sont classées comme étant des déchets dangereux, leur rejets dans l'environnement est interdit (BALET, 2008).

Elles sont très peu biodégradables et plus légères que l'eau, et ont un pouvoir de couverture de surface très considérable. A titre d'exemple, 1 litre d'huile usagée peut polluer une superficie de 1000 m² d'eau (annexe 03) avec des conséquences suivantes : réduction de l'oxygène, réduction de la lumière dans le milieu (ADDOU, 2009).

II.1 Traitement des huiles usagées

Elles sont classées en tant que déchets dangereux. Une gestion inappropriée de ces huiles peut avoir des effets significatifs à la fois sur la santé et sur l'environnement (MOLETTA, 2009). Ces huiles peuvent être traitées par régénération ou raffinage: 3 litres d'huile usagées donnent 2 litres d'huile régénérées (BALLET, 2008).

Le schéma ci-dessous nous résume les étapes du processus du traitement des huiles usagées.

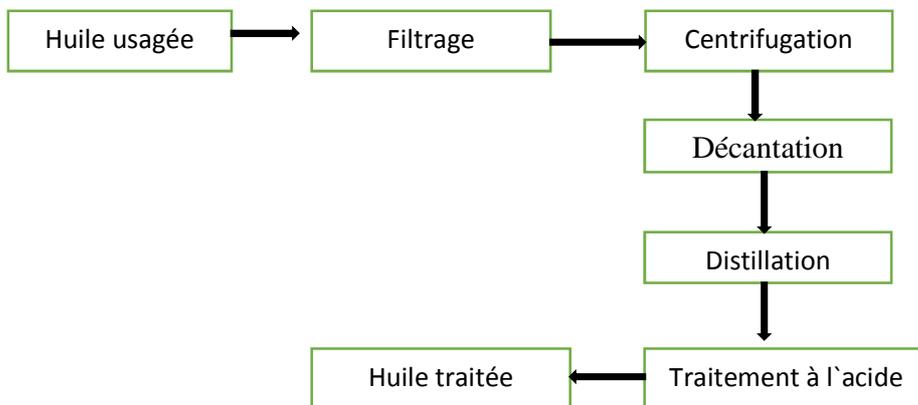


Figure 4: Étapes du processus de traitement. (MAZOUZI et *al.*, 2014)

Étude expérimentale

Matériel et Méthodes

III.1 Matériel biologique

III.1.1 La spiruline

La spiruline (*Spirulina platensis*) (figure 5) dont on dispose est une micro-algue d'origine du Burkina Faso, elle a une forme de petits granulés secs de couleur verte. C'est un produit commercialisé en France.



Figure 5: Aspect de la poudre de la spiruline (*Spirulina platensis*)

III.1.2 Cendres de bois de figuier (*Ficus carica. L*)

Ces cendres sont obtenues à partir du bois de figuier séchés du genre *Ficus carica. L* puis calcinés dans un four à moufle de type (NABERTHERM Controller B 170) à une température de 550°C. Ces cendres (figure 6) sont nécessaires, pour la culture de *Spirulina platensis*. Ces substances constituent une source de sels minéraux:(Na, Ca, Mg, SO₄...), et considérées comme régulateur de l'alcalinité des milieux de culture (pH \geq 10) (BENAHMED DJILALI et BENAMARA, 2013).



Figure 6: Cendres de bois de figuier de la région de Tizi-Ouzou

III.1.3 Margines

Les margines qu'on a utilisé sont délivrées par une huilerie traditionnelle au village Takoucht, commune de Bouzeguène.



Figure 7: Les margines

III.1.4 Huiles usagées

La figure 8 présente la photo d'huile usagée utilisée dans notre étude de couleur noire récupérée dans une station de vidange dans la région de Bouzeguène.



Figure 8: Huile usagée (huile de moteur)

III.2 Méthodes d'analyses

III.2.1 Réactivation de la spiruline sur milieu liquide

Pour la réactivation de la spiruline on a besoin de bicarbonate de sodium ou bicarbonate alimentaire.



Figure 9: poudre de bicarbonate de sodium

- Peser 2g puis 5g de bicarbonate de sodium alimentaire;
- Les deux échantillons sont placés dans deux flacons distincts avec 50ml d'eau distillée chacun;
- Mélanger à l'aide d'un agitateur magnétique jusqu'à obtention d'un liquide homogène;
- Placer les deux flacons dans un autoclave afin de faire une stérilisation;
- Peser une quantité de 4g de spiruline;

- Dans des conditions stériles absolues, on place cette poudre dans un erlenmeyer de 500ml et on ajoute la solution de bicarbonate 2g dans 50ml d'eau distillée pré-stérilisée, ensuite on mélange jusqu'à obtention d'un liquide homogène;
- Après incubation à 37°C pendant 48h;
- On centrifuge, le surnageant est éliminé, le culot est récupéré;
- Ensuite le culot est lavé deux fois avec l'eau physiologique;
- Le culot ainsi obtenu est placé dans un erlenmeyer de 500ml avec la solution de bicarbonate à 5g dans 50ml d'eau distillée pré-stérilisée et tout cela devant un bec bunsen, puis incubé dans l'étuve à 37°C pendant 72h;
- Après incubation, centrifuger et éliminer le surnageant puis laver avec l'eau physiologique, le culot est récupéré, puis ré-suspendu dans 100ml d'eau physiologique (inoculum) (figure 9), puis incubé dans une étuve de type (MEMMERT) à 37°C.



Figure 10: Inoculum obtenu après réactivation de la spiruline

III.2.2 Caractérisation physico-chimique de la poudre de la spiruline

III.2.2.1 Mesure du pH

Le pH d'une solution de spiruline à 4% a été déterminé à l'aide d'un pH mètre de type Inolab préalablement étalonné.

III.2.2.2 Dosage colorimétrique de la phycocyanine

La teneur en phycocyanine a été déterminée par colorimétrie en mesurant l'absorbance DO à 615 nm et DO à 652 nm de la solution de spiruline préalablement centrifugée à 6000 tours/mn (JOURDAN, 2006).

On détermine le poids de la phycocyanine selon la formule suivante:

$$\text{Taux de phycocyanine (\%)} = 1,873 \times (\text{DO } 615 - 0,474 \text{ DO } 652) \times \text{DIL}/\text{C}$$

C : Concentration en spiruline (0,04 g/ml)

D : Facteur de dilution

III.2.3 Préparation des milieux de culture

III.2.3.1 Préparation de la solution de cendres de bois de figuier

- Prendre 4g de cendre de bois de figuier, ajouter 100ml de d'eau distillée stérile;
- Porter à ébullition, ensuite filtrer.

