

THESE

Présentée devant
L'UNIVERSITE DE PROVENCE
Aix - Marseille I

pour obtenir
LE GRADE DE DOCTEUR - MENTION SCIENCES

Spécialité
Biologie cellulaire et Microbiologie

par

Moktar HAMD
Ingénieur en Microbiologie industrielle et Appliquée

Nouvelle conception d'un procédé de dépollution biologique des margines, effluents liquides de l'extraction de l'huile d'olive

Soutenue publiquement le 7 juin 1991 devant la commission de jury

MM. J.- P. Bélaich
J.- L. Garcia, président
G. Goma, rapporteur
R. Moletta
M. Raimbault, rapporteur

30 JUL. 1993

*Laboratoire de Microbiologie
ORSTOM
Université de Provence*

*Centre de Biotechnologie Non Num
Université du Sud à Sfax
Tunisie*



30 JUL. 1993

Ø84 FERME HAM

F 34.545

HE 00063448
1 ex FD1

A tous ceux qui m'ont enseigné...

*A mes parents,
En souvenir de l'intérêt qu'ils ont témoigné pour mes études, que ce
modeste travail les honore à jamais.*

*A mon épouse, à Amin et Saïf, avec mes excuses pour mes longues
absences, en témoignage de ma tendre affection.*

A mes frères et sœurs,

A tous mes parents,

A tous mes amis.

AVANT - PROPOS

C'est au sein du Laboratoire de Microbiologie de l'ORSTOM à Marseille que j'ai débuté ce travail sous la direction de Monsieur Jean-Louis Garcia, Directeur de recherches, qui a toujours fait preuve à mon égard de compréhension et de confiance. J'ai le grand honneur de l'en remercier; qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

L'aspect technologique de ce travail a été surtout développé au Centre de Biotechnologie de Sfax sous la direction de Monsieur Radhouane Ellouq, Professeur et Directeur du Centre, qui a été très proche par ses conseils et sa bienveillance tout au long de cette thèse. C'est une joie pour moi de lui exprimer aujourd'hui toute ma respectueuse gratitude.

Ce projet de traitement des margines dans le cadre du Centre de Biotechnologie de Sfax est financé par le PNUD-ONU/DI. Que cet organisme international soit assuré de mes sincères remerciements.

Je remercie vivement Messieurs Jean-Pierre Belaich, Professeur à l'Université de Provence, Gérard Goma, Professeur à l'INSA de Toulouse et Maurice Raimbault, Directeur de recherches à l'ORSTOM, d'avoir accepté de juger ce travail.

Je tiens également à assurer de ma reconnaissance Monsieur René Moletta, Directeur de recherches à l'INRA de Narbonne, qui a été un précieux conseiller pour certains aspects de mes recherches et a bien voulu juger ce travail.

J'exprime enfin toute ma sympathie et ma gratitude à mes collègues du Laboratoire de Microbiologie de l'ORSTOM et du Centre de Biotechnologie de Sfax, qui m'ont amicalement soutenu pendant la réalisation de ce travail.

SOMMAIRE

| | page |
|---|-----------|
| INTRODUCTION | 1 |
| REVUE BIBLIOGRAPHIQUE | 6 |
| 1. Les margines, effluents liquides du processus d'extraction d'huile d'olive et leurs utilisations | 7 |
| 1.1. Composition chimique des margines | 7 |
| 1.1.1. La fraction organique | |
| 1.1.2. la fraction minérale | 9 |
| 1.2. Utilisations et contraintes | 10 |
| 1.2.1. Bassins d'évaporation | 10 |
| 1.2.2. Fertilisant | 11 |
| 1.2.3. Production de protéines d'organismes unicellulaires (POU) | 11 |
| 1.2.4. Production d'enzymes pectinolytiques | 11 |
| 1.2.5. Traitements physiques | 12 |
| 1.2.6. Epurations biologiques | 13 |
| 1.2.6.1. Traitements physiques et biologiques aérobies | 14 |
| 1.2.6.2. Digestion anaérobie des margines | 14 |
| 2. Dégradation aérobie des composés aromatiques | 16 |
| 2.1. Biochimie et microbiologie | 16 |
| 2.1.1. Dégradation des tanins et des anthocyanes | 16 |
| 2.1.2. Dégradation de la lignine | 17 |
| 2.1.3. Dégradation des monomères aromatiques | 17 |
| 2.1.3.1. Mécanismes enzymatiques du clivage du noyau aromatique | 17 |
| 2.1.3.2. Voies de dégradation des monomères aromatiques | 18 |
| 2.1.4. Arguments bibliographiques du choix d' <i>Aspergillus niger</i> pour le prétraitement des margines | 19 |
| 2.2. <i>Aspergillus niger</i> | 21 |
| 2.2.1. Biologie et physiologie | 21 |
| 2.2.2. Propriétés cinétiques | 21 |
| 2.2.3. Applications industrielles d' <i>A. niger</i> | 21 |
| 2.3. Technologie de la fermentation aérobie | 23 |
| 2.3.1. Transfert d'oxygène | 23 |
| 2.3.1.1. Le coefficient de transfert d'oxygène (K_{La}) | 23 |
| 2.3.1.2. Evaluation de la demande biologique en oxygène | 25 |
| 2.3.1.3. Facteurs affectant le K_{La} | 26 |
| 2.3.1.4. Corrélations entre les coefficients de transfert d'oxygène et les conditions opératoires de fermentation | 26 |
| 2.3.2. Evaluation de la chaleur de fermentation dégagée | 27 |
| 2.3.3. Classification des fermenteurs aérobies | 28 |

| | |
|---|---------------|
| 3. La biométhanisation | 30 |
| 3.1. Aspects biochimiques et microbiologiques de la biométhanisation | 30 |
| 3.1.1. Hydrolyse et acidogénèse | 30 |
| 3.1.2. Acétogénèse | 33 |
| 3.1.3. Méthanogénèse | 35 |
| 3.2. Biodégradation anaérobie des composés aromatiques | 36 |
| 3.2.1. Méthanisation des composés aromatiques simples | 36 |
| 3.2.2. Méthanisation des composés aromatiques complexes | 38 |
| 3.3. Facteurs influençant la biométhanisation | 39 |
| 3.2.1. Composition du substrat | 39 |
| 3.2.2. Facteurs physico-chimiques | 41 |
| 3.2.3. Facteurs microbiologiques et technologiques | 43 |
| 3.4. Technologie de la biométhanisation | 44 |
| 3.3.1. Evolution des procédés | 44 |
| 3.3.2. Le filtre anaérobie | 45 |
| MATERIELS ET METHODES | 48 |
| 1. Matériel biologique | 49 |
| 1.1. Les Champignons et les bactéries | 49 |
| 1.2. Consortium anaérobie | 49 |
| 1.3. Les boues anaérobies | 49 |
| 2. Les milieux de culture | 50 |
| 2.1. Les milieux synthétiques | 50 |
| 2.2. Les margines | 51 |
| 3. Les conditions de fermentations | 51 |
| 3.1. Cultures aérobies en erlenmeyers | 51 |
| 3.2. Cultures aérobies en fermenteurs | 52 |
| 3.2.1. Les fermenteurs agités | 52 |
| 3.2.2. La colonne à bulles | 53 |
| 3.2.3. Le lit fluidisé | 54 |
| 3.3. Cultures anaérobies en petits flacons | 55 |
| 3.4. Méthanisation en digesteurs | 56 |
| 3.4.1. Le digesteur contact anaérobie | 57 |
| 3.4.2. Les filtres anaérobies | 57 |
| 3.5. Installation à l'échelle du laboratoire de dépollution biologique des margines | 58 |
| 4. Techniques de dosages | 60 |
| 4.1. Matières sèches | 60 |
| 4.2. Matières volatiles | 60 |
| 4.3. Matères en suspension (MES et MVS) | 60 |
| 4.4. Demande biologique en oxygène (DBO ₅) | 60 |
| 4.5. Demande chimique en oxygène (DCO) | 61 |

| | |
|---|-----------|
| 4.6. Dosage enzymatique du glucose | 61 |
| 4.7. Dosage chimique des sucres réducteurs | 61 |
| 4.8. Détermination de l'azote minéral et organique | 62 |
| 4.9. Dosage des sels | 62 |
| 4.10. Analyse du méthane | 62 |
| 4.11. Analyse du CO ₂ et de H ₂ | 62 |
| 4.12. Dosage des acides gras volatils (AGV) | 63 |
| 4.13. Dosage des acides phénoliques | 63 |
| 4.14. Analyse des polyphénols des margines | 64 |
| 4.15. Dosage des tanins | 65 |
| 4.16. Détermination de la biomasse | 65 |
| 4.17. Détermination du coefficient de transfert de l'oxygène (K _L a) | 66 |
| 4.18. Techniques de microscopie électronique | 66 |
| 5. Plans d'expériences | 67 |
| | |
| RESULTATS ET DISCUSSION | 69 |
| | |
| 1. Etudes physico-chimiques des margines | 70 |
| 1.1. Analyse de la composition chimique | 71 |
| 1.2. Elimination des matières en suspension des margines | 73 |
| 1.2.1. Centrifugation | 73 |
| 1.2.2. Filtration | 74 |
| 1.3. Analyse des composés phénoliques | 75 |
| 1.4. Conclusions | 77 |
| | |
| 2. Etude de la biodégradabilité et de la toxicité des margines | 79 |
| 2.1. Méthanisation des margines brutes en batch | 80 |
| 2.1.1. Effet de la soude et de la chaux sur la méthanisation des margines | 80 |
| 2.1.1. Méthanisation des différentes fractions des margines | 81 |
| 2.2. Méthanisation des margines préfermentées en batch | 84 |
| 2.2.1. Méthanisation des margines préfermentées par acidogénèse et par <i>A. niger</i> | 85 |
| 2.2.2. Effet de l'agitation | 88 |
| 2.2.3. Effet de l'addition d'un consortium bactérien isolé de termites | 91 |
| 2.3. Conclusions | 94 |
| | |
| 3. Prétraitement aérobie des margines par <i>A. niger</i> | 95 |
| 3.1. Screening et sélection d'une souche d' <i>A. niger</i> | 96 |
| 3.1.1. Screening des souches d' <i>A. niger</i> | 96 |
| 3.1.2. Sélection d'une souche d' <i>A. niger</i> adaptée à la bioconversion des margines | 97 |
| 3.2. Optimisation de la croissance d' <i>A. niger</i> sur margines | 101 |
| 3.2.1. Recherche des facteurs influençant la bioconversion des margines | 101 |
| 3.2.2. Optimisation des facteurs influençant la bioconversion des margines | 102 |
| 3.2.2.1. Influence de la taille de l'inoculum | 102 |
| 3.2.2.2. Effet de la concentration de sulfate et d'azote | 103 |
| 3.2.2.3. Effet de la nature de la source d'azote | 104 |
| 3.2.2.4. Effet de la concentration des margines | 105 |
| 3.3. Bioconversion des margines par <i>A. niger</i> en fermenteur | 106 |
| 3.3.1. Comparaison entre la croissance d' <i>A. niger</i> sur margines en erlenmeyer et en fermenteur agité | 106 |

| | |
|--|------------|
| 3.3.2. Conception d'une colonne à bulles et détermination de ses performances | 109 |
| 3.2.2.1. La rétention gazeuse | 109 |
| 3.2.2.2. Le temps de mélange | 111 |
| 3.2.2.3. Le transfert d'oxygène | 111 |
| 3.2.2.4. Effet des margines sur la pO ₂ | 111 |
| 3.3.3. Fermentation des margines par <i>A. niger</i> en colonne à bulles | 112 |
| 3.3.4. Amélioration de la filtration des margines après leur fermentation par <i>A. niger</i> | 117 |
| 3.4. Conclusions | 120 |
| 4. Traitement des margines préalablement fermentées | 121 |
| 4.1. Méthanisation des margines préfermentées | 122 |
| 4.1.1. Effet de la nature du support sur les performances des filtres anaérobies | 122 |
| 4.1.2. Comparaison entre filtre anaérobie et contact anaérobie | 125 |
| 4.2. Comparaison entre le traitement en filtre anaérobie et le traitement aérobie en boues activées des margines préfermentées | 130 |
| 4.2.1. Traitement en filtre anaérobie | 130 |
| 4.2.2. Traitement aérobie par boues activées | 131 |
| 4.2.2.1. Sélection des bactéries et formation des boues activées | 132 |
| 4.2.2.2. Etude physique et microscopique du support bactérien (coques d'olives) | 133 |
| 4.2.2.3. Traitement aérobie en lit fluidisé | 134 |
| 4.3. Traitement des margines préfermentées en filtre anaérobie puis en lit fluidisé aérobie | 137 |
| 4.4. Conclusions | 137 |
| 5. Décoloration des margines issues des traitements biologiques | 138 |
| 5.1. Précipitation chimique des pigments noirs | 139 |
| 5.2. Dégradation biologique des pigments noirs par <i>Phanerochaete chrysosporium</i> | 141 |
| 5.3. Comparaison des deux techniques de décoloration | 141 |
| 6. Exploitation des résultats obtenus à l'échelle laboratoire pour la mise au point d'un procédé de dépollution biologique des margines | 143 |
| 6.1. Analyse et discussion des résultats obtenus à l'échelle du laboratoire | 144 |
| 6.2. Critères d'extrapolation de l'installation laboratoire à une échelle pilote | 146 |
| 6.3. Description de l'installation pilote de dépollution biologique des margines proposée | 147 |
| 6.4. Conclusions | 151 |
| CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES | 152 |
| REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 155 |
| PLANCHES PHOTOGRAPHIQUES | 166 |

Glossaire

| Symbole | Unité | |
|----------------------------------|----------------------------------|--|
| AGLC | g/l | Acides gras à longues chaînes |
| AGV | g/l | Acides gras volatils |
| Cv | g/l.h | Charge volumique |
| C* | atm ou mM | Concentration en O ₂ en équilibre avec la concentration en O ₂ dans la phase gazeuse |
| C _L | atm ou mM | Concentration en O ₂ dans le liquide |
| DBO ₅ | g/l | Demande biologique en O ₂ |
| DCOr | g/l | Demande chimique en O ₂ résiduelle |
| DCOs | g/l | Demande chimique en O ₂ soluble |
| ΔDCOs | % | Abattement de la DCO soluble |
| DCOt | g/l | Demande chimique en O ₂ totale |
| ΔDCOt | % | Abattement de la DCO totale |
| K _L a | 1/h | Coefficient du transfert d'oxygène |
| MS | g/l | Matière sèche |
| MES | g/l | Matière en suspension sèche |
| MV | g/l | Matière volatile |
| MVS | g/l | Matière volatile en suspension |
| N - NH ₄ ⁺ | g/l | Azote ammoniacal |
| NKT | g/l | Azote Kjeldahl total |
| OUR | mM O ₂ /l. h | Vitesse d'utilisation d'O ₂ . (O ₂ Uptake Rate) |
| pO ₂ | % | Pression partielle en O ₂ |
| P _g | l/l. j | Productivité journalière en biogaz |
| qO ₂ | mM O ₂ /g h | Demande spécifique en O ₂ |
| QO ₂ | mM O ₂ /l. h | Demande volumique en O ₂ |
| T _M | s | Temps de mélange |
| T _R | % | Temps de rétention des bulles d'air |
| T _{RH} | j | Temps de rétention hydraulique |
| V _R | l | Volume du réacteur |
| V _g | cm/s | Vitesse superficielle de l'air |
| Y _M | l CH ₄ /g DCO éliminé | Rendement biologique en méthane |
| Y _{X/S} | g/g | Rendement de biomasse par rapport au substrat |
| Y _{X/O2} | g/g | Rendement de biomasse par rapport à l'O ₂ |
| X | g/l | Biomasse |
| HAUSBUFF | | Hybrid Anaerobic Upflow sludge Blanket Upflow Fixed-Film Fermentor |
| POU | | Protéines d'Organismes Unicellulaires |
| UASB | | Anaerobic Upflow sludge Blanket |

INTRODUCTION GENERALE

Dix millions d'hectares de la surface du globe sont occupés par environ 820 millions d'oliviers. Plus des deux tiers des arbres sont concentrés dans l'Europe méditerranéenne; 13 % se trouvent au Proche-Orient, 13 % en Afrique du Nord et 3 % en Amérique latine et aux U.S.A. Seuls les 3 % américains ne sont pas situés dans l'aire méditerranéenne (Amoretti et Comet, 1985) comme le montre la fig.1. L'Espagne, la Grèce, l'Italie et la Tunisie représentent à eux seuls 65 % de la surface, 76 % des arbres en production et 74 % de la production totale d'olives. La production annuelle mondiale d'olives est estimée aux environs de 8,4 millions de tonnes (Nefzaoui, 1987).

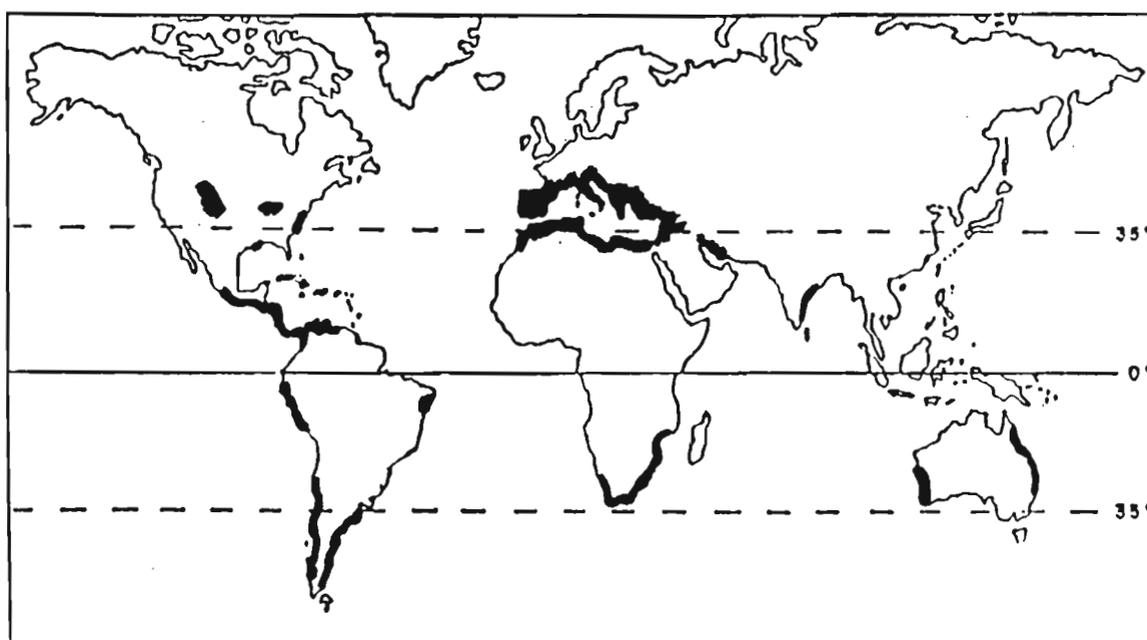


Figure 1: Aires de répartition des oliviers dans le monde.

L'industrie oléicole qui produit principalement l'huile d'olive vierge et l'huile de grignons, engendre deux résidus, l'un liquide, les margines et l'autre solide, les grignons. Lors des divers processus d'extraction de l'huile d'olive, les olives sont malaxées puis pressées pour séparer les grignons de l'émulsion d'huile et de l'eau de végétation. L'huile est ensuite séparée de la margine par centrifugation (Fig. 2). Les deux procédés d'extraction les plus utilisés actuellement sont l'extraction par le système de la presse traditionnelle ou la super-presse et le système continu.

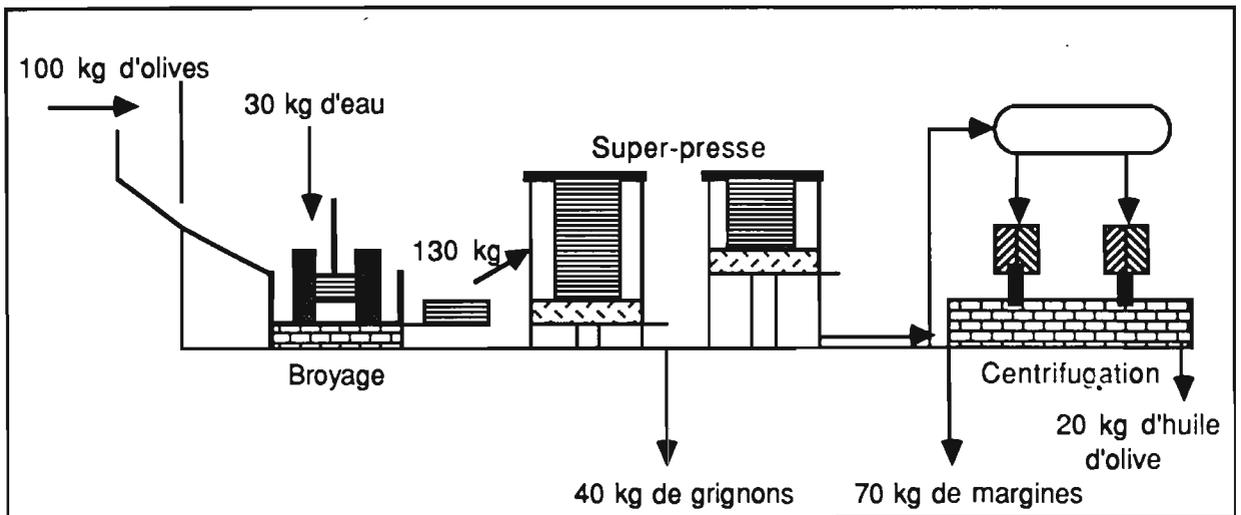


Figure 2: Schéma du procédé (Super-Press) d'extraction de l'huile d'olive avec les sous-produits engendrés.