A la fin on obtient cette solution (figure 10) avec un pH = 12.

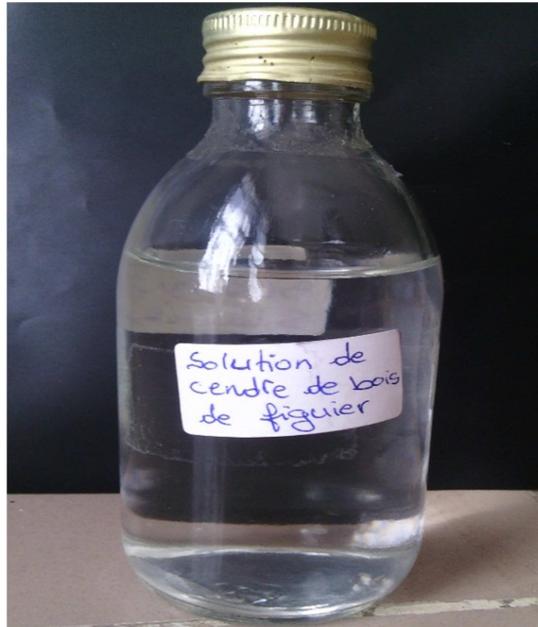


Figure 11: Solution filtrée de cendres de bois de figuier

III.2.3.2 Préparation des milieux à base de la solution des cendres de bois de figuier, les margines et l'huile usagée.

- **Margine**

Une quantité de 100ml de margine a été versée dans un erlenmeyer de 250ml, sans ajout de solution de cendre de bois de figuier.

Une autre quantité de margine a été ajustée à 100ml avec la solution de cendres de bois de figuier, afin de nous permettre de faire les prélèvements pour le suivi de la croissance de la spiruline. Ces deux milieux ont subi une tyndallisation à 65°C pendant une heure durant trois jours.



Figure 12: photo des milieux à base de la margine

- **Huiles usagées**

Une quantité de 100ml d'huile usagée a été versée dans un erlenmeyer de 250ml, sans ajout de solution de cendre de bois de figuier.

Une autre quantité de d'huile usagée a été ajustée à 100ml avec la solution de cendre de bois de figuier, afin de nous permettre de faire les prélèvements pour le suivi de la croissance de la spiruline. Ces deux milieux ont subi une tyndallisation pendant une heure durant trois jours.



Figure 13: Photo des milieux préparés à base d'huile usagée

III.2.4 Culture de spiruline

Une quantité de 10ml d'inoculum a été ajoutée à chaque milieu déjà préparé, et incubé dans une étuve à 37°C pendant une durée de 14 jours.

III.2.5 Suivi de la culture

III.2.5.1 Mesure du pH

Le pH des deux milieux a été mesuré initialement à t_0 (avant l'ajout de l'inoculum), puis un prélèvement a été fait tous les deux jours, et le pH a été mesuré avec un pH mètre de type Inolab (figure 14).



Figure 24: photo du pH mètre de type (Inolab).

III.2.5.2 Estimation de la phycocyanine

La DO des cultures a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre de type (VIS-7220G) (figure 15) à des longueurs d'ondes différentes (615 nm et 625 nm).



Figure 15: Spectrophotomètre (VIS-7220G).

III.2.5.3 Analyse de la composition chimique de la spiruline obtenue (IR)

Les poudres de spirulines obtenues à la fin de culture dans les deux milieux (margine et vidange) ont été analysées par infrarouge.

III.2.5.4 Rendement en spiruline

On sépare la spiruline des margines par centrifugation de type SIGMA (6000 tours/mn), suivi d'un lavage à l'eau physiologique stérile et l'eau distillé plusieurs fois afin d'éliminer les impuretés (CIFFERI, 1983). Le culot est récupéré puis pesé. Pour l'huile usagée la séparation des deux phases qui sont huile et la spiruline se fait dans une ampoule à décanter, ensuite la matière fraîche est pesée. Le culot ainsi obtenu est séché dans l'étuve à 45°C.



Figure 16: Séparation de la spiruline de l'huile usagée au moyen d'une ampoule à décanter.

III.2.5.5 Test de l'Activité antimicrobiennes des poudres de spiruline obtenues

On prépare deux extraits aqueux à base des poudres de spiruline issues de la culture dans les deux milieux optimisés à raison de 0,2g dans 10 ml d'eau distillée stérile. Les deux extraits sont testés vis-à-vis des souches suivantes: *Pseudomonas*; *Staphylococcus aureus*; *Escherichia coli* et vis-à-vis du champignon *Candidas albicans*. Les souches ont été fournies par le laboratoire de microbiologie de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.

III.2.6 Recyclage des milieux pour la culture de spiruline à 37°C et à température ambiante

A la fin de la culture, on réalise un deuxième cycle de culture dans les substances résiduelles des deux milieux utilisés dans le premier cycle de culture de spiruline et ce en vue une valorisation totale et dégradation totale des substances organiques par la spiruline.

Un volume de 10ml d'inoculum a été ajouté dans 100ml de chaque milieu recyclé, ensuite on incube chaque milieu à deux températures (température ambiante et à 37°C).

III.2.6.1 Suivi de la culture

Un prélèvement a été réalisé chaque deux jour afin de mesurer le pH et le taux de phycocyanine de différents milieux utilisés.

III.2.6.2 Rendement en spiruline

La biomasse fraîche est récupérée puis lavée avec l'eau physiologique ensuite séchée dans une étuve à 45°C et pesée.

*Partie III : Résultats et
discussion*

IV.1 Caractérisation des matières premières

IV.1.1 Caractérisation physico-chimique de la poudre de spiruline

➤ *Le pH*

La spiruline utilisée dans la présente étude présente un pH égal à celui recommandé par les normes françaises qui varie entre 7 et 9. Ce pH alcalin est dû aux conditions de séchage appropriées. Cependant ce pH alcalin représente deux avantages: meilleur absorbance de gaz carbonique de l'air, et une protection contre les contaminations (JOURDAN, 2011).

➤ *Dosage colorimétrique de la phycocyanine*

La phycocyanine absorbe dans une zone allant de 614 à 653nm, elle représente un taux de $19,34 \pm 0,36$ % pour 4g de matière sèche. Selon. La valeur est supérieure à 10% de qui est en accord avec JOURDAN (2006). La phycocyanine est le pigment le plus abondant chez les algues bleues représentant plus de 15% de son poids (SGUERA, 2008).

IV.1.2 Caractérisation physicochimique des milieux préparés

IV.1.2.1 Le pH

Les valeurs du pH des milieux utilisés pour la culture sont résumées dans tableau VIII.

Tableau VIII: Résultats du pH des milieux de culture de spiruline

Milieu	Milieu à base d'huile usagée + solution cendres de bois de figuier	Milieu à base de margines + solution cendres de bois de figuier
pH	8,89	8,38

Le pH des deux milieux est convenable pour le développement de la spiruline (FALQUET, 1999).

IV.2 Suivi de la culture de la spiruline

IV.2.1 Évaluation de la culture de spiruline dans les milieux à base des margines et l'huile usagée à 37°C

Tableau IX: Résultats de culture de spiruline dans les milieux à base de margine et huile usagée à 37°C

Milieux incubés à 37°C	Milieu à base d'huile usagée + solution cendres de bois de figuier	Milieu à base de margines + solution cendres de bois de figuier
pH final	8,33 ± 0,08	8,13 ± 0,01
Taux de phycocyanine (%)	25 ± 1,03	29 ± 0,91

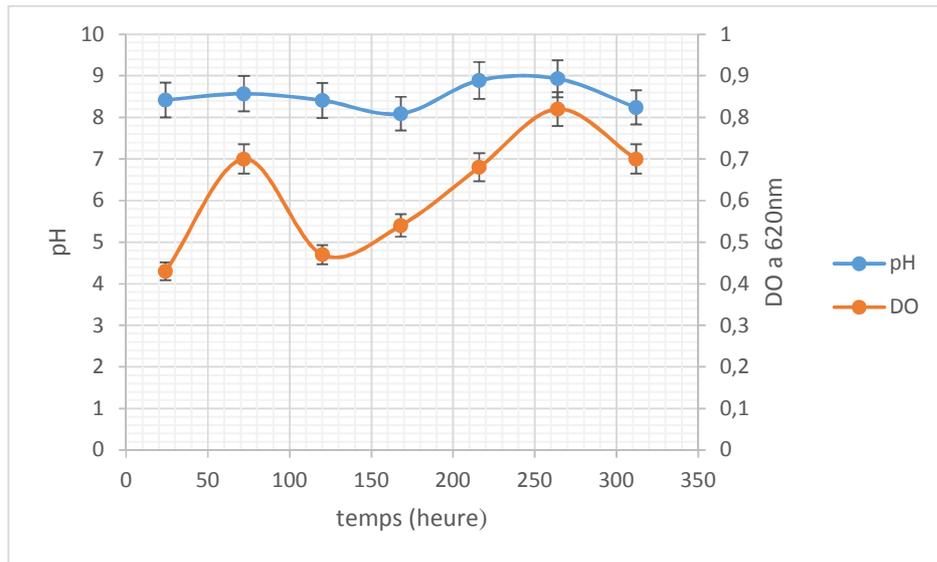
D'après ces résultats, les deux milieux présentent des valeurs de pH qui sont presque identiques. Ces valeurs de pH présentent la limite inférieure requise pour le développement de la spiruline (BENAHMED DJILALI, 2012).

Cette alcalinité est apportée par la solution de cendres de bois de figuier qui présente un pH de 12, elle sert aussi comme source de minéraux pour la spiruline.

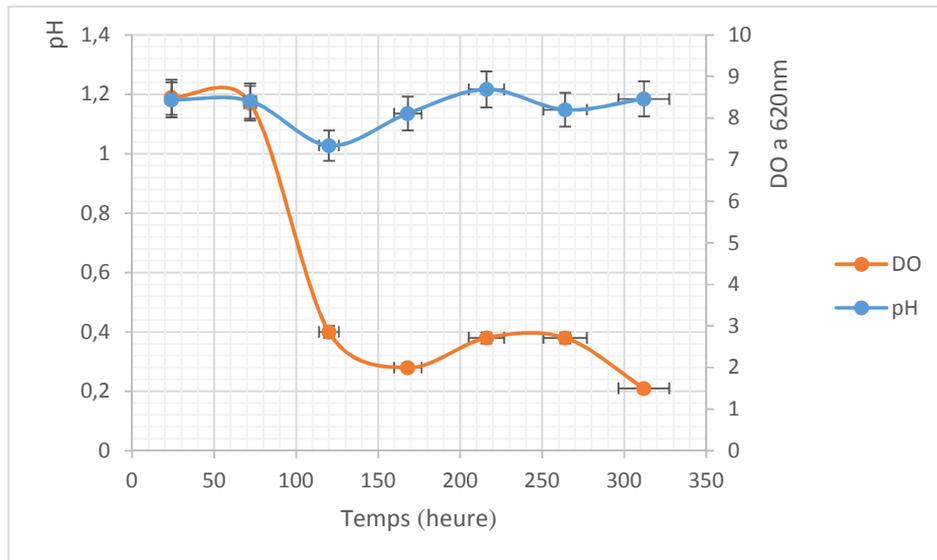
Le taux de phycocyanine est un peu plus important dans le milieu à base des margines, il représente une valeur de 29%. Selon JOURDAN (2006), pour une bonne croissance de la spiruline le milieu de culture doit contenir une certaine quantité de substances minérales tels que: l'azote, le phosphore, le magnésium, et le potassium...etc. Généralement, les margines sont riches en ces éléments minéraux (LUTWIN et *al.* 1996).

La température d'incubation respectée est idéale pour la croissance de la spiruline.

La figure 16, présente la variation du pH et la croissance de dans les deux milieux optimisés à 37°C.



a)



b)

Figure 17: Évolution du pH et de la croissance de la spiruline dans les milieux à base des margines (a) et d’huile usagée (b).

D’après la figure17, nous constatons que, la croissance de la spiruline diminue après 4jours de culture dans le milieu à base des margines, puis elle reprend la croissance après 2 jours de culture. Cette diminution est due à l’abaissement du pH du milieu.

Selon JOURDAN (2011), la croissance est influencée par le pH du milieu.

Pour le milieu à base d'huile usagée, nous constatons aussi une diminution de la croissance après 4 jours, mais l'inhibition n'est pas en relation avec l'abaissement du pH au contraire on observe une augmentation du pH. L'inhibition peut s'expliquer par d'autres facteurs citant le cas de SAGAY (2008), a utilisé le milieu ZARROUK, a pu montrer que, la variation de la température peut entraîner des variations dans la croissance de l'algue, dans notre cas cette inhibition de croissance peut-être due à des fluctuations de la température au niveau de l'étuve.

IV.2.2 Évaluation de la culture de la spiruline dans les deux milieux à base de margine et huile usagée à température ambiante.