Dans le bassin méditerranéen, la production annuelle de margines peut dépasser les 30 millions de m³ (Fiestas Ros de Ursinos, 1981). Elles sont surtout concentrées dans les pays producteurs d'huile d'olive. Etant donné que la pollution organique par unité de poids d'olives est indépendante du processus d'extraction et qu'une tonne d'olives donne en moyenne 45 à 55 kg de demande biologique en oxygène (DBO₅) (Balice *et al.*, 1982), l'industrie oléicole mondiale peut produire annuellement 420 10⁶ kg de DBO₅. Sachant qu'en moyenne un habitant rejette annuellement de l'ordre de 20 kg de DBO₅, les margines produites dans le monde peuvent correspondre aux déchets de 21 millions d'habitants. Ces margines posent de sérieux problèmes pour l'environnement. Leurs effets nocifs dérivent en grande partie de leur contenu en polyphénols très difficilement biodégradables. Ces derniers inhibent également la croissance des microorganismes, et spécialement les bactéries. Flemming et Etchells (1967) ont isolé des margines un composé phénolique ayant une activité inhibitrice sur les bactéries lactiques. Cet effet ne serait pas seulement limité aux bactéries mais également aux champignons (Saiz et Gomez, 1986).

Ces considérations ont conduit les chercheurs à essayer de valoriser les margines pour limiter leur nature polluante. Cependant, les procédés développés restent très limités et leurs coûts économiques sont très élevés. Par conséquent les bassins d'évaporation, par leur simplicité d'utilisation, restent la solution la plus utilisée malgré les effets néfastes sur l'environnement.

En Tunisie, les margines produites dans les campagnes sont évacuées dans les bassins d'évaporation situés à proximité des huileries. Dans les villes, les margines produites

dans toutes les huileries ne sont plus rejetées dans les égouts mais sont transportées pour être épandues dans des bassins d'évaporation construits loin des habitations. Dans la ville de Sfax où il existe plus de 200 huileries fonctionnelles, la production annuelle de margines dépasse les 200 000 t les années de bonne pluviométrie. Ces margines sont transportées par camion citerne (3 dollars/t) vers les bassins d'évaporation aménagés dans la station d'épuration implantée à proximité de la mer. L'apport de margines à cette station d'épuration s'effectue toute l'année comme le montre la fig. 3. Cependant, le maximum de margines est reçu entre les mois de décembre et mars inclus.

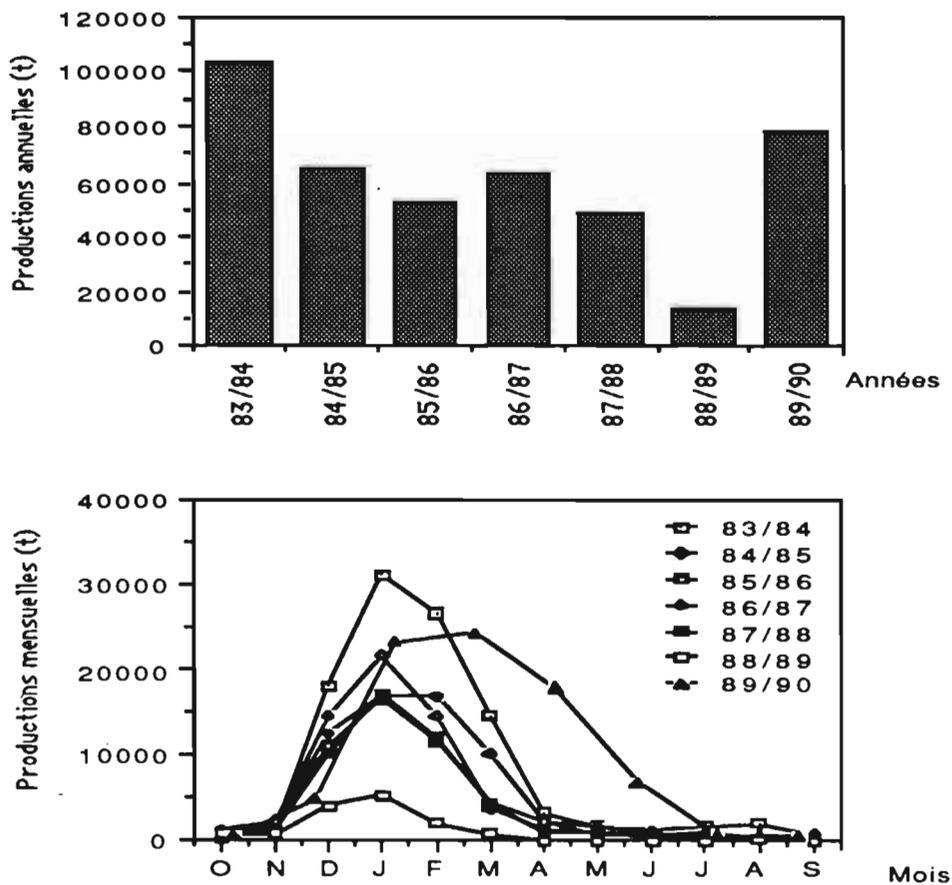


Figure 3: Quantités de margines collectées dans les bassins d'évaporation de la ville de Sfax.

Durant ces mois de pointe, l'arrivée journalière de margines peut atteindre les 1200 t. La surface de ces bassins est de l'ordre de 1500 m² avec une profondeur de 0,8 m à 1,5 m. Cependant, il est constaté que ces bassins sont peu efficaces et la pollution s'accumule d'années en années. La faible biodégradation est compensée par l'augmentation de la surface des bassins d'évaporation, mais le prix du terrain devient de plus en plus cher. Dans ces conditions, la solution préconisée à l'heure actuelle par la ville de Sfax est non seulement

préjudiciable sur le plan écologique mais également coûteuse. La recherche d'une solution technologique performante devient une nécessité urgente.

Les traitements physiques ne résolvent pas le problème de la pollution provoquée par les margines du fait qu'ils réalisent une simple séparation entre l'eau et les matières organiques; il faudrait trouver une utilisation satisfaisante de ces matières pour éviter leur accumulation. En ce qui concerne le traitement biologique aérobie par boues activées, il a été déjà démontré que les margines doivent être diluées au moins 80 fois pour que le processus biologique ne soit pas inhibé par les composés toxiques (Balice *et al.*, 1988). De plus, ce système aérobie nécessite une énergie très importante pour l'aération et le brassage du milieu et il produit des quantités énormes de boues. Par contre, la digestion anaérobie engendre des quantités faibles en boues et produit du biogaz qui peut contribuer à l'amortissement du prix des installations (Boari *et al.*, 1984). Cependant, la digestion anaérobie des margines se heurte à des problèmes d'acidification, de toxicité et de biodégradabilité. La réalisation de la méthanisation des margines dans de bonnes conditions doit passer par un prétraitement pour éliminer ou réduire les composés inhibiteurs des bactéries méthanogènes et hydrolyser certains polymères pour faciliter ainsi la biodégradabilité de cet effluent.

L'analyse bibliographique a montré que le prétraitement par *A. niger* qui présente un spectre très large de dégradation des composés des margines, devrait faciliter la digestion anaérobie et éviter ainsi les problèmes de dilution des margines et l'accumulation des composés toxiques dans les digesteurs.

L'objectif de ce travail qui a consisté à concevoir un procédé de dépollution biologique des margines, a été réalisé en quatre étapes:

- * Analyse physico-chimique des margines et étude de leur toxicité et de leur biodégradabilité pour améliorer leur méthanisation.
- * Optimisation de l'étape de prétraitement des margines par : le choix d'une souche d'*A. niger* performante, l'optimisation des conditions de fermentation et la conception d'un réacteur adapté à ce type de fermentation.
- * Traitement des margines préfermentées par *A. niger*.
- * Analyse des résultats obtenus à l'échelle du laboratoire et proposition d'un procédé de traitement biologique des margines.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Les margines, effluents liquides du processus d'extraction d'huile d'olive et leurs utilisations

1.1. Composition chimique des margines

Les margines présentent une couleur rose-brun intense ou noire, avec une forte odeur d'olive, un aspect trouble et un pH de 4 à 6 avec un fort pouvoir tampon. Leur composition a été bien étudiée et comporte approximativement 90 % d'eau, 7 à 15 % de matières organiques et 1 à 2 % de substances minérales (Fiestas Ros de Ursinos, 1981). La composition organique varie en fonction du stade de maturation des olives, du processus d'extraction, des conditions climatiques et de la variété de l'olivier. Le système de presse traditionnelle produit un volume de margine de l'ordre de 0,4 à 0,5 m³/t d'olives traitées (Boari *et al.*, 1984) qui peut aller jusqu'à 2 m³/t avec le système continu. La DCO et la DBO₅ peuvent respectivement dépasser les 100 et 200 g/l (Balice *et al.*, 1982).

1.1.1. La fraction organique

La fraction organique des margines a une composition très complexe et hétérogène. Différents composés de nature et de concentration très différentes sont présents.

1.1.1.1. Les glucides, les composés azotés et les vitamines

Les composés lignocellulosiques et les pectines jouent un rôle important dans la texture des olives; ils représentent respectivement environ 3 % et 0,6 % du poids de la pulpe fraîche. Outre, la cellulose et la pectine issues de la pulpe d'olives (Fernandez Diaz, 1983), plusieurs autres sucres simples sont présents: raffinose, mannose, saccharose, glucose, arabinose et xylose (Salvemini, 1985). La fraction azotée est principalement représentée par des protéines. Tous les acides aminés ont été identifiés. Les plus abondants sont les acides aspartique et glutamique, la proline et la glycine (Salvemini, 1985). En ce qui concerne les vitamines, plusieurs ont été identifiées dans les margines notamment les vitamines du groupe B et la vitamine PP (124 mg/kg) (Salvemini, 1985).

1.1.2.2. Les huiles et les acides organiques

Les mêmes auteurs ont noté que les principaux acides organiques rencontrés dans les margines sont les acides fumarique, glycérique, lactique, malique et malonique (Fiestas Ros

de Ursinos, 1981; Salvemini, 1985). La concentration d'huile résiduaire dans les margines est très variable selon le processus d'extraction; l'acide oléique est l'acide gras le plus abondant (65 %).

1.1.2.3. Les composés phénoliques

Les composés phénoliques des margines sont très divers et leur structure est très variable.

1.1.3.1. Monomères aromatiques

* Plusieurs acides phénoliques ont été identifiés :

- Acide caféique (trans), acide caféique (cis), acide p-coumarique, acide protocatéchuique, acide vanillique (Vazequez *et al.*, 1974);
- Acide 4-hydroxyphénylacétique, acide protocatéchuique, acide syringique et acide p-hydroxybenzoïque (Cichelli et Solinas, 1984).
- Acide p-hydroxyphénylacétique, acide vétratrique, acide vanillique, acide 3,4,5-triméthoxybenzoïque, acide syringique et acide caféique (Balice et Cera, 1984).

* Les alcools phénoliques ont été aussi cités: Le 4-hydroxyphényl alcool, 3,4-dihydroxyphényl éthanol (Cichelli et Solinas, 1984 ; Vazequez *et al.*, 1974). Ces alcools sont parfois associés à des glucosides comme le 4-diglucoside β (3,4 dihydroxyphényl) éthanol.

* D'autres composés phénoliques ont été identifiés: oleuropéine, L-caféyl- glucose, tirosol, hydroxytirosol, apéginine, lutéoline. L'oleuropéine dont la concentration peut atteindre jusqu'à 2 % du poids d'olives, est très abondante dans les margines (Wagner *et al.*, 1984).

1.1.3.2. Les composés phénoliques à haut poids moléculaire

Les polyphénols identifiés dans les margines sont essentiellement les anthocyanes (Tanchev *et al.*, 1980) et les tanins dont la concentration peut atteindre 12 g/l (Balice *et al.*, 1982).

Les tanins sont des polyphénols dont les structures sont complexes, conventionnellement classés en tanins hydrolysables et tanins condensés (Monties, 1980).

* Les tanins hydrolysables renferment 3 groupes :

- Esters d'acides phénoliques

- Esters d'acides phénoliques et sucres
 - Glucosides, c'est le groupe le plus abondant où l'acide gallique est le plus important. L'action des tanases d'*A. niger* hydrolyse ce type de tanins en glucose et en acide gallique. Les gallotanins sont les plus représentatifs de ce groupe.

* Les tanins condensés, appelés aussi flavotanins. Ils sont formés par la polymérisation de la catéchine à différents degrés. Leur poids moléculaire est compris entre 500 et 3000 et ils sont souvent associés aux anthocyanes. Traités par HCl 5N en milieu alcoolique, ils sont dégradés avec formation de pigments anthocyaniques de coloration rouge (cyanidine).

En ce qui concerne la lignine, aucun auteur n'a cité la présence de ce polymère dans les margines, bien que les pulpes d'olives soient très riches en composés lignocellulosiques (Fernandez diaz, 1983). Il est actuellement démontré que la lignine est un hétéropolymère formé par la polymérisation oxydative de trois monomères dérivés de l'alcool hydroxycinnamique : le 4-hydroxycinnamate, le 4-hydroxy - 3 méthoxycinnamate (coniférylate) et le 3,5 - diméthoxy -4- hydroxycinnamate (sinapylate).

1.1.2. La fraction minérale

La fraction minérale a été complètement analysée par Salvemini (1985) et rapportée dans le tableau 1.

Tableau 1: Composition minérale des margines (166,8 g/l de MS).

| Elements | Concentrations (mg/l) |
|--------------------------------------|-----------------------|
| Phosphore (PO_4^{2-}) | 800,6 |
| Chlore (Cl^-) | 270,2 |
| Sulfate (SO_4^{2-}) | 16,68 |
| Sodium | 5370,9 |
| Potassium | 15295,5 |
| Calcium | 1167,6 |
| Magnésium | 410,3 |
| Fer | 103,4 |
| Aluminium | 8,34 |
| Chrome | 0,66 |
| Nickel | 3,36 |
| Cobalt | 1,33 |
| Manganèse | 1,66 |
| Cadmium | 0,83 |
| Oxyde de silicium (SiO_2) | 41,7 |
| Zinc | 10,0 |

1.2. Utilisations et contraintes

De nombreux travaux ont été réalisés dans le but de valoriser cet effluent abondant. Parmi les applications biotechnologiques on peut citer :

- Bassin d'évaporation
- Utilisation comme fertilisant
- Obtention de protéines d'organismes unicellulaires (POU)
- Production d'enzymes utiles à l'extraction d'huile d'olives
- Traitements physiques
- Traitements biologiques

1.2.1. Les bassins d'évaporation

Cette procédure d'évacuation consiste à accumuler les eaux résiduelles dans les bassins pour qu'elles s'évaporent; elle permet d'éviter de déverser les margines dans les cours d'eau. L'inconvénient de cette méthode d'évacuation est qu'en essayant d'éviter une pollution hydrique, on risque d'entraîner une pollution de l'environnement en raison des problèmes d'esthétique et de mauvaise odeur que présentent ces bassins d'évaporation.

En général, quand l'évaporation commence dans les bassins, une série de phénomènes biologiques interviennent pour dégrader la matière organique; les agents de cette dégradation sont surtout des bactéries Gram-négatif et des levures qui se trouvent à l'origine dans les olives. En fonction de la quantité d'oxygène dissous dans l'eau résiduelle et, par conséquent, disponible pour les microorganismes, la voie de dégradation de la matière organique est aérobie au anaérobie.

Les observations faites durant ce processus d'évaporation ont montré que (Cabello et Fiestas Ros de Ursinos, 1981) :

- Le pH enregistre peu de changements.
- La variation des microorganismes qui dépend de la température ambiante et de la profondeur des bassins, est faible.
- La diminution de la matière organique et de la DBO₅ n'intervient que pendant les 30 premiers jours.

1.2.2. Utilisation des margines comme fertilisant

De part leur teneur élevée en minéraux, les margines peuvent être utilisées comme fertilisant. Elles apportent 3,5 à 11 kg de K₂O, 0,6 à 2 kg de P₂O₅ et 0,15 à 0,5 kg de MgO par m³ (Fiestas Ros de Ursinos, 1986). Les essais réalisés permettent de fixer certaines précautions à savoir :

- * Ne pas dépasser la dose de 30 m³/ha/an.
- * Arroser toujours entre les arbres.
- * Pour les cultures annuelles, arroser au moins 1 mois avant les semailles, pour éviter les effets phytotoxiques et ne jamais arroser pendant la période de végétation.

1.2.3. Protéines d'organismes unicellulaires

Les cultures de levures en fermenteurs aérés sur les margines produisent des protéines d'organismes unicellulaires (POU) qui peuvent être employées pour l'alimentation animale. Les principaux travaux de production de levures-aliments à partir des margines sont reportés dans le tableau 2.

Tableau 2: Utilisation des levures pour la production de POU à partir des margines.

| Souche | Biomasse (g/l) | Références |
|--|----------------|--------------------------------|
| <i>Torulopsis utilis</i> | 13 | Fiestas Ros de Ursinos, 1981 |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 18 - 26 | Ercoli et Ertola, 1983 |
| <i>Saccharomyces</i> et <i>Candida</i> | 20 - 26 | Giulietti <i>et al.</i> , 1984 |

1.2.4. Production d'enzymes

La croissance de *Cryptococcus albidus* sur margine durant 48 h élimine environ 75 % de la DBO₅ tout en produisant de la biomasse et des enzymes (13 UV/ml). La production d'enzymes atteint jusqu'à 29,5 UV/ml après élimination des polyphénols par floculation. Ces enzymes ont été testés pour l'amélioration du système d'extraction d'huile d'olive. L'addition de 2 litres d'une solution de ces enzymes concentrée par ultrafiltration (90 UV/ml) pendant un cycle de broyage, a augmenté le taux d'extraction de 84,3 % à 90,7 % (Petruccioli *et al.*, 1988).

1.2.5. Traitements physiques

Les traitements physiques pendant lesquels les margines ne sont pas transformées sont essentiellement des opérations de séparation des matières organiques et minérales solubles et insolubles de la phase liquide (eau). Le problème de ces procédés (Tableau 3) est qu'ils engendrent une pollution solide très abondante. De plus, à cause de sa forte concentration en matière sèche et de son état visqueux, la margine pose des problèmes sérieux lors des opérations de filtration et d'ultrafiltration (Renzo et Amirente, 1988).

Tableau 3: Procédés physiques de traitement des margines (Batista et Giorgio, 1988)

| Réalisation -Année | Opérations unitaires du procédé | Potentiel (m ³ /j) | Nombre d'installations |
|-------------------------|--|-------------------------------|------------------------|
| ENEA (1982) | - Concentration solaire | 0,1 | 1 |
| STILMAS (1983) | - Distillation - Thermocompression - Osmose inverse | 10 | 3 |
| AGIP GIZA (1984) | - Congélation | 0,5 | 1 |
| EURECO (1984) | - Distillation à simple effet - Clarifloculation - Filtre à charbon actif | 12 | 1 |
| IMPLANTI (1985) | - Distillation à simple effet | 15 | 1 |
| PIERALISI (1986) | - Séchage | 20 | 1 |
| FERILLI (1986) | - Distillation à double effet - Combustion-Concentration - Traitement du distillat | 15 | 1 |
| SMIA/IREOS (1987) | - Ultrafiltration - Ionisation - Osmose inverse | 2 | 1 |
| MILLIPORE/RIVEST (1987) | - Filtration - Ultrafiltration - Osmose inverse | 12 | 1 |
| I.D.M. (1987) | - Polarisation - Décantation - Epaissement - Osmose inverse | 40 | 2 |

1.2.6. Epurations biologiques

1.2.6.1. Traitements physiques et biologiques aérobies

Ce type de traitement des margines a été exclusivement développé en Italie durant la dernière décennie. Dans leur majorité, ces procédés de traitement biologique par boues activées ou champignons sont toujours appliqués à la phase liquide récupérée après des opérations physiques comme la distillation, la concentration, la filtration ou l'ultrafiltration (Tableau 4).

Tableau 4: Procédés physiques et biologiques de traitement des margines
(Batista et Giorno, 1988)

| Procédé | Nombre d'installation | Constructeur | Année | Potentialité (m ³ /j) |
|--|-----------------------|-------------------|-------|----------------------------------|
| Filtration-Distillation Aérobiose | 2 6 | ITALIA-DEPURATORI | 1978 | 3 - 7 2 |
| Coagulation-Aérobiose | 2 | SERNAGIOTO | 1980 | 80 |
| Evaporation-Aérobiose | 2 | FIAT-ENGINEERING | 1983 | 150 - 300 |
| Distillation-Aérobiose | 2 | STILMAS | 1983 | 50 |
| Microaérobiose | 1 | TECHNOSIS | 1986 | 10 |
| Anaérobiose-Aérobiose Floculation-Sédimentation | 1 | AMENDUNI | 1986 | 7 - 15 |
| Ultrafiltration-Aérobiose | 1 | ENEA | 1986 | 2 |
| Aérobiose-Concentration Solaire | 1 | BALAFUR-ITALIA | 1986 | 1 |
| Ultrafiltration-Aérobiose Anaérobiose-Clarification | 1 | CONTRETAT | 1986 | 15 |
| Distillation-Aérobiose | 1 | MTC | 1987 | 0,3 |
| Ultrafiltration-Aérobiose | 13 | ENICHEM | 1987 | 5 - 10 |
| Filtration-Osmose inverse Aérobiose | 3 | METALARTE | 1988 | 25 - 60 |

Des études de valorisation de cette fraction solide sont en cours comme l'extraction des colorants, l'alimentation du bétail ou le compostage. L'utilisation des margines déshydratées a provoqué des diarrhées chez le bétail essentiellement à cause des concentrations élevées en sodium et en potassium (Salvamani, 1985).