Tableau X: Résultat de la culture de la spiruline dans les deux milieux à base des margines et l'huile usagée à température ambiante

Milieux incubés à température ambiante	Milieu à base d'huile usagée + solution cendres de bois de figuier	Milieu à base de margines + solution cendres de bois de figuier
pH	7,64 ± 0,28	7,78 ± 0,35
Taux de phycocyanine (%)	30 ± 0,30	21 ± 0,30

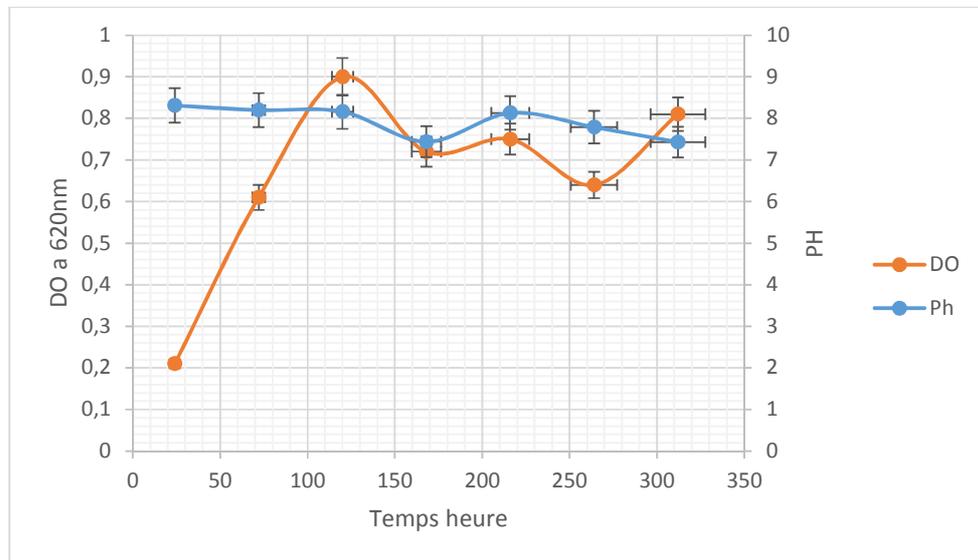
Nous remarquons d'après ce tableau, une baisse du le pH dans les deux milieux (Figure 18). Cette chute est due au dégagement du CO₂ dans les milieux de culture par la spiruline lorsque la respiration est intense (FOX, 1986).

En parallèle, on distingue une forte production de phycocyanine dans le milieu à base d'huile usagée. Cette production est proportionnelle à la biomasse formée dans ce milieu. En comparaison avec le milieu à base de margines, la production est moins importante.

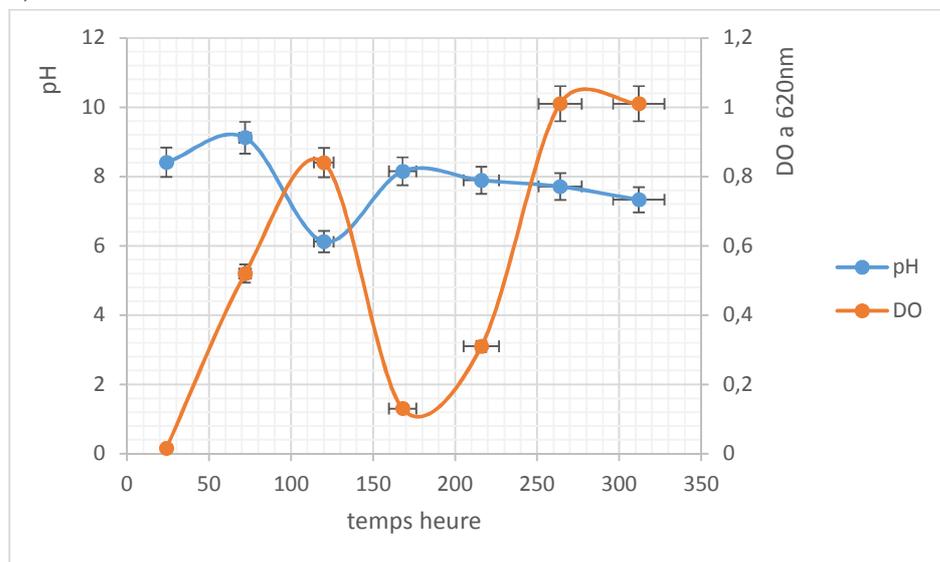
Néanmoins, le milieu à base d'huile usagée génère un taux de phycocyanine similaire à celui obtenu en utilisant le milieu préparé à base des margines et cultivé à 37°C.

Nous pouvons déduire ici que, la température n'affecte pas le rendement en phycocyanine contrairement c'est la composition du milieu.

Nos résultats coïncident à ceux signalés par ADEL et *al.* (2014) qui ont cultivé la spiruline dans un milieu à base des produits du palmier dattier à faible coût dans le climat de l'Arabie saoudite, la température minimale qui permet la croissance est d'environ 18°C.



a)



b)

Figure 18: Évolution du pH et la croissance de la spiruline dans les milieux à base des margines (a) et l'huile usagée (b) à température ambiante.

IV.2.3 Recyclage des milieux pour la culture de spiruline à 37°C et à température ambiante

Les paramètres de culture après le recyclage sont résumés dans les tableaux suivants :

Tableau XI: paramètres de culture de spiruline dans les milieux recyclés à 37°C

Milieux incubés à 37°C	Milieu à base d'huile usagée recyclée	Milieu à base des margines recyclées
pH final	7,32 ± 0,08	7,34 ± 0,09
Taux de phycocyanine (%)	31 ± 0,26	24 ± 0,80

Tableau XII: paramètres de culture de spiruline dans les milieux recyclés à température ambiante

Milieux incubés à T° ambiante	Milieu à base d'huile usagée recyclée	Milieu à base des margines recyclées
Ph final	8,42 ± 0,34	7,74 ± 0,41
Taux de phycocyanine (%)	24 ± 0,53	20 ± 0,49

On remarque une diminution du pH dans tous les milieux recyclés. Cette baisse du pH peut être due soit au manque du carbonate et de bicarbonate dans les milieux ou au dégagement de CO₂ (CHARPY *et al.* 2008).

Selon HALDEMANN (2004), le recyclage du milieu de culture posait des problèmes de salissure du milieu de culture. Notamment, la charge en matière organique relative à la filtration, et aussi un manque de bicarbonate dans le milieu recyclé.

Cependant, dans notre cas il y a eu une production de phycocyanine plus moins importante, notamment dans les deux milieux recyclés température ambiante. Ceci peut-être dû à la richesse

du milieu en bicarbonate. Ces résultats confirment que, la température n'influence pas la production de phycocyanine.

- **Taux de croissance de spiruline dans les deux milieux utilisés**

Le taux de croissance (μ_{\max}) de spiruline est calculé à partir de la droite tracée pendant la phase exponentielle caractérisant la croissance dans chaque milieu de culture ($DO = \text{tg } \alpha * t$). ($\text{Tg } \alpha = \mu_{\max}$)

Les résultats de μ_{\max} trouvés sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau XIII: Taux de croissance de la spiruline cultivée dans les deux milieux optimisés.

Milieu	$\mu_{\max} (\text{h}^{-1})$	
	A 37°C	A T° ambiante
Milieu à base des margines	0,0025 ± 0,01	0,0072 ± 0,04
Milieu à base d'huile usagée	0,0021 ± 0,02	0,0092 ± 0,01

Nous pouvons déduire de ces résultats que, le taux de croissance est affecté par la nature et la composition du milieu de culture mais non la température. Cela confirme nos résultats précédents.

IV.3 Rendement en spiruline

Les tableaux ci-dessous représentent le rendement en matières fraîches et sèches de spiruline cultivée dans les deux milieux à T= 37°C et à température ambiante.

Tableau XIV: matières fraîches et sèches des spirulines obtenues dans les deux milieux à base des margines et d'huile usagée à 37°C.

Température		37°C		Recyclage à 37°C	
Milieux		Milieu à base d'huile usagée	Milieu à base des margines	Milieu à base d'huile usagée	Milieu à base des margines
Poids en gramme	MF	2,2 ± 0,01	5 ± 0,02	1,8 ± 0,02	2,1 ± 0,08
	MS	0,22 ± 0,03	0,5 ± 0,01	0,81 ± 0,01	1,63 ± 0,06

MF: Matière fraîche de la spiruline.

MS: Matière sèche de la spiruline.

Tableau XV: matières fraîches et sèches des spirulines obtenues dans les deux milieux à base des margines et l'huile usagée à température ambiante.

Température		Température ambiante		Recyclage a T° ambiante	
Milieux		Milieu à base d'huile usagée	Milieu à base des margines	Milieu à base d'huile usagée	Milieu à base des margines
Poids en gramme	MF	1,4 ± 0,01	1,63 ± 0,03	0,5 ± 0,04	1,5 ± 0,02
	MS	0,09 ± 0,02	0,05 ± 0,02	0,1 ± 0,02	0,4 ± 0,01

Les tableaux XIV et XV révèlent que, les rendements en matières sèches (Figure 21) sont importants à 37°C pour les deux cas d'utilisation des milieux soit pour la première fois ou recyclés. En comparaison à la culture dans les mêmes milieux à température ambiante.

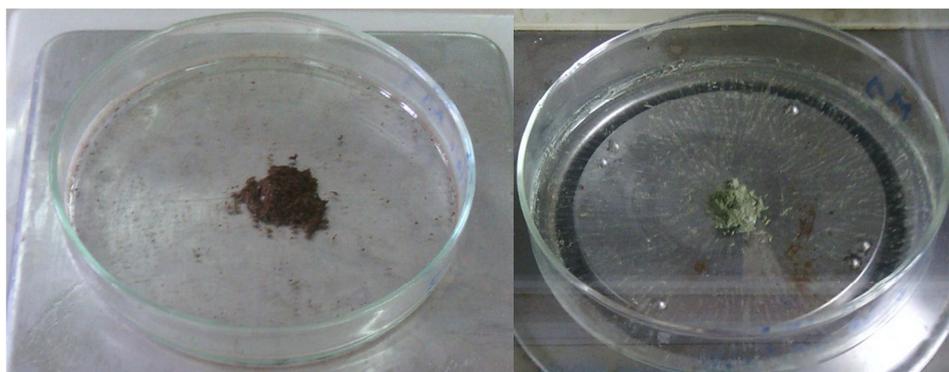


Figure 19: photo représentant la matière sèche de la spiruline (à gauche matière sèche issue du milieu de margine; à droite matière sèche issue de huile usagée) (originale).

Nous constatons une différence dans la couleur des deux poudres obtenues. La couleur de la spiruline issue des margines est de couleur brune foncée possède assez de pigments et d'impuretés. Par contre, la spiruline issue d'huile usagée, a une couleur bleu vert ce qui signifie qu'il y a présence de la phycocyanine qui est la source de cette couleur.

IV.3.1 Analyse de la composition chimique de la spiruline

L'analyse infrarouge d'un échantillon d'origine biologique est une méthode qualitative rapide qui permet de révéler la présence de certains groupements fonctionnels caractéristiques (BENAHMED DJILALI, 2012).

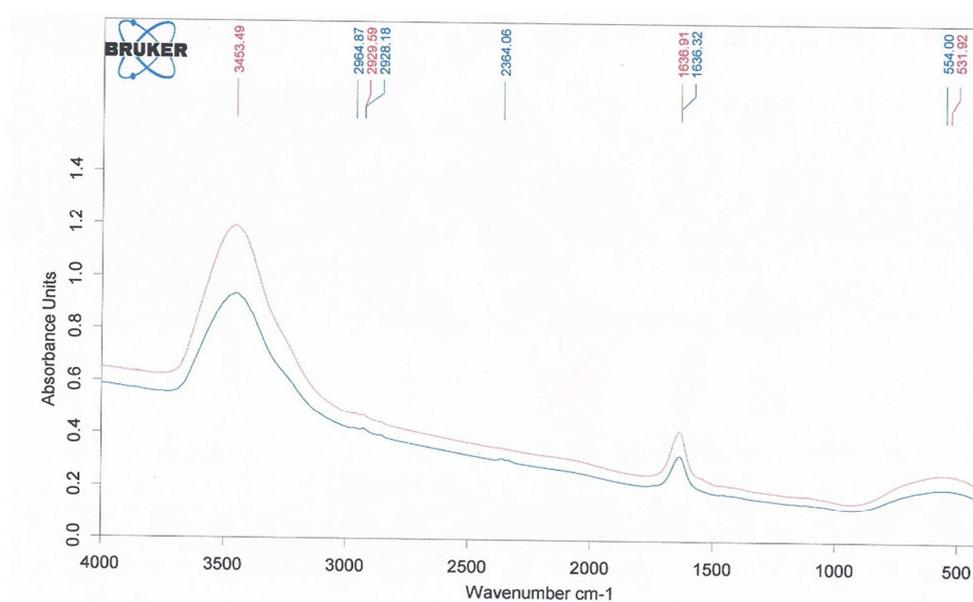


Figure 20: Spectre d'absorption IR de spirulines issues des milieux à base des margine et d'huile usagée

L'analyse IR (figure 20) montre une différence dans la position et l'intensité des pics des deux poudres. Cette différence est attribuée aux conditions de culture et les propriétés génétiques des deux poudres.