1.2.6.2. La fermentation méthanique des margines

Les tentatives précédentes de dépollution paraissent très coûteuses. Cependant, le traitement anaérobie par fermentation méthanique apparaît comme une solution possible alliant les avantages de la dépollution à ceux de la production d'énergie. C'est pourquoi la digestion anaérobie est particulièrement étudiée. En 1977, Anderson *et al.* ont établi la faisabilité de la digestion anaérobie de certaines eaux résiduaires d'industries agro-alimentaires; les margines ont donné de bons résultats. En effet, Fiestas *et al.* (1982 a) ont montré que lors de la méthanisation des margines dans un digesteur pilote de 68 m³, la productivité en biogaz a été de l'ordre de 0,838 m³/l. j. et le rendement de 25 m³/m³ de d'effluent traité. Ce méthane produit a donné 85,5 KWh et 2,85 m³ d'eau chaude à 80 °C. Cependant, le problème rencontré par tous les auteurs a été le démarrage de leurs digesteurs. La stabilisation des digesteurs est très longue si les margines sont concentrées. De plus, durant le démarrage, quand on ajoute la margine, l'acidification par les microorganismes augmente rapidement et la méthanisation est inhibée à la fois par l'acidité et par les composés phénoliques (Boari *et al.*, 1984). Ces mêmes auteurs ont noté que les problèmes de démarrage pouvaient être résolus en diluant la margine et en ajoutant de l'urée.

1.2.6.2.1. Procédés utilisés

Plusieurs travaux portant sur la digestion anaérobie des margines par différents procédés ont été réalisés (tableau 5). Les résultats montrent que les procédés contact-anaérobie sont peu performants. Puisque la pollution contenue dans la margine est principalement soluble et colloïdale (90 %), le procédé UASB a donné les meilleurs résultats (Boari *et al.*, 1984). Cependant, les charges maximales maintenues après le démarrage sont plus faibles quand les margines sont concentrées et les granules décrits par Lettinga *et al.* (1980) n'ont pas été obtenus.

Les filtres anaérobies utilisés pour la méthanisation des margines (tableau 5) ont montré que le démarrage était plus rapide que le procédé UASB et le contact anaérobie (Rozzi *et al.*, 1989). Les rendements en méthane (l méthane/g de DCO dégradé) obtenus avec les filtres

anaérobies traitant les margines ont été très proches des valeurs théoriques (Rigoni-Stern *et al.*, 1988).

Les charges les plus élevées ont été appliquées sur un réacteur combinant le procédé UASB et le filtre anaérobie traitant des margines acidifiées en lagunes anaérobies durant 6 mois (Tsonis et Grigoropolous, 1988). Cependant l'abattement de la DCO restait faible (40 %).

Tableau 5: Performances des procédés de méthanisation appliqués aux margines

| Procédés | Volume (l) | Charge (g DCO/lR.j) | Efficacité (% DCO) | Références |
|------------------|------------------|------------------------|-----------------------|---|
| Contact | 2600 | 1.55 | 70 | Antonacci <i>et al.</i> , 1981 |
| | 70000 | 2.55 | 80 | Fiestas R. de U. <i>et al.</i> , 1982 b |
| UASB | 15 | 16.00 | 70 | Boari <i>et al.</i> , 1984 |
| | 5000 | 16.00 | 70 | Boari <i>et al.</i> , 1984 |
| | 20 | 15.40 | 70 | Balice <i>et al.</i> , 1988 |
| HAUSBUFF | 19.7 | 190.00 | 40 | Tsonis et Grigoropoulos, 1988 |
| filtre anaérobie | 21 ^a | 2.80 | 83 | Rigoni Stern <i>et al.</i> , 1988 |
| | 300 ^b | 8.00 | 87 | Rigoni Stern <i>et al.</i> , 1988 |
| | 10 ^c | 2.50 | 60 | Rozzi <i>et al.</i> , 1989 |
| | 10 ^d | 2.50 | 55 | Rozzi <i>et al.</i> , 1989 |
| | 11 ^e | 3.00 | 65 | Rozzi <i>et al.</i> , 1989 |
| | 11 ^f | 3.00 | 60 | Rozzi <i>et al.</i> , 1989 |

Supports utilisés. a-b: Polyuréthane, c: Prismes, d: Cubes, e : Cyl. plugs T30, f: Cyl. plugs TR30.

1.2.6.2.2. Limitations de la méthanisation des margines

Les margines contiennent d'une part des substrats très facilement fermentescibles comme les sucres et les acides carboxyliques qui provoquent l'acidification, et d'autre part des composés très difficilement biodégradables et très toxiques pour la flore bactérienne du digesteur et en particulier les bactéries méthanogènes. Ces composés toxiques comme l'acide

oléique (Koster et Cramer, 1980) et les composés aromatiques (Andreoni *et al.*, 1986), sont très abondants dans les margines et provoquent l'inhibition des bactéries méthanogènes et par conséquent l'accumulation des acides gras volatils, du gaz carbonique et de l'H₂. Andreoni *et al.* (1986), en étudiant les différents groupes bactériens impliqués dans le processus de méthanisation en présence des acides phénoliques des margines, ont montré que pour faciliter le démarrage de la méthanisation des margines, le nombre de bactéries méthanogènes devrait être très supérieur à celui des bactéries acidogènes. Ces problèmes d'acidification et d'inhibition peuvent être surmontés en diluant les margines de façon à obtenir une activité lente des bactéries acidogènes et atténuer ainsi l'inhibition des bactéries méthanogènes. Cependant la dilution des margines n'est pas toujours envisageable en raison du manque d'eau; dans certains cas, elle diminue également la capacité volumique des digesteurs.

Avec ces problèmes d'acidification et de toxicité, la méthanisation des margines se heurte également au problème de la biodégradation des composés aromatiques simples et complexes.

2. Dégradation aérobie des composés aromatiques

2.1. Biochimie et microbiologie

La composition en tanins, composés phénoliques, anthocyanes et lignine des margines a été peu étudiée. Ces composés complexes, dotés de propriétés antibactériennes sont toxiques pour les microorganismes (Flemming et Etchells, 1967; Saiz et Gomez, 1986; Macris *et al.*, 1987).

2.1.1. Dégradation des tanins et des anthocyanes

En isolant des souches capables de dégrader les tanins, Ikeda *et al.* (1972) ont montré qu'*A. niger* reste le microorganisme le plus efficace. Ces mêmes auteurs ont noté que les tanins peuvent être plus ou moins dégradés par des bactéries et des champignons comme *Saccharomyces cerevisiae*, *Mycotorula japonica* et *Penicillium glaucum*.

Les anthocyanases sont essentiellement produites par *A. niger* (Bloom et Thomassen, 1985). Ces enzymes sont surtout utilisés pour décolorer certains vins rouges riches en anthocyanes.

2.1.2. Dégradation de la lignine

Les champignons de la pourriture blanche sont les plus efficaces (Kirk, 1984) grâce à des exoenzymes de type peroxydase. Certaines bactéries possèdent également des activités ligninolytiques mais de moindre importance (Crawford *et al*, 1983). Les bactéries actuellement capables de dégrader la lignine sont des actinomycètes (Crawford *et al*, 1983), des corynébactéries, et des *Pseudomonas* (Odier *et al.*, 1978). Les principaux microorganismes dégradant la lignine sont (Kirk, 1984):

Bactéries: *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Nocardia*, *Streptomyces*,
Corynebacterium et *Mycobacterium*

Champignons imparfaits: *Fusarium* et *Papulospora*

Ascomycètes: *Chaetomium*, *Aspergillus*, *Hypoxylon* et *Xylaria*

Basidiomycètes: *Collybia*, *Mycena*, *Coriolus*, *Phanerochaete*, *Poria* et
Gloeophyllum

2.1.3. Dégradation aérobie des monomères aromatiques

La minéralisation des composés aromatiques naturels commence par l'hydrolyse de polymères, avec ensuite des réactions essentiellement de décarboxylation et de déméthylation qui aboutissent à des dérivés aromatiques facilement clivables.

2.1.3.1. Mécanismes enzymatiques du clivage du noyau aromatique

La stabilité du noyau benzène s'explique par l'importante résonnance du cycle (160 kJ mole^{-1}) due aux conjugaisons des liaisons non saturées. Pour distordre le nuage électronique et diminuer la stabilité de la molécule, il faut substituer des hétéroatomes aux atomes de carbone du cycle.

La dégradation aérobie des hydrocarbures aromatiques est réalisée par les bactéries, les champignons et les algues. En aérobiose, des monohydroxylases incorporent deux atomes d'oxygène, dont l'un est incorporé dans le noyau benzène pour former un peroxyde; le NADH nécessaire à la dihydroxylation est utilisé pour réduire le peroxyde en dihydrodiol.

Après hydroxylation du noyau aromatique, la dioxygénase incorpore simultanément 2 atomes d'O₂, selon des modes distincts de clivage, suivant que les groupements hydroxyles du noyau sont en position *ortho* ou *para* l'un par rapport à l'autre ou un seul hydroxyle en *meta*.

* Le clivage est dit *ortho* ou *intradiol* lorsqu'il consiste en une coupure de la

liaison entre des atomes de carbone adjacents portant des groupements hydroxyles. Ainsi par exemple, le catéchol qui est un 1,2-dihydroxybenzène est coupé par une catéchol 1,2 dioxygénase (Dagley, 1983).

* Lorsque les groupements hydroxyles sont en position *para* l'un par rapport à l'autre, comme par exemple dans l'acide gentisique (acide 2,5-dihydroxybenzoïque), le clivage oxydatif est catalysé par la gentisate-1,2-dioxygénase et la voie qui en découle est la voie du gentisate.

* Le clivage est dit *meta* lorsqu'il y a coupure entre deux carbones dont un seul porte un groupement hydroxyle, l'autre étant soit non substitué, soit substitué par un groupement différent. Par exemple, le protocatéchuate est oxydé par la protocatéchuate 4,5-dioxygénase ou 2,3-dioxygénase. Dans ce type de clivage *meta*, les groupements hydroxyles peuvent être en position *ortho* ou *para* l'un par rapport à l'autre.

2.1.3.2. Exemples de voies de dégradation des monomères aromatiques

Streptomyces setonii transforme les acides cinnamique et vanillique en cathécol et les acide p-coumarique et ferrulique en acide protocatéchuïque (fig. 4).

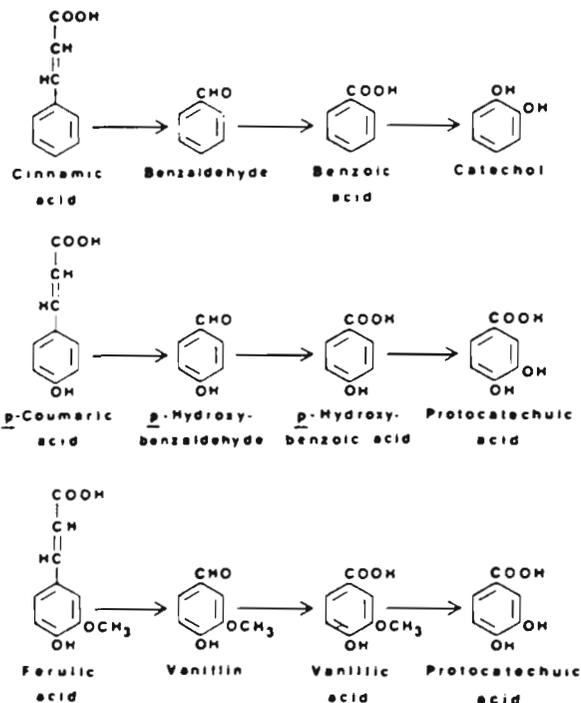


Figure 4: Dégradation de certains composés aromatiques par *Streptomyces setonii* (Suntherland *et al.*, 1983).

Lors de la dégradation bactérienne des principaux composés aromatiques intermédiaires, le flux de carbone issu du clivage des noyaux aromatiques (dihydroxyphénols)

varie selon que le substrat est le catéchol, l'acide protocatéchuic ou l'acide gentisique comme le montre la fig. 5.

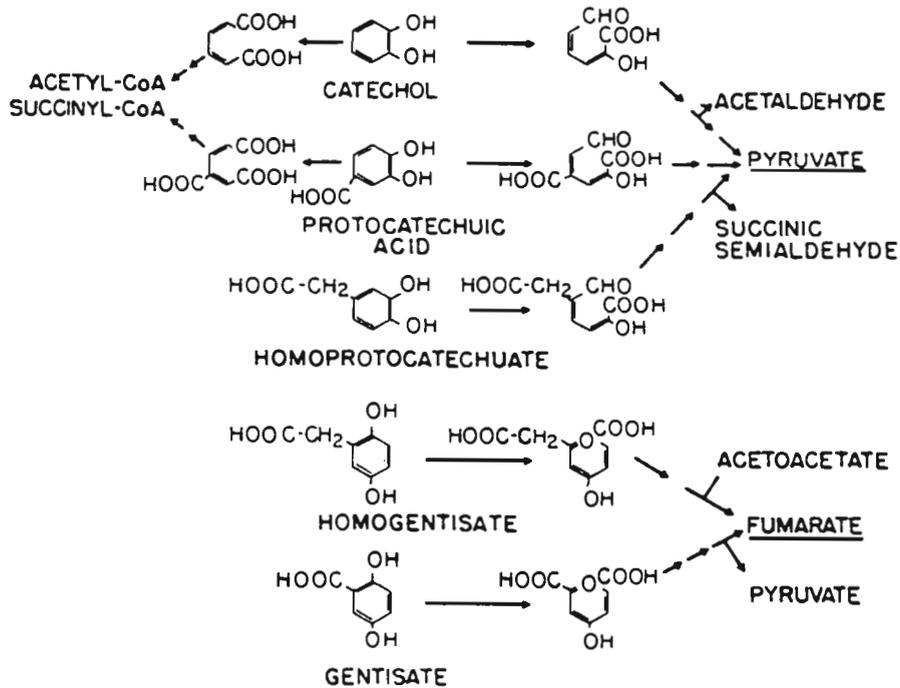


Figure 5: Principales voies bactériennes de dégradation de plusieurs composés aromatiques rencontrés lors de la biodégradation des composés aromatiques naturels (Dagley, 1983).

Ces voies ne sont pas forcément les mêmes chez les eucaryotes, comme il est démontré chez *Trichosporon cutaneum*. Ce champignon utilise plusieurs hydroxylases pour compenser le déficit en dioxygénases. Cette limitation est également compensée par la diversification de ses voies métaboliques (Anderson et Dagley, 1980).

Ces composés résultant du clivage des différents composés aromatiques sont ensuite complètement oxydés en CO₂ et H₂O lors de leur utilisation par le cycle de Krebs. Lors du catabolisme aérobie des composés aromatiques, l'oxygène joue un double rôle d'activateur lors des hydroxylations et du clivage, et d'accepteur terminal des électrons issus du cycle de Krebs.

2.1.4. Arguments bibliographiques en faveur du choix d'*Aspergillus niger* pour le prétraitement des margines

La mise en oeuvre d'un prétraitement des margines doit être basée sur la recherche d'un microorganisme qui soit capable de dégrader la majorité des composés toxiques des margines comme les tanins, les composés phénoliques et les huiles. La croissance de ce

microorganisme doit être facile, rapide et ne pas nécessiter une technologie de fermentation sophistiquée.

A. niger est très souvent utilisé à cause de la facilité de sa culture, son spectre très large de dégradation, ses rendements élevés et l'absence de production de métabolites indésirables.

A. niger est capable à la fois d'hydrolyser des polymères aromatiques comme les tanins et les anthocyanes et de dégrader les monomères aromatiques (Kieslich,1976). Les composés aromatiques identifiés dans les margines sont dans leur majorité dégradés par le genre *Aspergillus* comme le montre le tableau 6.

Tableau 6: Composés aromatiques des margines, dégradés par des espèces d'*Aspergillus*.

| Composés | Références d'identification | Références de dégradation |
|------------------------|------------------------------|---------------------------------|
| p-Hydroxyphénylacétate | Cichelli et Solinas,1984 | Kieslich,1976 |
| Protocatéchuate | Cichelli et Solinas,1984 | Kieslich,1976 |
| Cinnamate | Balice et Cera,1984 | Kieslich,1976 |
| Quercitine | Vazequez <i>et al.</i> ,1974 | Kieslich,1976 |
| Oleuropéine | Vazequez <i>et al.</i> ,1974 | Kieslich,1976 |
| Tanins | Balice <i>et al.</i> ,1982 | Ikeda <i>et al.</i> ,1972 |
| Polyphénols | Fiestas Ros de Ursinos,1981 | Makasinova et Martakov,1982 |
| p-Hydroxybenzoate | Cichelli et Solinas,1984 | Shailubhai <i>et al.</i> , 1982 |
| Benzoate | Cichelli et Solinas,1984 | Shailubhai <i>et al.</i> , 1982 |
| Anthocyanes | Tanchev <i>et al.</i> ,1980 | Bloom et Thomassen,1985 |

De plus, le catéchol qui est un intermédiaire important du catabolisme aérobie des aromatiques, est facilement dégradable par *A. niger* grâce à sa catéchol 1,2-dioxygénase (Ninnekar et Vaidyanathan, 1981). Betts et Dart (1988) ont démontré que plusieurs *Aspergillus* sont capables de métaboliser la lignine et ses monomères.

Outre la dégradation des huiles grâce à sa lipase et son système de β -oxydation des acides gras à longue chaîne, *A. niger* peut utiliser les sucres simples et même la cellulose (Aunstrup, 1979). *A. niger* est aussi capable de produire des pectinases (pectine hydrolase et pectine estérase) pour dégrader les pectines et ainsi diminuer la charge polluante et la viscosité des aliments riches en pectines (Rombouts et Pilnik, 1978).

2.2. *Aspergillus niger*

2.2.1. Biologie et physiologie

A. niger appartient à l'embranchement des Deuteromycetes; il fait partie de la sous-classe des Hyphomycètes, ordre des moniliales. Il est caractérisé par sa paroi cellulaire chitineuse (non pectocellulosique) et son mode de reproduction asexué par conidiospores (conidies).

La multiplication végétative est réalisée, après la germination des spores, par des filaments microscopiques, les hyphes. Ces filaments s'allongent par croissance apicale et se ramifient. La masse des hyphes constituant le thalle du champignon est appelé mycelium.

2.2.2. Propriétés cinétiques

Comme pour la plupart des microorganismes, la croissance des champignons est autocatalytique et fournit une allure exponentielle dans un système non limité. Cependant, cette phase est souvent relativement courte et se maintient habituellement pendant 3 à 6 doublements de la biomasse. Elle est suivie d'une phase de ralentissement pendant laquelle la cinétique de croissance est linéaire (Mavituna et Sinclair, 1985). Les taux de croissance des souches d'*A. niger* les plus étudiées sont de l'ordre de $0,2 \text{ h}^{-1}$ (temps de doublement de 3 à 4 h).

D'autres auteurs ont trouvé que la croissance des champignons dans des cultures homogènes était plus adaptée à une loi racine cubique (Marshall et Alexander, 1660) qu'à une loi exponentielle. Pirt (1966) a donné une interprétation de ce phénomène en notant que cette loi racine cubique était habituellement associée à la croissance sous forme de pelotes.

2.2.3. Applications industrielles d'*A. niger*

Le genre *Aspergillus* est surtout bien connu par les moisissures appartenant au groupe d'*A. niger*.

Sur le plan industriel, *A. niger* offre plusieurs applications par sa production d'enzymes (tableau 7) et d'acides carboxyliques comme les acides citrique, malique, fumarique et oxalique et plus récemment la production de mycotoxines.

Tableau 7: Enzymes produites par *A. niger* et applications industrielles.

| | |
|------------------------|---|
| Amylases | Médecine, alimentation, boissons |
| Pectinases | Clarification des jus de fruits, traitement du café |
| Glucoamylase | Sirop de glucose à partir d'amidon |
| Glucose oxydase | Dosages, antioxydants, alimentation |
| Inulinase | Production de fructose à partir d'inuline |
| Naringinases Xylanases | Hydrolyse des glucosides amers |
| Anthocyanases | Décoloration des vins rouges |
| Tanases | Pharmacie, Tanneries |
| Protéases | Médecine, alimentation et industrie du cuir |
| Arabinanases | Hydrolyse des gommes et des mucilages |

A. niger a été aussi largement utilisé pour la valorisation de plusieurs substrats biologiques pour la production de POU ou parfois dans un but de dépollution (tableau 8). En ce qui concerne les toxines, elles n'ont jamais été détectées dans les produits biologiques transformés par *A. niger* (Yokotsuka et Sasaki, 1980).