Les spectres IR montrent une bande caractéristique à $3453,49 \text{ cm}^{-1}$ approximativement pour les deux poudres analysées. Cette bande est attribuée à la structure du groupe hydroxyle (O-H). L'intensité du pic de la poudre de spiruline cultivée dans les huiles usagée est plus importante en comparaison avec celle cultivée dans les margines. La présence des groupes hydroxyles indique la teneur en humidité absorbée par les deux espèces.

Les spectres IR indiquent aussi une bande caractéristique à 1636 cm^{-1} approximative pour les deux espèces analysées. Cette bande est attribuée à la structure du groupe carbonyle (C=O) acide uronique.

L'intensité du pic de la poudre de spiruline cultivée dans le milieu à base d'huile usagée est plus importante en comparaison à celle issue du milieu à base de margine.

Nos résultats ne sont pas conformes avec les résultats du spectre d'absorption IR de la spiruline burkinabé (souche de référence) réalisé par BENAHMED DJILALI, 2012 car cette dernière contient les groupements amine, carboxylique, hydroxyle et les phosphates. La spiruline qu'on a obtenu dans les deux milieux contient des groupements hydroxyle et carbonyle. On recommande de les utiliser en agriculture comme source de carbone.

IV.3.2 Résultats de l'analyse antibactérienne de la spiruline

Le tableau XVI montre les diamètres d'halo inhibition des poudres de spirulines issues des deux milieux de culture

Tableau XVI: Diamètre moyen d'halo d'inhibition en mm de la poudre de spiruline (0,2mg/ml, Ø=7mm, V=20µl)

Nature de la spiruline	<i>P. Aeruginosa</i>	<i>S. Aureus</i>	<i>E. Coli</i>	<i>Candida</i>
Spiruline issue du milieu à base d'huile usagée	-	9	5	9
Spiruline issue du milieu à base de margines	-	-	-	-
Spiruline burkinabé	14	10,66	-	-

L'extrait de spiruline issue du milieu à base de margine ne présente aucune zone d'inhibition contre les souches testées.

L'extrait de spiruline issue du milieu à base des huiles usagées présente de faibles zones d'inhibition (9, 5 et 9) et cela juste vis-à-vis de trois souches *S. aureus*; *E. Coli* et *Candida* respectivement.

L'extrait de la spiruline de référence induit des zones intermédiaires respectivement (14 et 10,66) vis-à-vis *P. aeruginosa* et *S.aureus*. Cette activité est en relation avec la présence de substances actives (phycocyanine).



Figure 21: Photo montrant les zones d'inhibition de la poudre de spiruline issue du milieu à base d'huile usagée

Candida; *E. Coli* et *S. Aureus* (de gauche à droite).

Conclusion générale

Conclusion générale

Conclusion générale

Au vu des résultats obtenus, la culture de la spiruline (*Spirulina platensis*) dans les milieux margine et les huiles usagées s'avère possible.

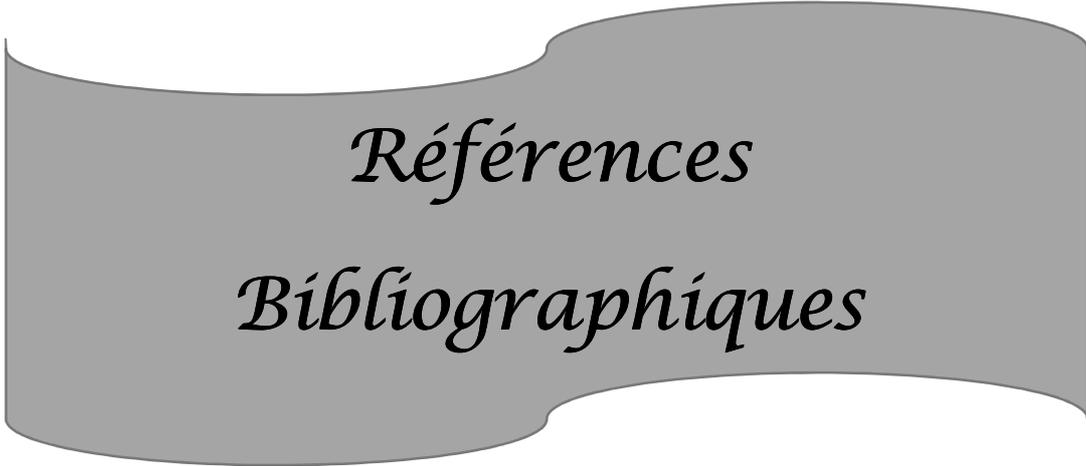
Cette étude a permis de faire les analyses physicochimiques de la poudre de spiruline burkinabés, qui est riche en protéines et en phycocyanine.

A préciser que l'essai de culture de la spiruline dans les milieux à base d'huiles usagée et des margines avec les cendres de bois de figuier à des températures différentes (à 37°C et à température ambiante) a donné un rendement en biomasse de spiruline plus important que ceux obtenus dans la culture utilisant les milieux recyclés.

L'identification des groupements fonctionnels par IR des poudres de spirulines obtenues à partir des deux milieux révèle la prédominance pour les deux espèces des groupes hydroxyles et des groupes carbonyles.

Enfin la sensibilité des trois souches (*Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* et *Escherichia Coli*), vis-à-vis de la poudre de spiruline obtenue dans le milieu a base des huiles usagées a été déterminée. Il est intéressant d'étudier l'effet d'autres paramètres tels que l'aération, l'agitation sur la croissance de cette souche. Identifier génétiquement, morphologiquement et le profil protéique des spirulines obtenues.