Tableau 8: bioconversion de plusieurs effluents agro-alimentaires par *A. niger*.

| Substrat | Objectif | Références |
|------------------------------|----------------|--------------------------------|
| Rejet de bananes | POU | Sethi et Grainger, 1980 a |
| Manioc | POU | Raimbault et Alazard, 1980 |
| Mangostone | POU | Sethi et Grainger, 1980 b |
| Sous produits céréaliers | POU | Gibriel <i>et al.</i> , 1981 |
| Effluents sucrés | Dépollution | Anderson <i>et al.</i> , 1981 |
| Riz contaminé par Aflatoxine | Détoxification | Tsubouchi <i>et al.</i> , 1983 |
| Pulpe de citron | POU | Rodriguez <i>et al.</i> , 1985 |
| Arabinanes et gommes | Hydrolyse | Voragen <i>et al.</i> , 1987 |

2.3. Technologie de la fermentation aérobie

2.3.1. Transfert d'oxygène

Le problème fondamental de la fermentation aérobie est l'aération d'une culture microbienne par un transport suffisant d'oxygène de l'air jusqu'aux enzymes respiratoires de la cellule afin de maintenir une activité métabolique correcte. Pour cela il faut vaincre une série de résistances qui s'opposent à ce transfert (Richards, 1961). Le passage de l'oxygène de la phase gazeuse à la phase liquide doit vaincre trois résistances :

- . la résistance diffusionnelle côté gaz
- . la résistance à l'interface gaz-liquide
- . la résistance diffusionnelle côté liquide.

2.3.1.1. Coefficient volumique de transfert d'oxygène ($K_L a$)

De nombreuses théories sont proposées pour représenter les mécanismes du transfert d'un soluté d'une phase gazeuse à une phase liquide. Pour chacune des théories, l'expression du flux (FA) peut être calculée. On l'exprime généralement sous la forme :

$$FA = K_L (C^* - C_L)$$

où K_L est la conductance partielle du transfert de l'oxygène côté liquide

C^* est la concentration d'oxygène dans le liquide en équilibre thermodynamique avec la concentration C_G de la phase gazeuse.

C_L est la concentration en oxygène dans la phase liquide.

A l'interface, la loi de Henry s'applique puisque les compositions des solutés sont, en régime permanent, en équilibre thermodynamique. Le flux de matière transférée est égal à :

$$FA = K_G (C_G - C_G^*) = K_L (C^* - C_L)$$

Avec C_G^* = concentration d'oxygène dans le gaz en équilibre thermodynamique avec
la concentration C_L de la phase liquide;

K_L et K_G sont définis par les équations :

$$\frac{1}{K_L} = \frac{1}{K_L} + \frac{1}{He K_G}$$

$$\frac{1}{K_G} = \frac{1}{K_G} + \frac{He}{K_L}$$

où He est la constante de Henry traduisant l'équilibre thermodynamique de l'oxygène entre la phase gazeuse et la phase liquide.

K_G est généralement 50 fois plus grand que K_L (Zlokarnik, 1978).

Par suite $1/K_G$ est négligé devant $1/K_L$ et la conductance globale K_L se réduit à la conductance partielle K_L . Le débit d'oxygène transféré est donc égal à :

$$QA = FA \cdot S = k_L \cdot S \cdot (C^* - C_L)$$

$$QA = K_L \cdot S/V_C \cdot (C^* - C_L) \cdot V_C$$

où S est la surface d'échange entre les deux phases.

Le débit est généralement sous la forme :

$$QA = K_L \cdot a \cdot (C^* - C_L) \cdot V_C$$

où a représente l'aire interfaciale par unité de volume.

Le débit d'oxygène transféré est donc le produit du coefficient de transfert volumique $K_L a$ par la différence du potentiel d'échange et par le volume.

Les trois paramètres K_L , a, $(C^* - C_L)$ agissent sur le débit d'oxygène transféré.

2.3.1.2. Evaluation de la demande biologique en oxygène

La demande en oxygène des microorganismes peut être évaluée par plusieurs méthodes. Pratiquement, le bilan gazeux est le plus utilisé. Théoriquement, cette demande est obtenue en comptabilisant les besoins nécessaires à la croissance, la maintenance, la respiration endogène et l'excrétion des métabolites.

Elle s'exprime par l'expression suivante :

$$QO_2 = \frac{\mu X}{Y_{O_2/X}} + m O_2 X + \frac{r_p}{Y_{O_2/P}} = q O_2 X$$

QO_2 : Demande volumique en oxygène (mM O_2 / l.h).

qO_2 : Demande spécifique en oxygène (mM O_2 / g de biomasse h).

μ : Taux de croissance du microorganisme (h^{-1})

X : Concentration en biomasse (g/l).

$Y_{O_2/X}$: Rendement de conversion de l'oxygène en biomasse (g O_2 / g biomasse).

$Y_{O_2/P}$: Rendement de conversion de l'oxygène en produit (g O_2 / g produit).

r_p : vitesse de production de produit (g/l.h.)

mO_2 : Demande spécifique en oxygène nécessaire à la maintenance ou la respiration endogène (g O_2 / g biomasse h.).

A titre d'exemple, des demandes spécifiques en oxygène (qO_2) pour différents microorganismes sont données dans le tableau 9.

Tableau 9: Demandes spécifiques en oxygène de quelques microorganismes
(Mavituna et Sinclair, 1985)

| Microorganisme | qO_2 (g O_2 / g X. h) |
|---------------------------------|---------------------------|
| <i>Aspergillus niger</i> | 0,095 |
| <i>Streptomyces griseus</i> | 0,096 |
| <i>Penicillium chrysogenum</i> | 0,125 |
| <i>klebsiella aeroginosa</i> | 0,128 |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 0,256 |
| <i>Escherichia coli</i> | 0,346 |

Cependant, il faut noter que ces demandes spécifiques en oxygène sont variables suivant le rendement de conversion de l'oxygène en biomasse du substrat utilisé (Matelas, 1971).

2.3.1.3. Facteurs affectant le K_{La}

En plus de la méthode de mesure du K_{La} et les conditions hydrodynamiques relatives au type de fermenteur, le coefficient volumique de transfert d'oxygène est affecté par plusieurs paramètres physico-chimiques.

- La température : le K_{La} est d'autant plus grand que la température baisse, la solubilité de l'oxygène augmentant quand la température baisse.

- Rhéologie du milieu : selon que le milieu est newtonien ou non newtonien, le K_{La} est différent et les corrélations changent. En général, la croissance des champignons donne des milieux non newtoniens. Par exemple, au delà de 10 g/l d'*A. niger*, le milieu est non newtonien et le mycelium affecte largement le K_{La} (Aïba et al., 1973 ; Kim et Lebault, 1980).

- Microorganismes : le K_{La} est affecté par le type de microorganisme, sa morphologie et sa concentration. Ce coefficient est plus affecté par les champignons que par les bactéries. Concernant l'influence de la morphologie, Kim et Lebault (1980) ont montré que le K_{La} est plus affecté par le mycelium sous forme de suspension filamenteuse que par les pelotes.

- Substances organiques et agents anti-mousse : des composés comme les peptones sont susceptibles de diminuer la valeur du K_{La} alors que d'autres composés comme l'éthanol, l'acétone et les esters augmentent le K_{La} (Aïba et al., 1973). Plusieurs agents antimousse réduisent le K_{La} en diminuant la solubilité de l'oxygène.

2.3.1.4. Corrélations entre les coefficients de transfert d'oxygène et les conditions opératoires de fermentation

Ces corrélations sont très utiles pour le calcul de l'aération des fermenteurs. En effet, le K_{La} physique (K_{La}^f) qui correspond aux caractéristiques du fermenteur doit être supérieur au K_{La} biologique (K_{La}^X) relatif à la demande biologique en oxygène nécessaire au bon déroulement de la fermentation. Autrement dit le flux d'oxygène ramené par le fermenteur ($N O_2$) doit suffire à la demande biologique en oxygène du système biologique ($Q O_2$).

$$N_{O_2} = K_L a^f (C^* - C_L) > Q_{O_2} = K_L a^X (C^* - C_L)$$

$$K_L a^f = \frac{N_{O_2}}{(C^* - C_L)} > K_L a^X = \frac{Q_{O_2}}{(C^* - C_L)}$$

Pour des systèmes agitateur - cuve pratiquement considérés comme standard, la fonction obtenue est une corrélation entre la puissance d'aération (P_g), le volume liquide de fermentation (V_L) et le débit d'aération (V_g) (Aïba et al., 1973):

$$K_L a = C_{ste} \cdot (P_g/V_L)^\alpha \cdot (V_g)^\beta$$

Le brassage mécanique introduit par l'agitateur augmente considérablement le coefficient de transfert (K_L) et la surface spécifique (a) en fractionnant les grosses bulles. Cette fonction varie avec la taille des fermenteurs et la nature rhéologique du milieu.

Dans les fermenteurs de type colonnes à bulles, le $K_L a$ dépend surtout du débit d'air, de la vitesse ascensionnelle des bulles et du système de diffusion d'air qui détermine la taille des bulles et qui contrôle le phénomène de coalescence. Le $K_L a$ est lié à la vitesse ascensionnelle des bulles (V_g) par la formule suivante :

$$K_L a = a \cdot (V_g)^\beta$$

Les coefficients a et β sont respectivement de l'ordre de 0,5 et 1 et dépendent de la géométrie des fermenteurs et des conditions d'aération (Moo-Young et Blanch, 1981).

2.3.2. Evaluation de la chaleur dégagée

Le métabolisme aérobie est très exergonique et s'accompagne d'un dégagement de chaleur qui doit être éliminée pour maintenir constante la température de fermentation.

La chaleur de fermentation peut être évaluée essentiellement soit par le calcul du bilan thermodynamique, soit en se basant sur les corrélations établies entre la demande volumique en oxygène (Q_{O_2}) et la vitesse volumique de dégagement de chaleur (Q_f).

Wang *et al.* (1979) ont établi une corrélation entre QO_2 et Q_f basée sur la croissance de plusieurs microorganismes sur différents substrats comme le montre la fig. 6. L'évaporation liée à la fois à QO_2 et à Q_f contribue à l'élimination de la chaleur, cependant le volume du liquide se trouve diminué jusqu'à 20 % selon la température de fermentation et le débit d'aération .

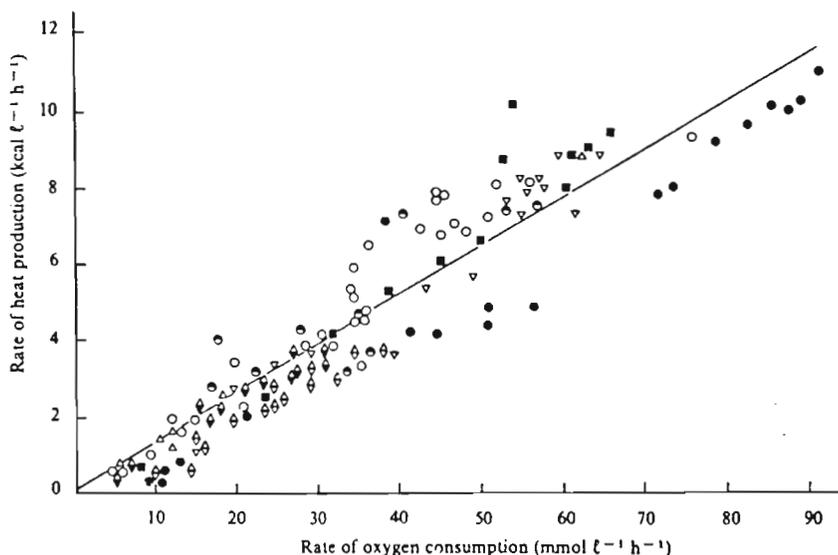


Figure 6: Corrélations entre la vitesse d'utilisation d'oxygène et la chaleur de fermentation. (\diamond), *A. niger* - glucose; (\bullet), *A. niger* - mélasses (Wang *et al.*, 1979)

2.3.3. Classification des fermenteurs

Elle est basée sur plusieurs critères liés soit aux propriétés hydrodynamiques des phases, soit à la nature de l'agitation, soit à la technique d'injection d'énergie. Cette dernière permet de classer l'ensemble des bioréacteurs en trois groupes (fig. 7) :

- Mécanique (turbines, pompes...)
- Pneumatique (colonnes à bulles, gazosiphon...)
- Mixte couplant les deux techniques d'injection précédentes.

Le choix d'un fermenteur pour une fermentation déterminée, dépendra de la morphologie du microorganisme, de ses capacités à supporter les forces de cisaillement, de sa cinétique de croissance, sa demande biologique en oxygène et la chaleur de fermentation. Ce choix dépendra également de la nature du substrat et du mode de fermentation à mettre en œuvre (batch ou continu). Le tableau 10 reporte les coefficients de transfert d'oxygène de quelques réacteurs.

Tableau 10: Coefficients de transfert d'oxygène de quelques réacteurs
(Mavituna et Sinclair, 1985).

| Fermenteur | K_{La}, h^{-1} |
|------------------------------|------------------|
| Erlenmeyer | 8 - 200 |
| Fermenteur agité (turbine) | 325 - 2650 |
| Colonne à bulles | 140 |
| Réacteur à cycle de pression | 400 |
| Lit fixé à écoulement | 350 |
| Airlift à boucles | 350 |
| Réacteur à plateaux perforés | <1000 |
| Roue lamellée tournante | 1000 |

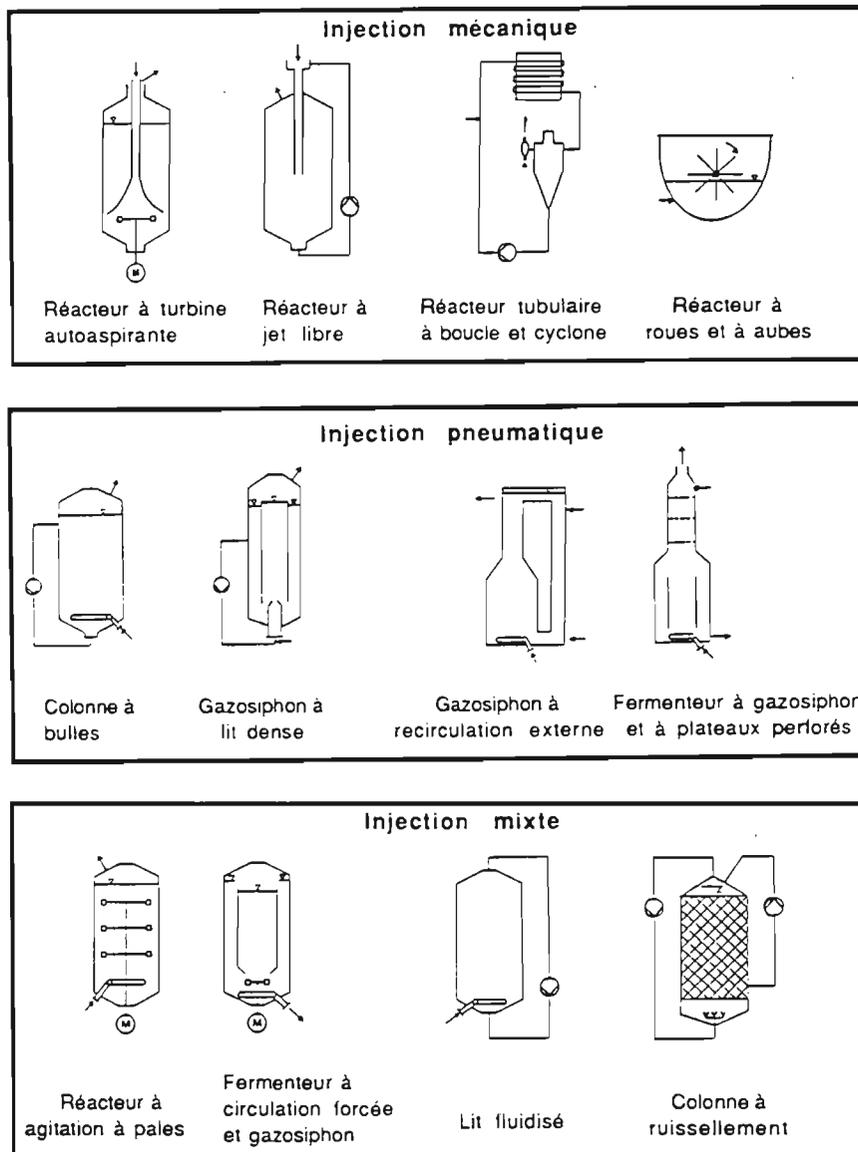


Figure 7: Classification des fermenteurs aérobies en fonction de l'injection de l'énergie
(Labit, 1981).

3. La digestion anaérobie (Biométhanisation)

3.1. Aspects biochimiques et microbiologiques de la digestion anaérobie

La fermentation méthanique est réalisée par un ensemble extrêmement complexe d'espèces bactériennes qui, dans des conditions d'environnement bien précises (potentiel redox inférieur à - 350 mV, pH voisin de la neutralité), forment des associations stables (Dubourguier *et al.*, 1982). Hobson *et al.* (1981) ont défini la biométhanisation comme la minéralisation d'un substrat complexe, contenant généralement des carbohydrates, des lipides, des protéines, des composés azotés non protéiques, des sels et matériaux non fermentescibles, pour aboutir à la formation de gaz (CO₂, CH₄, H₂S, NH₃), de corps microbiens, de déchets stabilisés et déshydratés et d'eau.

Dans un digesteur, on distingue classiquement 4 étapes successives : l'hydrolyse des polymères, la fermentation des monomères ou acidogénèse, l'acétogénèse avec production obligée d'hydrogène et la méthanogénèse *sensu stricto* (Fig. 8).

3.1.1. Hydrolyse et acidogénèse

Le rôle de l'acidogénèse dans la dégradation de la matière organique complexe contenant des polysaccharides, des lipides, des protéines ou des substances plus ou moins biodégradables consiste en une hydrolyse enzymatique suivie d'une fermentation avec la production de molécules organiques simples. De nombreuses bactéries hydrolysent les hexoses en sucres simples, eux-mêmes catabolisés en deux molécules de pyruvate par la voie d'EMBDEN-MEYERHOFF-PARNAS, ou par la voie de l'hexose-monophosphate. Les métabolites formés lors de la fermentation des polymères glucidiques sont des acides organiques (acétique, propionique, butyrique, valérique, lactique), des composés neutres (éthanol), des produits gazeux (gaz carbonique et hydrogène) et de l'ammonium (Le Ruyet *et al.*, 1984).

Dans les écosystèmes anaérobies, la dépolymérisation et la fermentation des molécules complexes ont lieu grâce à une grande diversité de bactéries, mésophiles ou thermophiles, anaérobies strictes ou facultatives. Les dénombrements de Thiel et Hattingh (1967) ont montré que les bactéries anaérobies strictes sont environ cent fois plus nombreuses que les bactéries anaérobies facultatives; ce rapport reste relativement constant quelles que soient les conditions.

Les bactéries hétérolactiques utilisent la voie de l'hexose-phosphocétolase pour aboutir à la formation d'une mole d'acide pyruvique, une mole d'acétylphosphate, une mole de

Les espèces homoacétiques produisent trois moles d'acide acétique. Les voies de fermentations hétéroacides aboutissent à un mélange d'acides succinique, formique, propionique et butyrique à des taux de production variables.

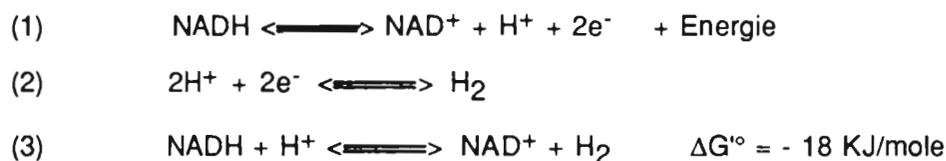
Dans le cas des populations bactériennes traitant des glucides facilement fermentescibles, le lactate est un intermédiaire important dans la production d'acides gras volatils (AGV) (Albagnac *et al.*, 1981). Dans les fermenteurs à pH voisin de la neutralité, les bactéries qui fermentent le lactate appartiennent le plus souvent aux genres *Propionibacterium*, *Eubacterium* ou *megasphaera* (Samain, 1982).

La dégradation anaérobie des composés azotés et des lipides a été peu étudiée. Les bactéries protéolytiques semblent appartenir pour la plupart au genre *Clostridium* et se distinguent de celles rencontrées dans le rumen par leur Gram généralement positif (Couplet et Albagnac, 1978). La partie carbonée des protéides et des acides aminés est dégradée en AGV tandis que la partie azotée conduit à l'ammoniac.

Les bactéries lipolytiques sont elles aussi mal connues. On peut citer *Anaerovibrio lipolytica* (Hobson et Mann, 1961). Après action des lipases bactériennes (Henderson, 1971), le glycérol rejoint la voie d'EMBDEN-MEYERHOF. Par contre, la dégradation anaérobie des acides gras à longue chaîne comme la majorité des composés aromatiques, se heurte à une barrière thermodynamique analogue à celle rencontrée lors de la dégradation des AGV.

Rôle de l'hydrogène dans l'acidogénèse

La production d'H₂ lors de l'acidogénèse a été mise en évidence expérimentalement par Sykes (cité par Ghosh 1972). L'hydrogène résulte des réactions assurant le transfert d'électrons dans la dégradation de la matière organique. Au cours de la glycolyse, les transporteurs de protons tels que le NAD réduit, sont oxydés et libèrent hydrogène et énergie selon les équations suivantes :



La concentration en NADH n'est pas limitante dans la cellule. La concentration en hydrogène régule l'équilibre de la réaction (3) soumise aux règles thermodynamiques.