Conclusion générale



Références

Bibliographiques

Références bibliographiques

- **ADDOU A. (2009).** Traitement des déchets valorisation, élimination. Technosup. 1^{ère} Edition, Ellips, Paris.
- **ADEL A. THARWAT AND SALEH M. ALTURKI (2014).** Spirulina Platensis Production Using Date Palm Substances and Low Cost Media in the Climatic Conditions of Saudi Arabia. *Advances in Environmental Biology*. 8(7), 2350-2356.
- **AVINO P., CARCONI P.L., LEPORE L., MOAURO A. (2000).** Nutritional and environmental properties of algal products used in healthy diet by INAA and ICP-AES. *Journal of Radio analytical and Nuclear Chemistry*. 244 (1): p. 247-252.
- **BABADZHANOV A.S., ABDUSAMATOVA N., YUSUPOVA F.M., FAIZULLAEVA N., MEZHLUMVA L.G. and MALIKOVA M. Kh. (2004).** Chemical composition of *Spirulina platensis* cultivated in Uzbekistan *Chemistry of Natural Compounds.*; 40 (3): 276-279.
- **BALLET J.M. (2008).** Aide-mémoire. Gestion des déchets. 2^{ème} Édition. DONUD. Paris.
- **BENAHMED DJILALI A. (2012).** Analyse des aptitudes technologiques de poudres de dattes (*Phoenix-dactylifera*. l) améliorées par la spiruline. Étude des propriétés rhéologiques, nutritionnelles et antibactériennes. Thèse de doctorat. Université M'Hamed Bougara. Boumerdes. Algérie.
- **BENAHMED DJILALI A. et BENAMARA S. (2013).** Culture de *Spirulina platensis* dans un milieu naturel à base de cendres de bois. *Ed Univ Euro ISBN -10 6131517800*, ISBN 613: 978-6131517808, PP 14.
- **BLIEFERT C. et PERRAUD R. (2001).** Chimie de l'environnement, air, eau, sols, déchets. Boeck & Larcier, 1^{ère} édition, Boeck, Bruxelles.
- **BENYAHIA N. ET ZEIN K. (2003).** Analyse des problèmes de l'industrie de l'huile d'olive et solutions récemment développées. 2^{ème} Conférence International Suisse Environnemental Solution. Lausanne, Suisse.
- **BERNOU A. et BOUCENDALA M. (2015).** Essai et traitement des effluents d'huilerie d'olive par l'adsorption et combinaison avec le procédé Fenton. Diplôme de master. Université A. M. OULHADJ, Bouira. Algérie.

Références bibliographiques

- **BLIEFERT C. et PERRAUD R. (2001).** Chimie de l'environnement, air, eau, sols, déchets. Boeck & Larcier, 1^{ère} édition, Boeck, Bruxelles.
- **BOUB S. (2012),** marge 4 du 27 Janvier.
- **BRUNO DE REVIERS, (2002).** Biologie et phylogénie des algues. GDI: Berlin, Tome:1, 119-120.
- **CHARLEMAGNE D. (2008).** La spiruline: aliment sante. Mémoire de fin d'étude. Faculté? de pharmacie. Dijon. France.
- **CHARPY L., LANGLADE M.J., et ALLIOD R. (2008).** La spiruline peut elle être un atout pour la santé et le développement en Afrique?. Institute de recherché pour le développement. Marseille, France.
- **CHEN T. and WONG Y.S. (2008).** In vitro antioxidant and antiproliferative activities of Selenium-containing phycocyanin from Selenium-enriched *Spirulina platensis*. Journal agric food chemistry. 56(12).4352-4358.
- **CONTERAS-MARTEL C., MATAMALA A., BRUNA C., POO-CAAMANO G., ALMONACID D., FIGUEROA M., MARTINEZ-OYANEDEL J., et BUNSTER M. (2007).** The structure at 2 Å resolution of phycocyanin from *Gracilaria chilensis* and the energy transfer network in a PC. PC complex. Journal. Biophys. Chem. (125), 388-396.
- **CRUCHOT H. (2008).** La spiruline bilan et perspectives. Thèse de doctorat. Université de médecine et de pharmacie de Besancon. Franch-Compte. France.
- **DAMIEN A. (2009).** Guide du traitement des déchets. Nouvelle usine, 3^{ème} Édition, DONUD, Paris, France.
- **DANSOU D.K. (2002).** Développement de la culture de la spiruline (*spirulina platensis*) et valorisation de celle-ci au Burkina Faso. Diplôme d'études supérieures spécialisées. Unité de formation et de recherche en sciences de la vie et de la terre. Ouagadougou. Burkina Faso.
- **DOUMENGE F, DURAND-CHASTEL H, TOULMONT A. (1993)** Spiruline, algue de vie/ Spirulina, algae of life. Bulletin de l'Institut Océanographique de Monaco ; numéro spécial 12. Monaco : Musée Océanographique.

Références bibliographiques

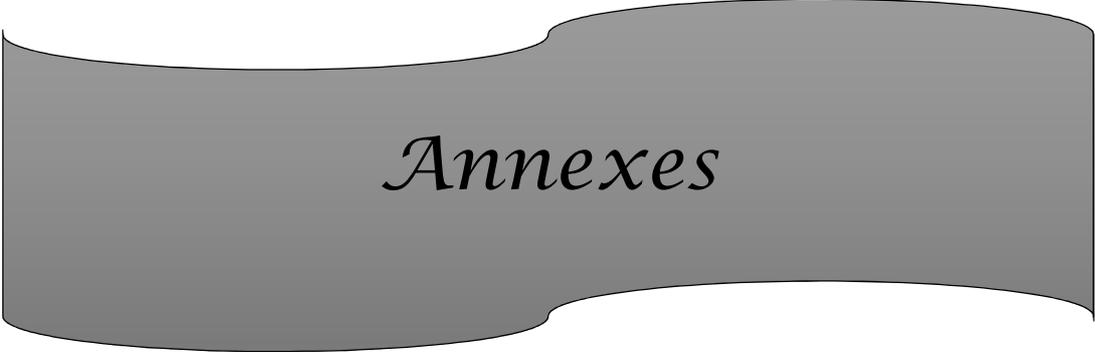
- **EROGLU E., EROGLU I., GUNDUZ U. and YUCEL M. (2008).** Effect of clay pre-treatment on photo fermentative hydrogen production from olive mill wastewater. *Bio resource Technology*, 99: 6799-6808.
- **FIESTAS RAS DE URSINOS J. A, BORJA R. (1992),** use and treatment of olive mill wastewater: current situation and prospects in Spain. *Greases y ascites*, 2, 101-106.
- **FOX R.D., 1986.** Algoculture : la spiruline, un espoir pour le monde de la faim. Edi sud, Aix-en-Provence, ISBN 2-85744-262-9, 319 p.
- **Fox R.D. (1999);** *Spiruline, Technique pratique et promesse.* Aix en Provence: Edisud.
- **GALANAKIS C.M., TORNBERG E. and GEKAS V. (2010).** A study of the recovery of the dietary fibres from olive mill wastewater and the gelling ability of the soluble fibre fraction. *LWT. Food Sci. and Tech.*, 43:1009-1017.
- **HACHICHA R., HACHICHA S., TRABELSI I., STEVE WOOD WARD B. and 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. *Chemosph.* 75: 1382-1386.
- **HALDEMANN F. (2004).** Production industrielle en Equateur: colloque international, sur les cyanobactéries pour la sante. *La science et le développement*, 12(17), 86-87.
- **JOURDAN J.P. (2006).** Manuel de culture artisanale pour la production de spiruline. Diplome M.I.T. Industrie chimique. Paris, France.
- **JOURDAN J.P. (2011).** Manuel de culture artisanale pour la production de spiruline. Diplome M.I.T. Industrie chimique. Paris, France.
- **KARAPINAR M., WORGAN M.J.T, (1983):** Bioproteine production from the waste products of olive oil extraction, *J. chem Tech Biotechnol*: 33, 185-188.
- **KEBBAB R. (2014).** Étude du pouvoir antioxydant des polyphénols issus des margine d'olive de la variété chamlal: évaluation de l'activité avant et après deglycosylation. Diplôme de magister. Université mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou, Algérie.
- **LEMKADEM I. (2015).** Valorisation de la spiruline (micro algue) par séchage solaire. Mémoire master académique. Université Kasdi merbah. Ouargla. Algérie.