Mosey (1983) a calculé la relation entre la concentration en hydrogène dans la

phase gazeuse et le rapport NADH/NAD⁺. Si la pression partielle d'hydrogène est égale à 10⁻⁵ atm, alors $E(2H^+/H_2) = -0,27 \text{ V}$: la production d'hydrogène et la régénération des transporteurs sont possibles. Si $p_{H_2} = 10^{-3} \text{ atm}$, $E(2H^+/H_2) = -0,33 \text{ V}$; le transfert de protons pour la régénération du NAD⁺ par l'élimination de l'hydrogène moléculaire devient thermodynamiquement impossible ; la réaction 3 est déplacée dans le sens de la production de NADH. Les électrons générés par le métabolisme sont alors préférentiellement utilisés pour métaboliser le pyruvate en acides gras (propionique, butyrique, valérique, caproïque) et alcools (Mac Inerney *et al.*, 1981 b). L'élimination de l'hydrogène est principalement due à sa réduction par les méthanogènes. La concentration en hydrogène régule la répartition du carbone dans les différentes voies de synthèse des AGV. En effet, l'augmentation de la concentration d'H₂ conduit à l'accumulation accrue de produits de fermentation réduits et une diminution de la production d'acétate et d'H₂ (Cord-Ruwisch, 1987).

3.1.2. Acétogénèse

Cette étape, indispensable à la conversion complète d'un substrat complexe, transforme les métabolites issus de l'hydrolyse et de la fermentation des polymères (lactate, éthanol, propionate, butyrate, valérate, acides gras à longue chaîne, composés aromatiques) en précurseurs directs du méthane (acétate et mélange gazeux H₂ + CO₂).

Un groupe de bactéries s'est spécialisé dans la production d'acide acétique à partir des métabolites réduits de l'étape d'hydrolyse et de fermentation : les bactéries acétogènes.

La thermodynamique de ces réactions d'acétogénèse est défavorable dans les conditions standard et elles ne peuvent être couplées à la synthèse d'ATP (McInerney *et al.*, 1979). Elles ne deviennent possibles qu'à des pressions partielles d'hydrogène très faibles, de l'ordre de 10⁻⁴ - 10⁻⁵ atm. De même, la concentration en acétate joue un rôle important dans la cinétique de ces réactions.

Ainsi, Bryant *et al.* (1967) envisagent que l'acétogénèse soit couplée à une réaction thermodynamiquement favorable, consommatrice d'hydrogène, comme la méthanogénèse hydrogénotrophe. La démonstration de ce couplage a été faite grâce à la résolution de la culture de *Methanobacillus omelianskii*, isolée à partir de fécès de lapin enrichis à l'éthanol et capable de métaboliser l'éthanol en méthane selon la réaction:



Ce bacille est en réalité une association étroite entre une bactérie "S" croissant sur éthanol en présence d'hydrogène :



et une bactérie méthanogène "MOH", *Methanobacterium bryantii* effectuant la respiration du CO₂ :



La réaction globale est thermodynamiquement favorable. Le mécanisme est appelé **Transfert Interespèce d'Hydrogène Moléculaire**. Les acides gras autres que les acides formique et acétique, sont dégradés par un groupe d'organismes produisant acide acétique et hydrogène en association syntrophique avec les bactéries méthanogènes consommant l'hydrogène. L'hydrogène, produit lors de la première étape (acidogénèse), est utilisé dans la troisième étape (méthanogénèse) régulant ainsi le fonctionnement de la deuxième étape (acétogénèse) (Hobson et Shaw, 1971).

Ces travaux ont mis en évidence l'existence de genres bactériens caractéristiques des écosystèmes méthanogènes, les acétogènes productrices obligées d'hydrogène (O.H.P.A.) qui ne peuvent se développer qu'en association syntrophique avec des bactéries méthanogènes hydrogénophiles, des bactéries sulfato-réductrices ou des bactéries homoacétogènes. Plusieurs espèces de ces bactéries ont été décrites :

- L'organisme "S", initialement isolé par Bryant *et al.*, (1967) réalise l'acétogénèse à partir de l'éthanol. Cette souche a été perdue mais les travaux récents de Schink et Stieβ (1983) permettent de la rapprocher de *Pelobacter venetianus*.

- *Syntrophobacter wolinii* qui dégrade le propionate avec un temps de génération de 160 h (Boone et Bryant, 1980).

- *Syntrophomonas wolfei* réalise la β-oxydation des acides gras de 4 à 8 atomes de carbone (McInerney *et al.*, 1981 a); alors que *Syntrophomonas sapovorans* est capable de dégrader les acides gras de 4 à 18 carbones (Roy *et al.*, 1985).

- *Syntrophus buswellii*, isolé par Mountfort et Bryant (1982) est capable de dégrader le benzoate.

En présence de sulfate, l'acétogénèse peut être accomplie par des bactéries sulfato-réductrices en dégradant le lactate et l'éthanol (McInerney *et al.*, 1979) ou le propionate (Widdel et Pfennig, 1982). Enfin signalons que dans les milieux pauvres en sulfate, certaines espèces de *Desulfovibrio* peuvent réaliser l'acétogénèse à partir du lactate ou de l'éthanol en association syntrophique avec une méthanogène (Bryant *et al.*, 1977). Les organismes

acétogènes syntrophiques tels que *Syntrophobacter Wolinii*, sont 10 fois plus nombreux que les bactéries sulfato-réductrices dans la plupart des digesteurs industriels pauvres en sulfate (Verrier, 1984).

3.1.3. Méthanogénèse

La méthanogénèse est l'étape finale du processus de biométhanisation. Elle est réalisée par des bactéries à spectre nutritionnel très limité qui appartiennent au groupe des Archéobactéries. Ces bactéries méthanogènes se distinguent surtout des Eubactéries par :

- * Leur paroi qui contient peu de peptidoglycans, mais pas d'acide muramique, d'acide diaminopimélique, constituants caractéristiques des Eubactéries. De plus, leurs lipides membranaires sont composés d'éthers de phytanol ramifiés et non d'esters de palmitate comme les Eubactéries (Taylor, 1982).

- * Des coenzymes spécifiques qui peuvent être rangés en deux grandes catégories :

- Les transporteurs de groupements monocarbonés (coenzyme M, méthanoptérine facteur CDR ou méthanofuran).
- Les transporteurs d'électrons (coenzyme F₄₂₀ et F₄₃₀). Le coenzyme F₄₂₀ développe une fluorescence bleu-verte en lumière ultra-violette à 420 nm. (Cheesman et al., 1972).

- * Leur appartenance à un groupe phylogénétique distinct au sein des Procaryotes. Le séquençage de leur ARN ribosomal 16 S a confirmé leur originalité phlogénique et a permis de préciser leur classification (Balch et al., 1979).

On connaît actuellement une soixantaine d'espèces de méthanogènes. Leur morphologie est très variée. Ces bactéries méthanogènes sont divisées en trois groupes aux caractéristiques très distinctes :

- Les bactéries méthanogènes hydrogénotrophes qui réduisent le gaz carbonique par l'hydrogène pour donner du méthane.
- Les bactéries méthanogènes acétoclastes qui produisent le méthane par la décarboxylation de l'acétate.
- Les bactéries méthanogènes méthylotrophes qui produisent le méthane à partir du radical méthyl.

Bien qu'environ 72 % du méthane produit dans les biotopes méthanogènes (digesteurs, sédiments) proviennent de l'acétate (Zehnder et al., 1982), peu d'espèces méthanogènes capables d'utiliser ce substrat ont été isolées jusqu'à présent.

3.3. Biodégradation anaérobie des composés aromatiques

Pendant longtemps, il a été admis que la stabilité structurale de ces composés empêchait toute dégradation sans oxygène. Depuis, les travaux de Tarvin et Buswell (1934) ont montré que des composés aromatiques comme le benzoate, pouvaient être complètement dégradés en CO_2 et CH_4 . Les bactéries anaérobies qui dégradent les composés aromatiques sont sous la dépendance de la présence d'accepteurs d'électrons exogènes comme NO_3^- ou SO_4^{2-} pour les bactéries nitrato-réductrices ou sulfato-réductrices, ou endogènes pour les bactéries fermentatives ou syntrophiques associées aux méthanogènes.

3.2.1. Méthanisation des composés aromatiques simples

L'acétogénèse et la méthanogénèse sont des fermentations où le CO_2 peut jouer le rôle d'accepteur d'électrons. Alors que la fermentation du benzoate par des bactéries utilisant comme accepteur exogène d'électrons le nitrate ou le sulfate peut se faire par des cultures pures de ces organismes, la fermentation du benzoate en présence de CO_2 comme accepteur terminal d'électrons se fait obligatoirement par des cultures mixtes (Ferry et Wolfe, 1976) puisqu'aucun organisme capable de méthaniser le benzoate n'a été isolé en culture pure jusqu'à présent.

Outre le benzoate, plusieurs consortiums méthanogènes sont capables de métaboliser d'autres composés aromatiques. Clark et Fina (1952) ont montré que le catéchol et le protocatéchuate étaient fortement inhibiteurs de la formation de méthane et qu'ils ne semblaient pas dégradables. Cependant, En 1978, Healy et Young ont démontré que des cultures d'enrichissement dérivées de boues d'égoût après acclimatation, pouvaient dégrader le catéchol et le phénol en CO_2 et CH_4 . Plusieurs voies de production du méthane et de CO_2 à partir de différents composés aromatiques sont citées dans la littérature. En effet, la méthanisation du benzoate par deux populations bactériennes différentes donne par exemple deux voies différentes comme le montre la fig.9.

Ceci montre la très grande variété d'espèces capables de réduire le noyau benzénique par méthanogénèse. Le tableau 11 résume des exemples de composés aromatiques métabolisés par méthanisation.

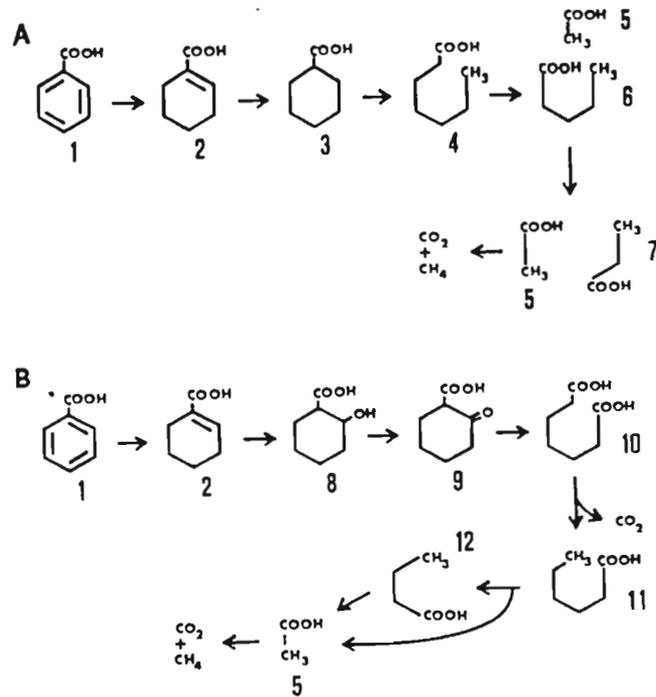


Figure 9: voie de dégradation du benzoate en méthane par une population mixte indéfinie.

A - D'après Keith *et al.*, 1978. B - D'après Shlomi *et al.*, 1978.

Tableau 11: Les composés aromatiques métabolisés par méthanisation.

| Composés | Inoculum | Références |
|---|-------------------------|----------------------------|
| Phénylacétate Benzoate Cinnamate Hydroxycinnamate Tyrosine | Boue non spécifique | Tarvin et Buswell, 1934 |
| Cinnamate Catéchol Phénol Protocatéchuate Syringate Vanillate | Boue non spécifique | Healy et Young, 1978 |
| Phénylacétate Phénylpropionate Catéchol | Sédiment non spécifique | Balba et evans, 1979 |
| 3,4,5-triméthoxybenzoate sinapate 2,3,4-Trihydroxybenzoate 2,6 diméthoxyphénol | Sédiment non spécifique | Kaiser et Hanselmann, 1982 |
| Benzoate Férulate | Consortium d'égout | Grbic-Galic et Young, 1985 |

Selon cette analyse bibliographique et en dehors des seuils de toxicité, les composés monoaromatiques (acides et alcools phénoliques) peuvent être métabolisés par méthanisation. Cependant les composés aromatiques de nature polymérisée ou complexe sont plus difficiles à dégrader.

3.2.2. Méthanisation des composés aromatiques complexes

Dans la littérature, seule la méthanisation de la lignine et des tanins est évoquée. Des études menées avec des lignines marquées au carbone 14 ont conclu soit à une absence de biodégradation, soit à une très faible dégradation (Hackett *et al.*, 1977). Par contre, la dégradation anaérobie paraît effective pour les oligogénols (PM < 1000) (Colberg et Young, 1982) issus de la dégradation aérobie de la lignine (Crawford *et al.*, 1983). Dans l'étude de Colberg et Young (1982), 25 % du carbone d'oligogénols de faible poids moléculaire ($400 < PM < 1000$) se retrouvent sous forme de $^{14}\text{CO}_2$ et $^{14}\text{CH}_4$ au bout de 20 jours. Ceci montre qu'un prétraitement physique, chimique ou enzymatique améliore la dégradation de la lignine. L'hydrolyse de la lignine est réalisée par les champignons et les bactéries ligninolytiques aérobies en fragments de plus faible poids moléculaire (Colberg et Young, 1982). Ces oligomères ont été complètement dégradés en CO_2 et CH_4 par des consortiums méthanogènes (Zeikus *et al.*, 1982). Ceci reste en faveur du prétraitement des composés aromatiques complexes pour une méthanisation plus facile comme le montre la fig. 10.

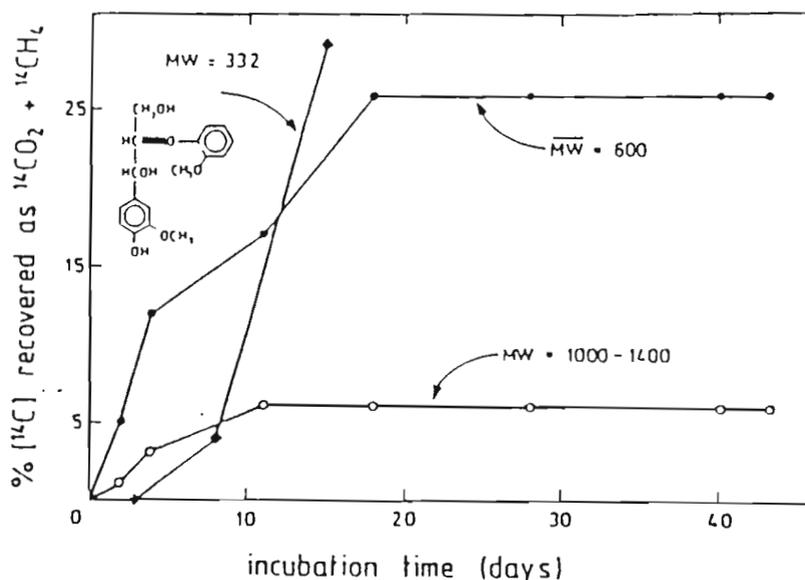


Figure 10: Effet de la masse moléculaire des oligogénols sur la cinétique de méthanisation de la lignine (Zeikus *et al.*, 1982).

En ce qui concerne les tanins, Field et Lettinga (1987) ont montré également que la méthanisation des tanins hydrolysables dépend de leurs concentrations et de leurs poids moléculaires (cf paragraphe 3.2.1.2.3.).

3.3. Facteurs influençant la biométhanisation

Le processus de biométhanisation est sensible à de nombreux facteurs ambiants: physiques, chimiques, microbiologiques, technologiques, la composition initiale du milieu et les produits du métabolisme (Nyns, 1987). Si les conditions de fermentation sont défavorables, altérant ainsi l'activité des méthanogènes, la formation d'hydrogène est bloquée et le transfert d'électrons oriente la dégradation du pyruvate en AGV et alcools, métabolites dégradés en syntrophie par les acétogènes et les méthanogènes si les conditions favorables sont rétablies (Marchand, 1983).

3.3.1. Composition du substrat

3.3.1.1. Nutriments

La digestion anaérobie est plus efficace lorsque le processus de biométhanisation n'est pas limité par des éléments nécessaires à la croissance et à l'activité des bactéries impliquées. Les rapports DCO : N : P ou DCO : N qui dépendent surtout du procédé et de la charge, doivent être optimisés. D'après Henze et Harremoes (1983), le rapport DCO : N diminue quand la charge massique augmente; la valeur minimale de ce rapport est de l'ordre de 350 : 7 et le rapport N : P peut être considéré de l'ordre de 7. Nyns (1987) propose la solution élégante du mélange de déchets riches en carbone (déchets urbains) avec des déchets riches en azote (déjections animales).

Les composés azotés interviennent d'une part dans l'équilibre ionique du milieu par relargage de NH_4^+ et d'autre part dans l'alimentation azotée des microorganismes (Nyns, 1987).

3.3.1.2. Les composés inhibiteurs

Certains composés sont inhibiteurs de la fermentation méthanique soit par leur simple présence, soit par leur concentration trop importante.

3.3.1.2.1. Les minéraux

Les cations ont un effet synergique, inhibiteur ou stimulant sur n'importe quel organisme, dès lors que leur concentration varie autour d'un certain seuil.

Les conditions de fermentation et la nature du substrat modifient largement ces valeurs. Bien que le couple NH_4/NH_3 participe à l'équilibre ionique du digesteur, l'ammoniac libre serait toxique à partir de 150 mg/l (Braun et Huss, 1982) tandis que l'ion NH_4^+ peut atteindre des valeurs extrêmes de 7 g/l (Kroeker *et al.* 1979). L'effet inhibiteur est dû à l'échange NH_4^+/K^+ cytoplasmique à travers la membrane provoquant ainsi l'alcalinisation du cytoplasme (Nyns, 1987). Les effets inhibiteurs des nitrates sont attribués à un métabolite qui modifierait les mécanismes biochimiques des bactéries méthanogènes (Taylor, 1982). Les sulfates provoquent une compétition entre bactéries sulfatoréductrices et méthanogènes pour les électrons.

3.3.1.2.2. Les acides gras

Les acides gras à longue chaîne (AGLC) inhibent fortement les bactéries et leur seuil de toxicité est variable selon le type de bactéries. Outre les bactéries méthanogènes, les bactéries fermentatives sont également affectées. L'acide oléique est le plus toxique pour les bactéries méthanogènes; à partir de 2 mM, il commence à inhiber l'activité méthanogène; à 5 mM, la production de méthane est complètement inhibée (Koster et Cramer, 1980). L'effet inhibiteur des AGLC augmente avec le nombre d'insaturations (Demeyer et Henderickx, 1967). Le phénomène de synergisme des AGLC est très fort et les mélanges d'AGLC diminuent fortement le seuil d'inhibition (Koster et Cramer, 1980).

D'après les travaux de Hanaki et Nagase (1981), la présence des AGLC augmenterait fortement le temps de latence de la production de méthane à partir des AGV. L'effet inhibiteur des AGLC peut être atténué par l'addition de calcium qui précipite une bonne proportion des AGLC qui seront alors solubilisés au fur et à mesure de leur dégradation (Roy *et al.*, 1985).

3.3.1.2.3. Les composés aromatiques

Les différentes populations bactériennes impliquées dans le processus de méthanisation peuvent être affectées par les composés aromatiques. Il semble que les bactéries dégradant les phénols soient plus inhibées par les phénols et leurs dérivés que les bactéries méthanogènes.

Le degré de toxicité des composés aromatiques dépend de leur nature et de leur degré de polymérisation (tableau 12). En effet, si les monomères taniques inhibent les bactéries méthanogènes à 50 % à partir de 3000 mg/l, les oligomères taniques de 3 à 9 unités inhibent les bactéries méthanogènes à partir de 350 mg/l et 700 mg/l, respectivement (Field et Lettinga, 1987).

Tableau 12: Seuil d'inhibition de la méthanisation par différents composés aromatiques.

| | Concentration donnant 50 % d'inhibition (mg/l) | Références |
|------------------------------|---|----------------------------------|
| Monomères phénoliques | | |
| - Catéchol | 3000 | Blum <i>et al.</i> , 1986 |
| - Phénol | 2250 | |
| - Pirésol | 1000 | |
| Monomères de lignine | | |
| - Ferulate | 2310 | Benjamin <i>et al.</i> , 1984 |
| - Guaïacol | 2200 | |
| Monomères taniques | | |
| - Pyrogallol | 3000 | Field et Lettinga, 1987 |
| - Résorcinol | 3190 | Chou <i>et al.</i> , 1978 |

3.2.2. Facteurs physico-chimiques

L'anaérobiose à un potentiel rédox de -330 à -550 mV, conduit à une implantation correcte des bactéries méthanogènes avec un optimum à -510 mV. En plus de l'anoxie, d'autres paramètres influent sur le déroulement de la biométhanisation.

3.2.2.1. La température

La fermentation méthanique est optimale à deux températures : en mésophilie à 35°C ou en thermophilie à 55°C. Cependant la digestion mésophile, plus stable, est plus économique compte tenu des besoins énergétiques nécessaires pour maintenir la culture à température constante. Les changements brusques de température peuvent causer un arrêt temporaire des activités bactériennes. Ces chocs de température qui arrêtent la production de biogaz peuvent être exploités pour faciliter la séparation des solides du liquide (Henze et Harremoes, 1983).

3.2.2.2. Le pH

Le processus global de biométhanisation présente le même optimum de pH que celui des bactéries méthanogènes qui se situe entre 6 et 8, bien que le pH optimum des bactéries acidogènes soit de 5 à 6. D'un point de vue physico-chimique, le pH a un effet sur l'azote ammoniacal, les AGV et le CO₂, éléments importants de la biométhanisation. Les bactéries méthanogènes s'implantent correctement au voisinage de la neutralité, entre pH 6,5 et 7,8 (Roques, 1981). Si elles sont tuées par une acidification du milieu, il semble cependant qu'elles s'adaptent aux pH alcalins jusqu'à 9,7.

Le processus de méthanisation repose sur l'équilibre entre la production d'AGV, de CO₂ et de protons H⁺ qui ont tendance à abaisser le pH (acidogénèse) et leur capture par les bactéries méthanogènes. Le moindre déséquilibre crée une surproduction de protons, une baisse de pH, le déplacement de l'équilibre acide non ionisé/sel, et l'inhibition des méthanogènes.

Lorsque l'effluent méthanisé présente un faible pouvoir tampon, certains auteurs préconisent une addition de chaux (Brown *et al.*, 1980) ou de bicarbonate de sodium (Lovan et Foree, 1972) de façon à ramener l'alcalinité du milieu aux environs de 2000 mg Ca CO₃/l.

3.2.2.3. Le CO₂ et la variation de pression

Le CO₂ produit au sein du liquide est transféré dans la phase gazeuse par désorption. On différencie deux régimes de désorption :

- La désorption non nucléée.
- La désorption nucléée.

Dans le premier cas, il n'y a pas de formation de bulles au sein du liquide, l'aire interfaciale ne dépend pas de la réaction chimique. Au contraire, lorsque la concentration en gaz dissous au sein du liquide dépasse une valeur critique, on constate la formation de bulles. C'est le cas de réacteurs à lit fixé. Pasivk - Bronikowska et Rudzinski (1980) ont supposé que le taux de nucléation est proportionnel à l'écart par rapport à la saturation.

L'élévation de la pression abaisse le débit de biogaz et augmente la concentration en méthane dans la phase gazeuse, de sorte que le débit de production de CH₄ reste pratiquement constant jusqu'à 400 kPa (Mangel *et al.*, 1980). Cependant, une pression partielle en CO₂ élevée ralentit la dégradation de l'acétate par les méthanogènes et l'acidogénèse du glucose, tandis qu'une pression de 0,2 bars en CO₂ maximise la dégradation du propionate (Hanson et Molin, 1981).

3.2.3. Facteurs microbiologiques et technologiques

La boue servant à l'inoculation du digesteur va s'acclimater plus ou moins rapidement pour minéraliser le substrat selon la technologie du procédé utilisé.

3.2.3.1. Propriétés cinétiques de la boue

Les bactéries hydrolytiques et fermentatives d'une part et les bactéries méthanogènes d'autre part qui sont contenues dans la boue, ont des performances cinétiques très différentes (Henze et Harremoes, 1983). La même espèce de bactérie n'assure également pas la même fonction au cours du temps. Par exemple, *Methanosarcina barkeri* qui a une vitesse de croissance spécifique relativement rapide mais une affinité pour le substrat faible, débutera la dégradation de l'acétate tandis que *Methanothrix*, à croissance lente mais à affinité élevée, minéralisera les traces résiduelles de substrat (Dagot, 1988).

Le rendement maximum en méthane (avec rendement en biomasse nul) peut être estimé théoriquement; il est de l'ordre de 0,350 l de méthane/g DCO pour les sucres et les acides organiques. Cette valeur sert de référence pour vérifier le bon fonctionnement de la fermentation méthanique et l'activité de la boue utilisée. Les rendements en biomasse et en méthane peuvent être affectés par plusieurs paramètres comme le type de procédé, la nature du substrat et les conditions opératoires ; le taux de production de méthane des processus thermophiles est par exemple de 25 à 50 % plus élevé que celui des processus mésophiles (Henze et Harremoes, 1983).

3.2.3.2. Choix et conduite du procédé

L'optimisation de la digestion anaérobie passe avant tout par le choix d'un procédé qui soit adapté au type de substrat. Il y a essentiellement deux stratégies:

- La première stratégie ne tient compte que de la nature physico-chimique du substrat.
- La seconde stratégie est basée sur la notion de profil fermentaire d'un substrat complexe. On distingue deux grands types de profils en fonction du pH final : les profils neutres (pH compris entre 6,5 et 7,5) et les profils acides (pH compris entre 4,5 et 6.) Par exemple, pour les substrats liquides à profil acide, on choisira un réacteur à deux étapes homogènes avec fixation des microorganismes dans la seconde phase; pour des substrats à profil neutre, un réacteur à une étape avec accumulation de la biomasse suffira.

Les digesteurs peuvent être alimentés en discontinu (une seule charge ou charges

multiples) ou en continu et le taux de dilution peut influencer la stoechiométrie d'une réaction. Ainsi Belaich (1981) a montré qu'un taux de dilution inférieur de 60 % de la vitesse spécifique de croissance maximum de *Streptococcus lactis*, modifiait les produits finaux de la fermentation qui d'homolactique devenait hétérolactique. La bactérie lactique *Streptococcus lactis* devient acétogène en produisant acétate, formate et éthanol. Le couplage est alors direct.

3.4. Technologie de la biométhanisation

3.4.1. Evolution

L'évolution des technologies des réacteurs a surtout été provoqué par les perspectives d'application du traitement anaérobie aux effluents liquides. Après les premières applications de la digestion anaérobie aux réservoirs septiques puis aux réacteurs infiniment mélangés (Fig. 11-a) plusieurs autres réacteurs ont été développés selon deux approches :

- * L'accroissement de la densité bactérienne dans les réacteurs en augmentant leur temps de rétention :

- Soit par le recyclage des boues, cas du procédé contact anaérobie (Fig. 11-b), soit par formation d'un lit de boues, cas du procédé UASB (Fig. 11-c) ou le réacteur à baffles (fig. 11-d), soit par adjonction d'une membrane de séparation des solides à la sortie de l'effluent (fig. 11-e).

- Soit par formation d'un film bactérien sur des supports. On distingue 3 types de réacteurs à film fixé : le filtre anaérobie à flux ascendant (Fig. 11-f), ou descendant (Fig. 11-g), le lit expansé (fig. 11-h) et le lit fluidisé (Fig. 11-i).

- * L'amélioration des activités bactériennes par l'optimisation du processus anaérobie. La séparation des phase acidogènes et méthanogène (Fig. 11-j) est une voie prometteuse (Cohen, 1983).

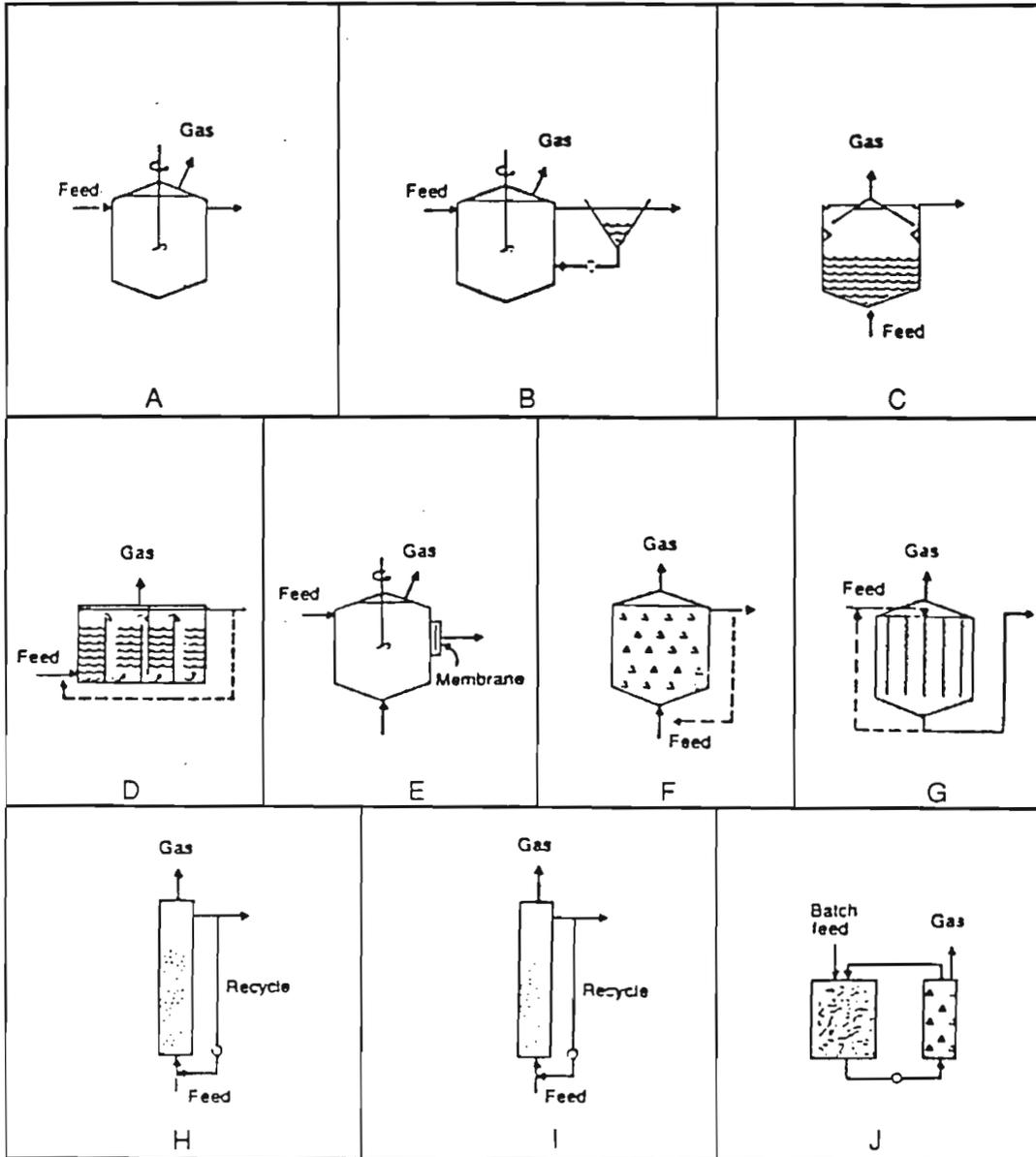


Figure 11: Procédés de la digestion anaérobie (d'après Speece, 1983).

3.4.2. Filtres anaérobies

Il y a 20 ans que le filtre anaérobie a été testé pour la première fois au laboratoire par Young et McCarty (1969). Dès lors, un grand nombre d'études ont été effectuées en laboratoire sur des substrats et des supports très divers, avant de permettre le développement d'installations à grande échelle (Bonastre et Paris, 1989).

3.4.2.1. Influence du support

L'efficacité d'un filtre anaérobie pour un maintien correct de la biomasse bactérienne peut résulter de deux phénomènes :

- Une adhésion des bactéries aux supports.
- Un piégeage d'agglomérats bactériens dans les volumes interstitiels.

Dans un lit fixé à support orienté ou dans un lit fluidisé, le phénomène d'adhésion des bactéries aux supports semble prépondérant ; par contre, dans le lit fixé à support en vrac, c'est le phénomène de piégeage qui semble dominer (Wilkie et al., 1982). Ainsi, Young et Dahab (1983) ont comparé quatre supports différents et ont montré que la taille des pores influait plus sur les performances que la surface spécifique. Un support bactérien pour être efficace, doit présenter un rapport surface spécifique sur volume très élevé, une texture rugueuse pour permettre l'adhésion bactérienne, une résistance mécanique, un prix économique et une porosité suffisante (Bonastre et Paris, 1989).

3.4.2.2. Démarrage des filtres anaérobies

L'étape qui précède la stabilisation du fonctionnement d'un réacteur sous une charge optimale est appelée étape de démarrage ou "start-up"; c'est l'étape la plus difficile (inoculation et acclimatation). La croissance des microorganismes et leur maintien dans le réacteur sont des paramètres importants du démarrage. En effet, d'après les travaux de Van den Berg et Kenedy (1982), la vitesse de démarrage des réacteurs sans retention de la biomasse bactérienne est fortement dépendante du taux de croissance de l'inoculum initial. Par contre, la vitesse de démarrage des réacteurs avec retention de la biomasse dépend fortement de la proportion de bactéries perdues dans l'effluent.

Diverses conditions de démarrage de réacteurs anaérobies à film fixé sont mentionnées dans la revue de Henze et Harremoës (1983).

La composition du substrat influe sur les performances, la stabilité et le bon fonctionnement du réacteur. Ainsi, les eaux résiduaires riches en sucres donnent des rendements plus élevés en biomasse et une agglomération des boues bien meilleure qu'avec des eaux résiduaires riches en acides organiques ou en protéines (Young et Dahab, 1983).

Des recherches ont montré que l'addition d'AGV ou d'un mélange de méthanol avec le substrat à traiter durant l'étape de démarrage, stimulait le développement des bactéries méthanogènes (Bonastre et Paris, 1989). Murray et Van Den Berg (1981) notent également que l'addition de nickel et de cobalt présente un effet activateur sur la vitesse de formation du film fixé.

A cause des faibles énergies de maintenance nécessaires à la survie des bactéries anaérobies et de la biomasse importante piégée dans le filtre anaérobie, ce dernier présente l'avantage de redémarrer rapidement après une année de non alimentation, ce qui le rend apte aux traitements des effluents des industries saisonnières (Bonastre et Paris, 1989).

3.4.2.3. Influence des conditions de fonctionnement

Soumis à des fluctuations importantes de leurs paramètres de fonctionnement (température, pH, charge volumique) autour des valeurs optimales, les filtres anaérobies ont montré une grande stabilité (Verrier, 1984). Ce type de réacteur, en assurant le maintien de la population bactérienne, permet une restauration plus rapide des conditions normales de fonctionnement.

D'après les travaux de Sharaa et Jewell (1984), la biométhanisation en lit fixé à 55°C a donné les mêmes vitesses de conversion et des performances équivalentes à celles obtenues en mésophilie. Le problème majeur de ces processus thermophiles est le très bas rendement en biomasse (50 % de celui du processus mésophile), ce qui conduit à un temps de démarrage très long et une acclimatation difficile lors des changements de charges ou de substrats (Henze et Harremoes, 1983).

La présence de matière en suspension dans le substrat diminue l'activité spécifique en diminuant le temps de rétention de la boue dans le réacteur (Van Den Berg *et al.*, 1980).

3.4.2.4. Effets des composés toxiques

L'utilisation de procédés à cellules fixées s'est avéré un moyen efficace pour limiter les effets toxiques ou inhibiteurs de ces composés. Ils tolèrent des concentrations transitoires de composés tels que cyanure, formaldéhyde, ammonium, sulfite, beaucoup plus importantes que les réacteurs à cellules libres (Parkin et Speece, 1982).

La biodégradation du phénol par un consortium méthanogène nocif et par un consortium méthanogène immobilisé dans l'agar à 2 %, a montré qu'en absence d'inhibition (0,5 g/l), la production de méthane par le consortium non immobilisé est plus rapide et plus élevée. Cependant, pour les concentrations inhibitrices (1 g/l), la production de méthane par le consortium immobilisé est plus élevée (Dwyer *et al.*, 1986). Ceci a été expliqué par le fait que les paramètres cinétiques (V_{max} , K_m , K_i) ont été modifiés par l'immobilisation et que l'étape de saturation est plus large dans le cas du consortium immobilisé.

MATERIELS ET METHODES

1. Matériel biologique

Les microorganismes aérobies ou anaérobies utilisés l'ont été sous plusieurs formes :

- Les champignons et les bactéries aérobies
- consortium anaérobie
- boues anaérobies

1.1. Les champignons et les bactéries aérobies

Les souches d'*A. niger* qui ont servi à la sélection d'un champignon pour la bioconversion des margines proviennent de la collection du Centre de Biotechnologie de Sfax, du laboratoire de l'ORSTOM de Montpellier, ainsi que des isollements de l'environnement des huileries.

Les spores ont été obtenues sur des milieux gélosés préparés à partir des margines complétées en sulfate d'ammonium (10 g/l) et en agar (18 g/l). Ce milieu est réparti en erlenmeyers puis stérilisé, ou bien en boîtes de Pétri après stérilisation. Après refroidissement, il est inoculé par les spores du champignon obtenues en boîtes de Pétri ou en erlenmeyers. Après incubation à 35 °C, les spores sont récupérées après addition d'eau distillée stérile avec 0,08 % de tween 80 et grattage à l'aide d'une baguette de verre dans le cas des boîtes de Pétri ou par agitation dans le cas des erlenmeyers. L'addition de billes en verre dans le cas des erlenmeyers facilite la récolte des spores.

Dix bactéries ont été isolées à partir des margines fermentées. La souche n° 11 correspond à *Pseudomonas putida*. Ces bactéries ont été utilisées pour l'étude de la dégradation des acides phénoliques des margines et pour la formation de la boue activée. Elles ont été conservées sur un milieu gélosé constitué de 50 % de gélose nutritive et 50 % de margines fermentées par *A. niger*.

1.2. Consortium anaérobie

Ce consortium est formé de bactéries anaérobies strictes (*Clostridium*) qui ont été isolées du tractus digestif de termites humivores (Brauman, 1989). Ce consortium a été utilisé pour le dopage de la boue anaérobie servant à la méthanisation des margines.

1.3. Inocula anaérobies

Plusieurs inocula d'origines différentes ont été utilisés pour l'étude de la

méthanisation des margines en petits flacons et en réacteurs. Ce sont essentiellement :

- des bouses de vaches
- des boues du digesteur urbain d'Aix en Provence
- des granules issus d'un digesteur UASB (Hollande)
- du lisier de Porc.

2. Les milieux de culture

Selon l'objectif de l'expérience, le milieu de culture est synthétique ou formé de margines complémentées en sel.

2.1. Les milieux synthétiques

Les milieux de culture utilisés stérilement pour la culture aérobie des bactéries et des champignons durant 5 jours sur des acides phénoliques, sont respectivement les milieux (1) et (2) suivants:

Milieu 1:

| | |
|---------------------------|----------|
| Sulfate d'ammonium | 1 g/l |
| Dihydrogénophosphate de K | 3 g/l |
| Sulfate de magnésium | 0,5 g/l |
| Sulfate de fer | 0,01 g/l |
| Chlorure de calcium | 0,05 g/l |
| Extrait de levure | 1 g/l |
| Peptone | 2 g/l |
| Composé aromatique | 2 g/l |
| pH | 7,2 |

Milieu 2:

| | |
|---------------------------|---------|
| Sulfate d'ammonium | 4 g/l |
| Dihydrogénophosphate de K | 2 g/l |
| Sulfate de magnésium | 0,5 g/l |
| Extrait de levure | 0,5g/l |
| Composé aromatique | 5 g/l |
| pH | 5,5 |

Milieu 3: Il est composé d'un mélange à 50 % de gélose nutritive (Difco) et de margines

fermentées par *A. niger*. Il a été utilisé pour l'isolement, le dénombrement et la conservation des bactéries des boues activées.

Milieu 4: (Tampon de Dolfig, 1985)

| | |
|---------------------------------|---------|
| NaHCO ₃ | 10 g/l |
| NH ₄ Cl | 0,5 g/l |
| K ₂ HPO ₄ | 0,4 g/l |
| KH ₂ PO ₄ | 0,3 g/l |

Ce milieu est préparé en anaérobiose sous N₂/CO₂, pH: 7.

Milieu 5: Solution minérale et solution de vitamines (Balch *et al.*, 1979). Elles ont été ajoutées aux margines fermentées servant à l'alimentation des digesteurs durant les étapes de démarrage.

2.2. Les margines

Les margines ont été conservées à 4°C. Elles peuvent être utilisées soit sous forme gélosée, soit sous forme liquide après apport de sels. Elles ont été prélevées soit:

- * Du séparateur, directement au cours du processus d'extraction d'huile d'olive (margines Gard 87, Sfax 89 et 90).
- * Des bassins de récupération d'huile dans les huileries (margines Boughrara 88).
- * Des camions-citernes transportant les margines des huileries jusqu'à la station d'épuration de la ville de Sfax (margines Station 90 et d'autres échantillons qui ont servi à l'établissement des corrélations).

3. Les conditions de fermentations

Selon que les études sont faites en aérobiose ou en anaérobiose, en petit volume ou en grand volume, les fermenteurs et les conditions opératoires sont différents. Dans plusieurs cas, ces fermenteurs aérobies et anaérobies ont été utilisés dans les mêmes installations en parallèle pour comparer leurs performances ou en série pour réaliser des traitements successifs.

3.1. Cultures aérobies en erlenmeyer

Les cultures des moisissures et des bactéries en petit volume ont été réalisées en

erlenmeyer de 250, 500 ou 1000 ml agités sur une table d'agitation (Biolafitte). Ces erlenmeyers sont remplis de milieu de culture au $1/10^e$ de leur volume total.

3.2. Cultures aérobies en fermenteur

Essentiellement 3 types de fermenteurs ont été utilisés : un fermenteur agité et une colonne à bulles pour la culture d'*A. niger*, et un lit fluidisé pour les boues activées.