Références bibliographiques

- **MAZOUZI R., KHELIDJ B., KARAS A., et KELLACI A. (2014).** Régénération des huiles lubrifiantes usagées par processus de traitement à l'acide. Les énergies renouvelables. 4(17). 631-637.
- **MOHELLEBI F., BOUCHEKHOUL A., HARBIL N., HADJOU DJ R. et CHITOUR C.E., 1999.** Étude de la purification d'huile usagées de type «moteur» au moyen d'une argile montmorillonitique. Oil & Gas science and technology D Rev. IFP, 3(54). 403-418.
- **LUTWIN B. FIESTAS ROS DE URSINOS J.A, GEISSEN K., KACHOURI M., KLIMM E., DELADORDE MONPEZAT G., XANTHOULIS D., (1996),** Les expériences méditerranéennes dans le traitement et l'élimination des eaux résiduelles des huileries d'olives, Éditions (GTZ) GmbH, Esch Born, République Fédérale d'Allemagne.
- **MORISOT A., TOURNIER J., (1986),** Répercussions agronomique de l'épandage d'effluent et déchets de moulins à huile d'olive; agronomie.
- **MOLETTA R. (2009).** Le traitement des déchets. Lavoisier. 1^{ère} ED, TEC & DOC. Paris, France.
- **NEFZAOUI A. (1987).** Contribution à la rentabilité de l'oléiculture par la valorisation optimale des sous-produits; Séminaire sur l'économie de l'olivier, Tunisie.
- **NEFZAOUI A. (1991),** Valorisation des sous-produits de l'olivier: 16 option méditerranéenne, 101-108.
- **OLAV S.G et NIELS T.E. (2007).** Heterotrophic high-cell-density fed-batch and continuous-flow cultures of *Galdieria sulphuraria* and production of phycocyanin. Biotechnological products and process engineering, 77(2), 69-75.
- **QISHEN P. (1988).** Enhancement of endonuclease activity and repair DNA synthesis by polysaccharide of spirulina. Chinese Genetics Journal; 15 (5): 374-381.
- **RAMOS-CORMANZANA A. (1986),** Physical, chemical, microbiological and biochemical characteristics of vegetation water. In: Inter. Symp.: on olive by products valorization. Seville. Spain, 41-60.
- **RAMOS-CORMENZANA A., MONTEOLIVA-SANCHEZ M., and LOPEZ M.J. (1995).** Bioremediation of Alpechin. Inter. Biodeter & Biodeter. 14: 249-268.
- **RANALLI A. (1991),** the effluent from olive mills: proposals for re-use and purification with reference to Italian legislation; Olivariae: 37, 30-39.

Références bibliographiques

- **RICHMOND A. et GROBBELAAR J.U. (1986).** Factors affecting the output rate of *Spirulina platensis* with reference to mass cultivation. *Biomasse*. Vol 10, 253-264.
- **SAGGAI A. (2008),** compatibilité des eaux des nappes de la région d'Ouargla pour la culture de spiruline *Arthrospira Platensis* (Souche de Tamanrasset). Magister en agronomie saharienne. Université Kasd Merbah. Ouargla, Algérie.
- **SANSOUCY R. (1991),** Problèmes généraux de l'utilisation des sous-produits agro industriels en alimentation animal dans la région méditerranéenne.
- **SCANDIA CONSULT, (1992);** projet de gestion de l'environnement, Étude Institutionnelle, Juridique et de la pollution; rapport de consultant préparé par groupement SWEEP SCANDIA CONSULT, Suède, commandite par la Banque mondiale.
- **SGUERA S. (2008).** *Spirulina platensis* et ses constituants intérêts nutritionnels et activités thérapeutiques. Thèse de doctorat en pharmacie. Université Henri Poincaré. Nancy. France.
- **SHALL M., DANKOKO B., BADIANE M., EHUA E., KUAKUWI N. (1999).** La spiruline: une source alimentaire à promouvoir. *Médecine d'Afrique noire*. Vol 46, N° 3.
- **VAZEQUEZ R.A. (1978),** Les polyphénols de l'huile d'olive et leur influence sur les caractéristiques de l'huile; *revue française des corps gras*, 25, 21-26.
- **WHITTON B.A. et POTTS M. (2000).** Introduction to the cyanobacteria, 1-11, in "the ecology of cyanobacteria: their diversity in time and space". Ed Boston, Kluwer Academic Publishers.
- **YAAKOUBI A., CHAHLAOUI A., RAHMANI M., ELYACHIOUI M., et OULHOTE Y. (2009).** Effets de l'épandage des margine sur la microflore du sol. *Agro solutions*, 20:1.
- **YALCUK A., BALDAN PADKIL N., and YAPRAK TURAN S. (2010).** Performance evaluation on the treatment of olive mill waste water in vertical subsurface flow constructed wet lands. *Desalination*, 262: 209-214.



Annexes

Annexes

Annexe 01: Composition phénolique des margine (FIESTAS et BORJA, 1992).

Composé phénolique	Teneur (mg)
Acide 3-hydroxybenzoïque	28
Acide 4-hydroxybenzoïque	71
Acide 3-hydroxyphénylpropionique	70
Acide 4-hydroxyphénylpropionique	23
Acide 4-hydroxyphénylacétique	23,4
4-hydroxyphényléthanol	173
Catéchol	234
Acide 3,4-dihydroxyphényléthanol	438
Acide 3,4-dihydroxyphénylacétique	92
Acide 2,3-dihydroxyphénylacétique	16,4
Acide 3,4-dihydroxyphénylpropionique	11,7
Acide 3,4-dihydroxycinnamique	35,2



Annexe 02: pollution des eaux par les margines



Annexe 03: pollution des eaux par les huiles usagées