3.1.2. Le fermenteur agité

Le fermenteur utilisé (Interscience, St-Nom la-Bretèche) est de géométrie standard et le volume total est de 2 l. Le système d'agitation mécanique est formé de deux pales de Rushton (fig. 12). Il est muni d'un système d'aération et d'une régulation thermique. L'agitation et l'aération ont été fixées à 300 tr/min et 1,2 VVM respectivement.

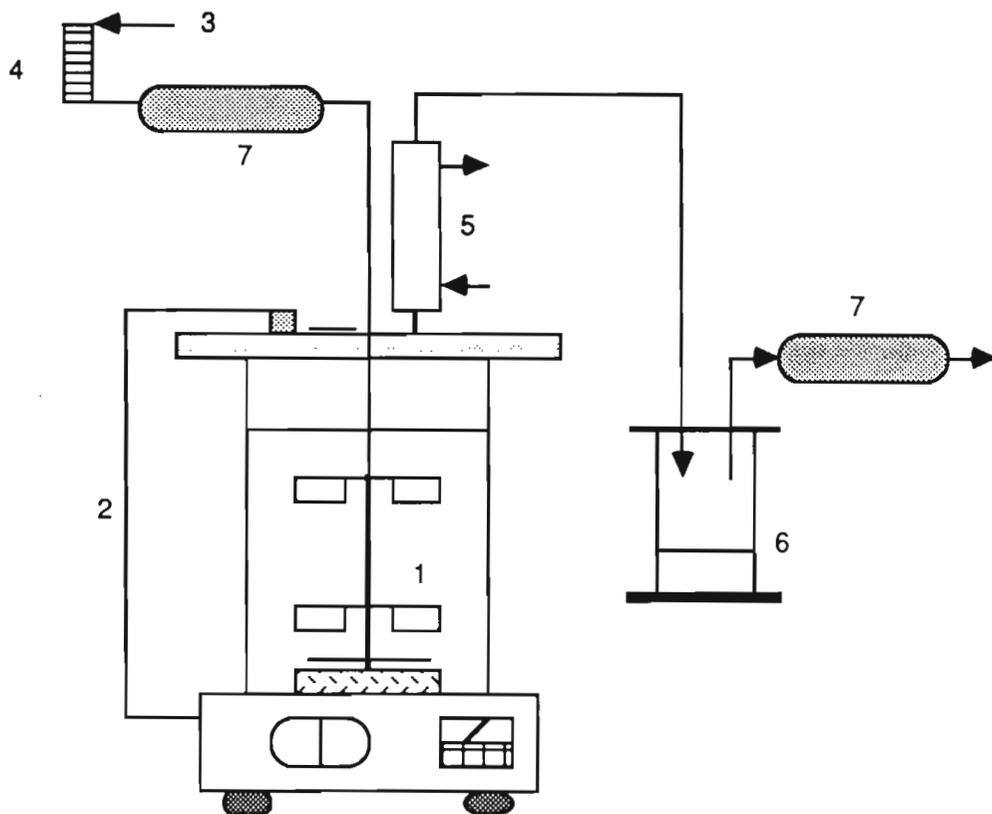


Figure 12: Schéma du fermenteur agité de 2 litres.

1: Réacteur, 2: Système de régulation de température, 3: Arrivée d'air, 4: débit-mètre, 5: Condensateur de vapeurs, 6: Récupération de condensat, 7: filtre à air.

3.2.2. Colonne à bulles

Ce fermenteur est formé d'une colonne en plexiglass de 55 cm de longueur et de 8 cm de diamètre. Le volume total est de 2.4 l et le volume liquide a été fixé à 2 l. Il est muni d'une jaquette pour maintenir constante la température de fermentation. L'air arrive par le bas du fermenteur au travers d'un disque perforé de 5 cm de diamètre (fig. 13; planche 1).

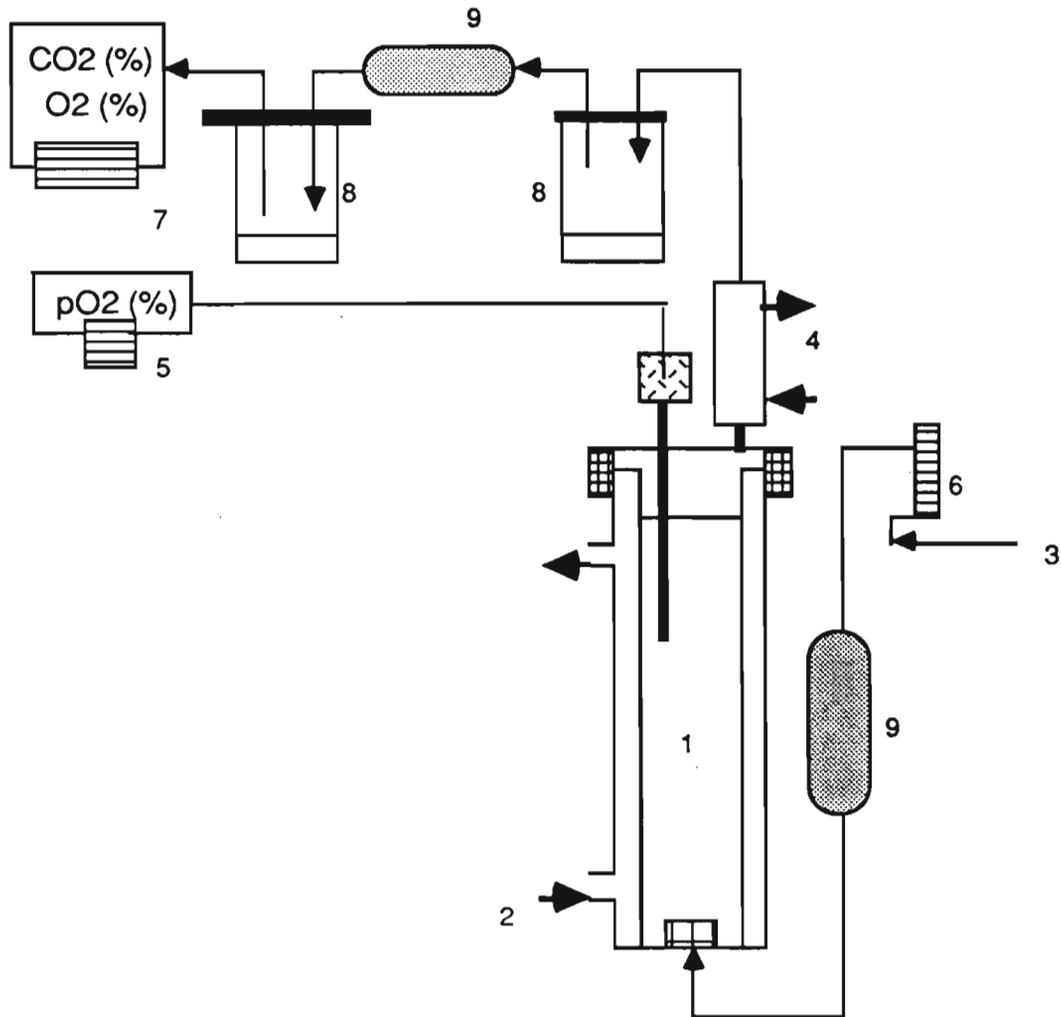


Figure13: Schéma de la colonne à bulles.

1: Réacteur, 2: Système de régulation de température, 3: Arrivée d'air, 4: Condensateur de vapeurs, 5: Mesure de pO_2 , 6: débit-mètre, 7: Analyseur de pourcentage de CO_2 et d' O_2 , 8: Récupération de condensat, 9: filtre à air.

Ce fermenteur est équipé d'un condensateur pour limiter les pertes en eau du milieu de fermentation par évaporation, et d'une sonde à oxygène ampérométrique (ou polarographique) pour la mesure de la pression partielle en oxygène dans le fermenteur. Les

pourcentages de CO₂ et d'oxygène sont mesurés par un analyseur d'oxygène et de CO₂ (The analytical development Co LTD, Hodson, Angleterre) après condensation des vapeurs d'eau contenues dans les gaz de sortie et leur séchage à travers un système de déshydratation. L'étalonnage de l'analyseur a été réalisé avec du CO₂ (6 %) et de l'oxygène (18 %).

Ce fermenteur a été couplé à d'autres réacteurs comme le montrent les fig. 14 et 18.

3.2.3. Lit fluidisé

Ce fermenteur consiste en une colonne de verre de 45 cm de hauteur et 4,5 cm de diamètre. Le volume du liquide est de 0,5 l. Il est muni d'une double enveloppe pour maintenir constante la température de fermentation. Un décanteur est utilisé pour recycler la boue et le support échappés dans l'effluent (planche 1). Ce fermenteur a été alimenté en parallèle ou en série avec le filtre anaérobie à partir des margines fermentées en colonne à bulles (fig. 14 et 18).

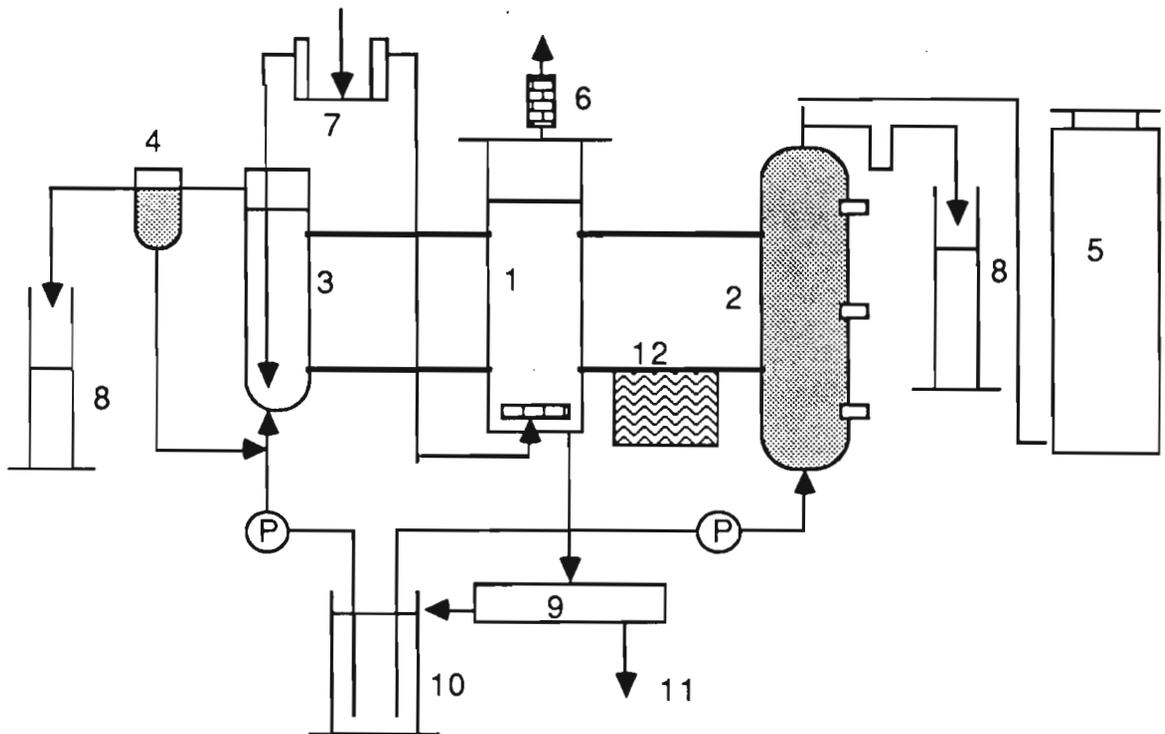


Figure 14: Schéma du lit fluidisé et du filtre anaérobie couplés à la colonne à bulles.

1: Colonne à bulles, 2: Filtre anaérobie, 3: Lit fluidisé, 4: Décanteur, 5: Gazomètre à cloches, 6: Condenseur, 7: Arrivée d'air et débitmètres, 8: Effluents, 9: Filtration, 10: Bac d'alimentation, 11: biomasse, 12: Système de régulation de température.

L'aération a été fixée entre 0,6 et 0,8 VVM. Le support utilisé est formé de 50 g de particules de coques d'olives qui proviennent de l'usine d'extraction d'huile par solvant à partir des grignons. Après lavage à chaud dans une solution d'acide phosphorique 0,5 N pour enlever les pulpes d'olives, les coques sont lavées à l'eau distillée et séchées pour être utilisées comme support bactérien.

3.3. Cultures anaérobies en petits flacons

Les cultures ont été réalisées selon deux façons :

- La première basée sur les techniques développées par Hungate (1969). Les inoculums (boues, consortium ou bactéries définies) et les substrats sont répartis dans des flacons-sérum de 60 ou 120 ml remplis au 1/3 selon la technique de Balch *et al.* (1979). Les flacons sont fermés à l'aide de bouchons en butyl noir (Bellco Glass, Inc, Vineland, N.J.) puis gazés avec l'atmosphère désirée (N_2 ou N_2/CO_2). Enfin 0,1 ml d'une solution de Na_2S (1,5 %) sont apportés au milieu. Au cours de l'incubation, le méthane prélevé par une seringue dans l'atmosphère du flacon est mesuré par CPG (fig. 15 a).

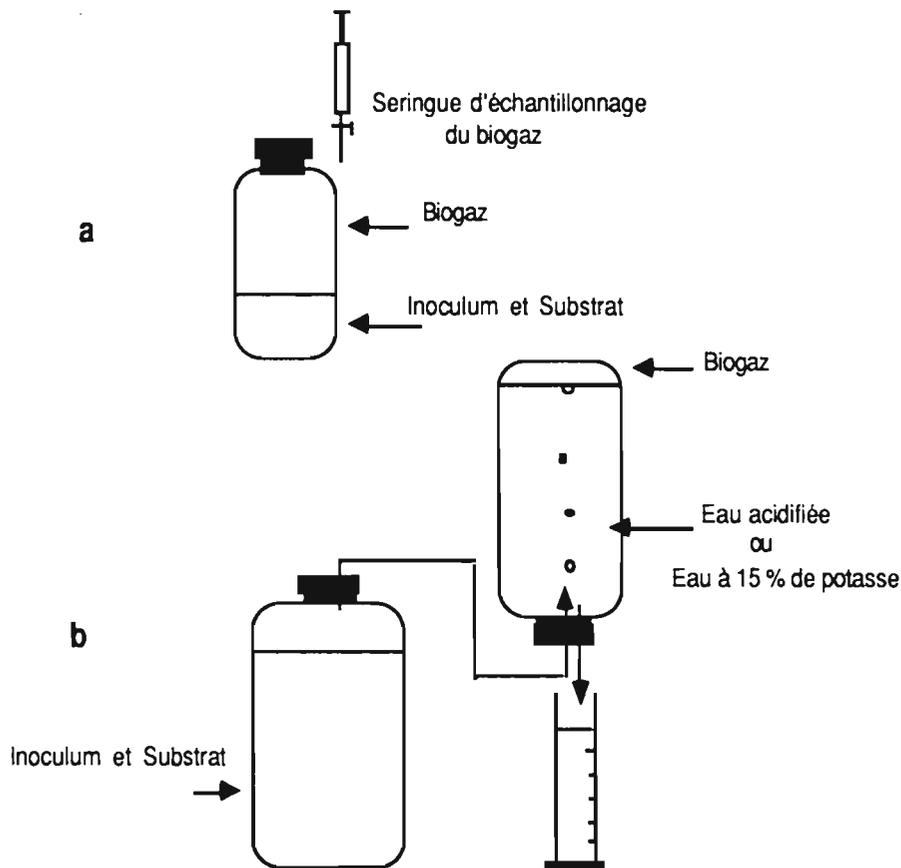


Figure 15: Schéma des incubateurs anaérobies en batch.

- Les batchs sont réalisés suivant le schéma de la fig.15 b. Des flacons-sérum sont remplis avec l'inoculum et le substrat. Le biogaz produit passe au travers d'une solution de potasse à 1,5 %; le CO₂ s'y dissout et le volume de méthane obtenu correspond au volume déplacé de potasse. En absence de potasse, le volume déplacé correspond au volume de biogaz et le pourcentage de méthane est mesuré par CPG.

3.4. Méthanisation en digesteurs

Plusieurs digesteurs ont été utilisés pour l'acclimatation des inoculums ou pour déceler leur efficacité à traiter les margines. Ces digesteurs ont été alimentés en continu ou séquentiellement en utilisant des programmeurs. Au cours de ce travail, deux types de gazomètres ont servi à mesurer le biogaz produit par les différents réacteurs : le gazomètre à déplacement d'eau (fig. 16) et le gazomètre à cloche (fig. 14, 15, 17 et 18).

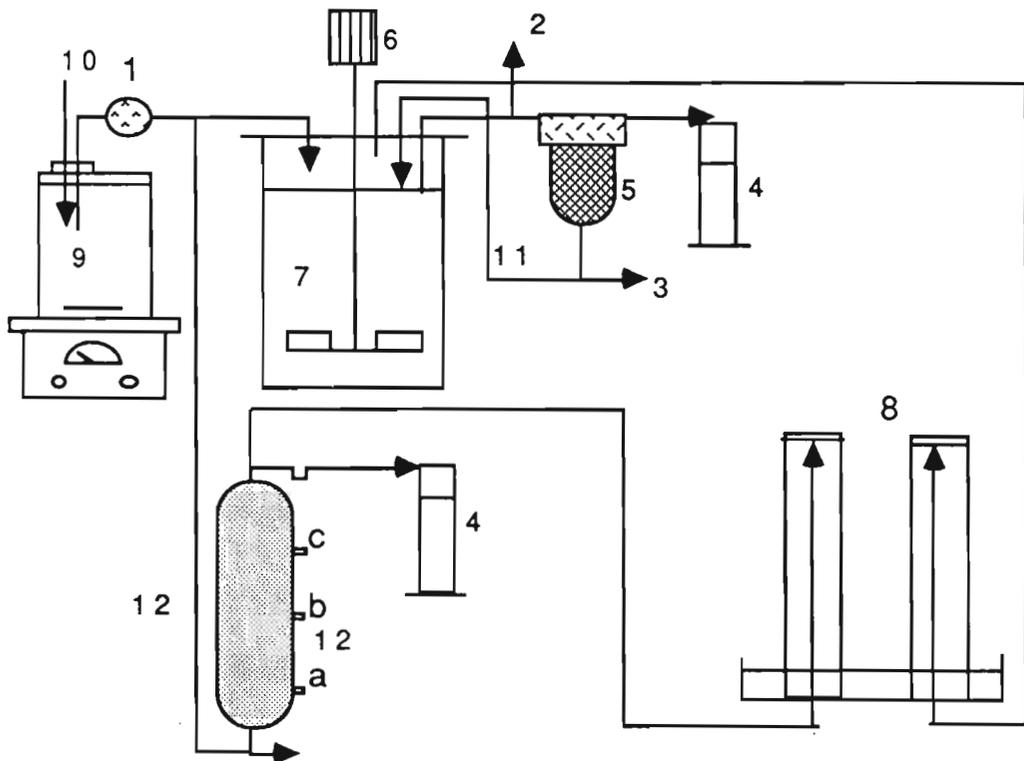


Figure 16: Schéma des réacteurs contact anaérobie et filtre anaérobie.

1: Pompe d'alimentation, 2: Prélèvement de boues, 3: Purge de boues, 4: Effluents, 5: Décanteur, 6: Moteur d'agitation, 7: Fermenteur agité, 8: Gazomètre à déplacement d'eau, 9: Bac d'alimentation agité, 10: Barbotage d'azote, 11: Recyclage de boues, 12: Filtre anaérobie. a, b et c: points de prélèvements.

3.4.1. Le digesteur contact anaérobie

Ce procédé est formé d'un fermenteur Biolafitte de 10 l et d'un décanteur de 1 l. Le volume utile du fermenteur est fixé à 7,5 l. L'agitation est de 75 tr/min. Ce digesteur agité a été alimenté parallèlement avec le filtre anaérobie à partir du bac d'alimentation (fig. 16).

3.4.2. Les filtres anaérobies

Deux réacteurs de géométrie et de dimensions différentes ont été utilisés pour étudier leur efficacités à traiter les margines:

- 2 colonnes à double enveloppe conçues en PVC de 50 cm de longueur et de 8 cm de diamètre interne. Le premier digesteur a été garni à l'aide de support ordonné en PVC, le second avec de l'argile; le volume de ce filtre est de 2 l (fig. 17).

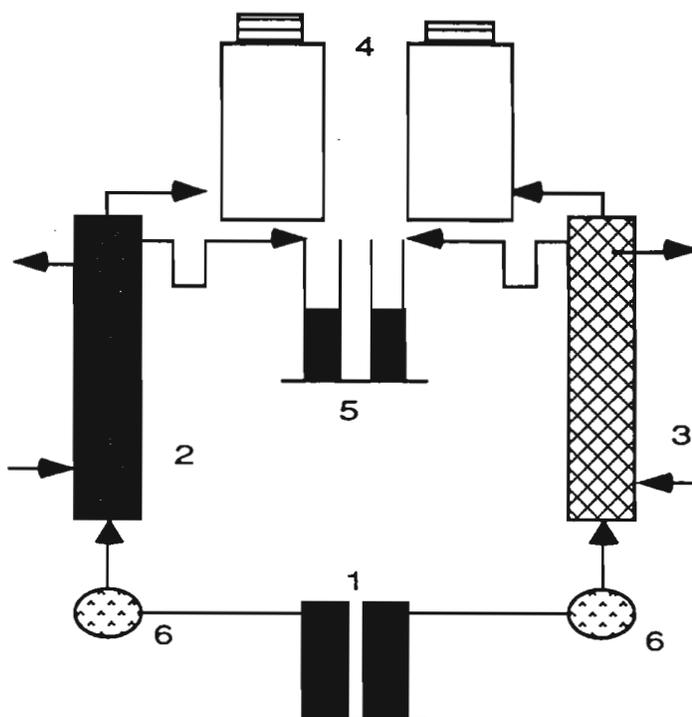


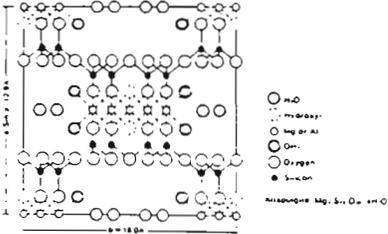
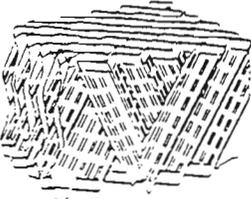
Figure 17: Schéma des filtres anaérobies à support en argile et en PVC.

1: Bac d'alimentation, 2: Filtre anaérobie à support en argile, 3: Filtre anaérobie à support en PVC, 4: Gazomètre à cloche, 5: Effluent, 6: Pompe d'alimentation.

- Une colonne en verre à double enveloppe de 45 cm de longueur et de 12 cm de diamètre interne. Le volume total est de 4,5 l. Ce filtre a été garni de 750 g de fragments de gaines électriques (planche 1). Ce filtre anaérobie comporte 3 points de prélèvements comme le montre les fig. 14 et 16.

Les caractéristiques des supports utilisés sont données dans le tableau 13.

Tableau 13: Géométrie et caractéristiques des supports bactériens utilisés.

| Géométrie | Porosité (%) | Surface spécifique |
|--|--------------|-----------------------------------|
| Fragments de gaines électriques (L: 15 mm, l: 10 mm)  | 83 | - |
| Argile (D : 5 mm)  | 40 | 125 m ² /g |
| PVC ordonné  | 95 | 98 m ² /m ³ |

3.5. Installation à l'échelle du laboratoire de dépollution biologique des margines

Cette installation résulte de l'association des réacteurs antérieurement étudiés (planche 1). La colonne à bulles, le filtre anaérobie à gaines électriques et le lit fluidisé à boues activées ont été placés en série (fig. 18). L'ensemble est thermostaté par le même bain-marie à 35 °C.

Après inoculation de la colonne à bulles remplie de 2 l de margines complémentées

en sels, la fermentation en batch est initiée par l'envoi d'air. Après trois jours de fermentation, la biomasse est collectée par filtration et le filtrat est récupéré dans le bac n° 10 où il est ajusté à pH 7,8 à l'aide de la chaux. Les eaux de lavage du fermenteur et du système de filtration servent à diluer ce substrat qui va alimenter le filtre anaérobie. Le biogaz produit est récupéré dans le gazomètre à cloches. L'effluent du filtre anaérobie est collecté dans le bac n° 7 pour servir d'alimentation du lit fluidisé. L'effluent de ce dernier est collecté dans le bac n° 6 après décantation des boues et des particules du support dans le décanteur.

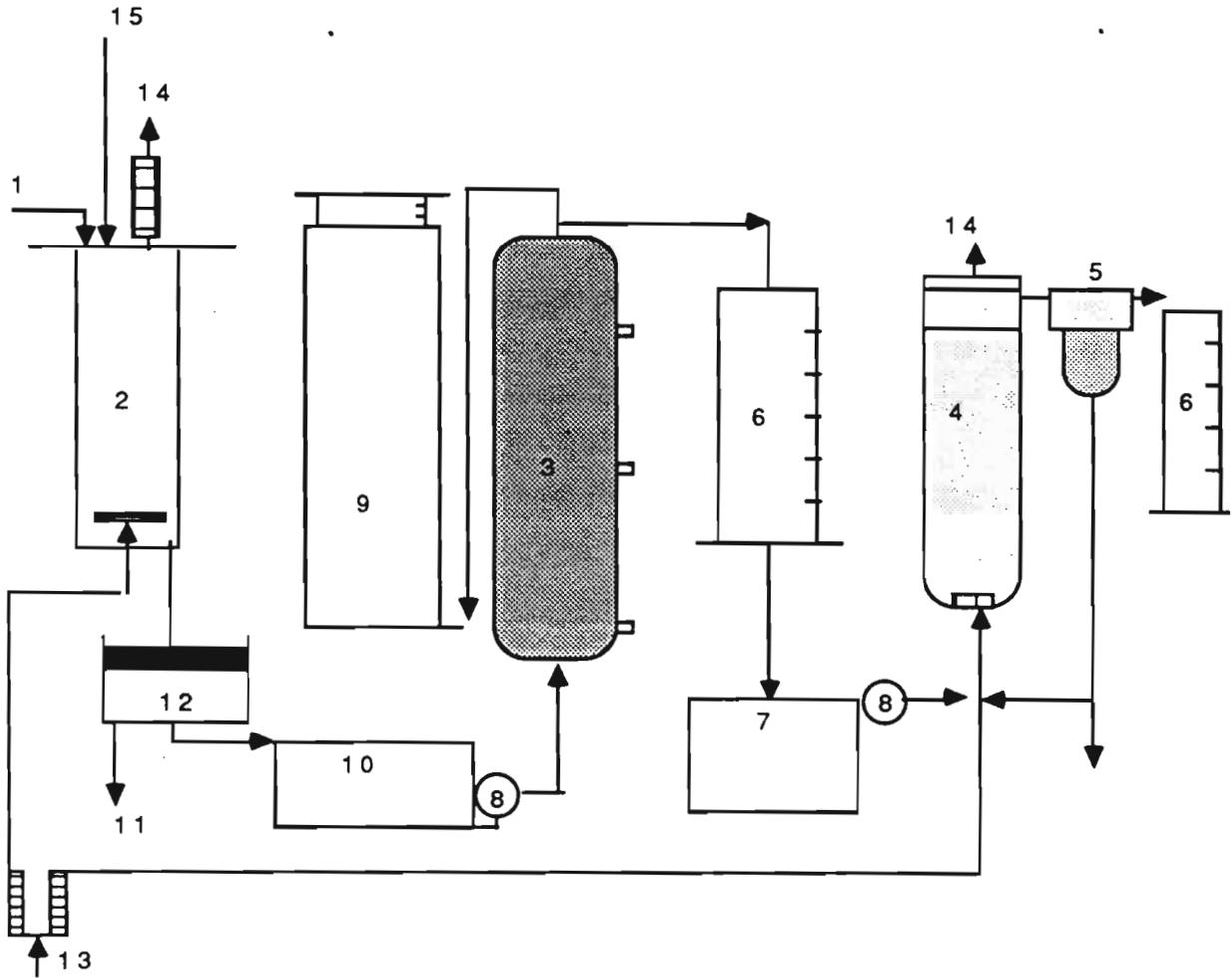


Figure 18: schéma de l'installation à l'échelle de laboratoire de dépollution biologique des margines.

1: Arrivée des margines, 2: Colonne à bulles, 3: filtre anaérobie, 4: Lit fluidisé, 5: Décanteur, 6: Effluent, 7: Bac d'alimentation du lit fluidisé, 8: Pompe, 9: gazomètre à cloche, 10: Bac d'alimentation du filtre anaérobie, 11: Biomasse, 12: Filtration, 13: Arrivée de l'air, 14 : Sortie des gaz, Sels et inoculum.

4. Techniques de dosages

4.1. Matière sèche (MS)

La matière sèche est constituée par l'ensemble des substances organiques et inorganiques, en solution ou en suspension, contenues dans le substrat. La MS est déterminée par évaporation d'un échantillon de 10 ml dans une capsule en porcelaine à 105°C pendant 24 h. Elle est exprimée par rapport au poids frais. La matière sèche est déterminée aussi dans la biomasse produite par *A. niger* cultivé sur margines.

4.2. Matière volatile (MV)

Elle est exprimée en pourcentage par rapport au poids sec. Elle est déterminée en faisant la différence entre la matière sèche obtenue par évaporation à 105°C pendant 24 h et les résidus de cendres issues de la calcination à 600°C pendant 1 h.

4.3. Matière sèche en suspension et matière volatile en suspension (MES, MVS)

Ces matières en suspension sont collectées par centrifugation. Après lavage du culot à l'eau distillée, ces MES et MVS sont quantifiées de la même manière que MS et MV.

4.4. Demande biologique en oxygène (DBO₅)

La valeur de la demande biologique en oxygène en 5 jours représente la quantité en g d'oxygène nécessaire aux microorganismes mis en incubation avec l'échantillon pour oxyder les matières assimilables, organiques et minérales à 20°C et à l'obscurité. Au départ, l'échantillon à incuber doit être saturé en oxygène et dilué de telle sorte qu'après 5 j d'incubation, il y ait encore de l'oxygène dissous et détectable par l'oxymètre (YSI modèle 57).

4.5. Demande chimique en oxygène (DCO)

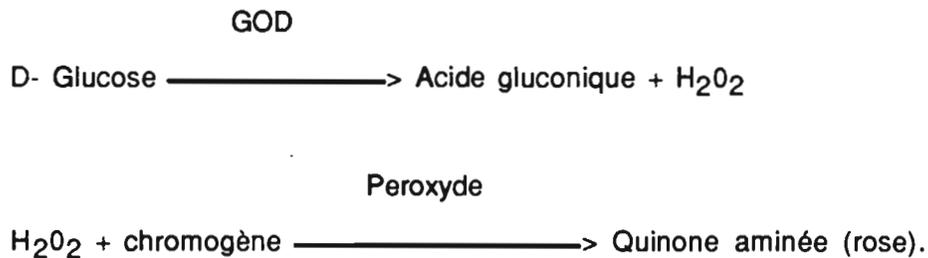
La DCO correspond à la consommation d'oxygène nécessaire à l'oxydation complète de la matière organique du substrat. Cette oxydation peut être obtenue par le dichromate de potassium en excès, d'où une méthode d'évaluation de la DCO au cours de laquelle l'excès de dichromate est dosé par le sulfate de fer et d'ammonium.

La DCO a été mesurée selon deux techniques :

- Standard methods (1975)
- la méthode économique de Knechtel (1979).

4.6. Dosage enzymatique du glucose

Il est effectué avec les réactifs Sera-Pak (laboratoire Miles). A pH 7, en présence de la glucose - oxydase (GOD), le glucose est oxydé en acide gluconique avec libération de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Ce dernier oxyde le chromogène incolore en rose, selon les réactions suivantes (Werner *et al.*, 1977):



La réaction se développe pendant 15 min à 32 °C. La coloration est lue à 505 nm. Les échantillons subissent une défécation par le ferrocyanure de potassium et l'acétate de zinc.

4.7. Dosage chimique des sucres réducteurs totaux

Le jus de fermentation déféqué et dilué, est analysé. Les sucres sont dosés selon la méthode de Somogyi (1945). La coloration développée est mesurée à 550 nm avec un spectrophotomètre Shimadzu (UV-160 A). Les concentrations en sucres sont déduites à partir d'une gamme étalon.

4.8. Détermination de l'azote minéral et de l'azote total organique

L'azote total est estimé selon la méthode de Kjeldahl. Les matières organiques sont dans une première étape, minéralisées avec de l'acide sulfurique (d = 1,82) à chaud et en présence d'un catalyseur de minéralisation (mélange de Sélénium, Merck).

La distillation du contenu du matras, après addition de 40 ml de soude, s'effectue dans un appareil Büchi modèle 320.

L'ammoniac est ensuite libéré par addition de soude (10 N) puis recueilli dans de l'acide borique (10 g/l). L'ammoniaque est alors dosée par une solution d'acide sulfurique (0,1 N). Les résultats sont exprimés en g d'azote. Le coefficient de conversion de l'azote en protéines

retenu est de 6,25. L'azote minéral est mesuré sans minéralisation.

3.5.9. Dosage des sels

Les sels contenus dans les margines ont été mesurés par spectrométrie de masse.

Les sulfates ont été déterminés par la méthode gravimétrique décrite dans Standard methods (1975).

3.5.10. Analyse du méthane

L'analyse du méthane est réalisée avec un chromatographe en phase gazeuse (Delsi Série 30), muni d'un détecteur à ionisation de flamme et d'une colonne en acier inox de 0,8 m remplie de Porapack Q (80 - 100 Mesh).

Le gaz vecteur est l'azote. Les conditions sont les suivantes:

Température :

- colonne.....200°C
- injecteur.....230°C
- détecteur.....250°C

Débits gaz :

- N₂.....28 ml/min
- air.....25 ml/min
- H₂.....30 ml/min

3.5.11. Analyse du CO₂ et de H₂

L'analyse du méthane est réalisée avec un chromatographe en phase gazeuse (Girdel série 30), muni d'un détecteur à conductibilité thermique (catharomètre) et de deux colonnes en acier inox (1,8 m x 1/8 ") remplies de carbosphère 60 - 80 Mesh). Le méthane peut également être analysé par cette technique qui demeure cependant moins sensible que la précédente.

Les conditions opératoires sont les suivantes:

Température :

- colonne.....85°C
- injecteur.....105°C
- détecteur.....150°C

Débits gaz :

- N₂.....45 ml/min

Courant-filament:.....100 mA

4.11. Acides gras volatils et alcools

Les AGV ont été dosés par CPG en ionisation de flamme, soit à l'aide d'un appareil Delsi Série 30, soit à l'aide d'un appareil PYE UNICAM.

Dans les deux cas, la méthode utilisée permet d'éviter l'extraction préalable des composés à analyser, puisque nous injectons directement le milieu contenant les produits dans la colonne du chromatographe.

Ce milieu est obtenu après élimination des solides par centrifugation à 13000 tr/min pendant 15 min, puis stabilisation à l'aide d'une solution de H₂PO₄/HgCl₂ et filtration sur Millipore 0,22 µm.

4.12. Analyse des acides phénoliques

Les acides phénoliques synthétiques sont quantifiés par spectrophotométrie UV (UV-Visible recording spectrophotometer Shimadzu). Les monomères aromatiques des margines avant et après fermentation sont déterminés par CPG (Shimadzu, gas chromatograph GC - 9A) après leur extraction par 2 ml d'acétate d'éthyle et d'acétone, à partir de 1 ml d'échantillon acidifié par 50 µl de H₂SO₄ 2N. Après extraction, l'échantillon est filtré sur un filtre Millipore de 0,22 µm et évaporé sous vide à sec. A ce résidu sec sont ajoutés 100 µl de pyridine et 50 µl de TMS (Triméthylsilil). Le mélange est agité et chauffé à 60 °C pendant 15 min. A partir de ce mélange 1 µl d'échantillon est injecté dans le chromatographe. Ce dernier est équipé d'un détecteur à ionisation de flamme et d'une colonne capillaire (SE 30 SCOT) de longueur 40 m et de diamètre 0,5 mm. Le débit du gaz vecteur (N₂) est de 60 ml/min. Les

débits d'air et d'hydrogène sont respectivement de 35 et 500 ml/min. La température de l'injecteur et du détecteur est de 300°C. Le chromatogramme des monomères phénoliques standard est donné sur la fig. 19.

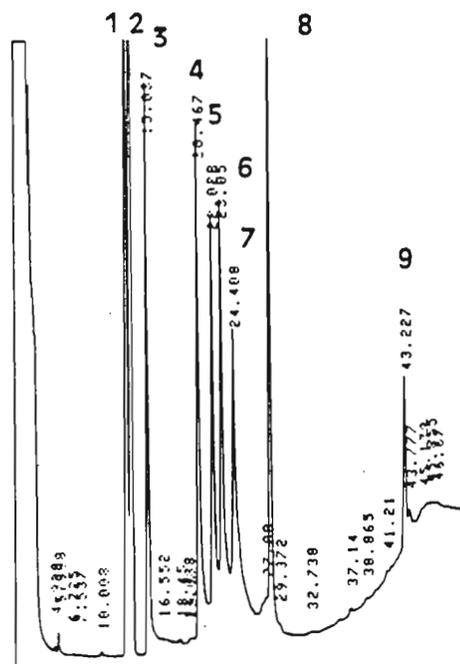


Figure 19: Chromatogramme en phase gazeuse de quelques monomères phénoliques standard.
1: Pyrogallol, 2: Tyrosol, 3: Acide p-OH-phenylacétique, 4: Acide protocatéchique, 5: Acide syringique, 6: Acide p-coumarique, 7: Acide gallique, 8: Acide caféique, 9: Epicatechine.

4.13. Analyse des polyphénols des margines

La caractérisation des composés aromatiques complexes des margines brutes et traitées durant le procédé, a été suivie par chromatographie d'exclusion sur gel de séphadex G-50. 300 ml environ de ce gel sont placés dans une colonne de 3 cm de diamètre interne et de 60 cm de hauteur. Après stabilisation et lavage à l'eau distillée, 3 ml d'échantillon sont injectés dans la colonne et sont élués par fraction de 3 ml sous un débit de 0,33 ml/min. La DO des fractions est mesurée par spectrophotométrie à 280 nm.

La calibration est réalisée par le passage d'un mélange de bleu de dextran (PM= 200000) , de ribonucléase (PM= 13 000) et d'acide syringique (PM= 198) (fig. 20). Il est à noter que les 28 premières fractions (84 ml) ne sont pas reportées sur toutes les figures donnant les profils d'éluion des différents échantillons.

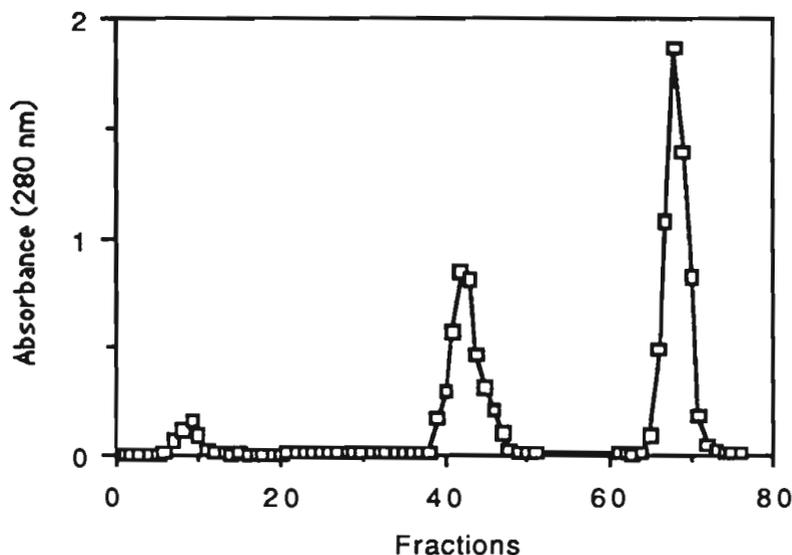


Figure 20: Profil d'élution du mélange de bleu de dextran, de ribonucléase et d'acide syringique.

4.14. Dosage des tanins

La méthode utilisée est basée sur la technique de dosage des composés phénoliques des plantes; elle a été adaptée par Balice *et al.* (1988) pour le dosage des tanins des margines.

4.16. Détermination de la biomasse

La biomasse produite par la culture d'*A. niger* sur les margines est recueillie par filtration sur un morceau de tissu de Tergal placé dans un entonnoir ou dans un système de filtration Millipore débarassé de son verre frité (Fig. 21). Ce système a été utilisé pour l'étude de la cinétique de filtration des margines avant et après filtration sous vide ou sous pression atmosphérique. L'aire de la surface filtrante est de l'ordre de $1,5 \text{ cm}^2$. La taille des mailles du tissu est située entre 100 et 200 μm (planche 4).

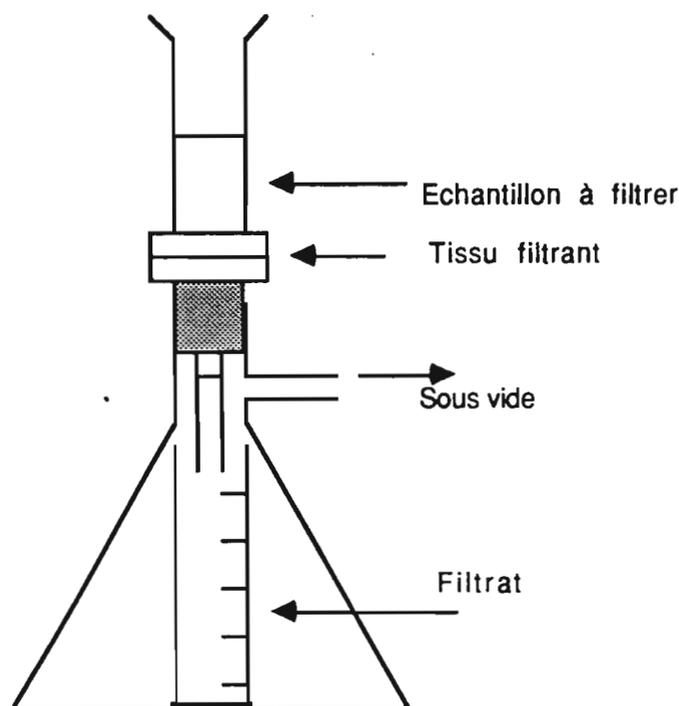
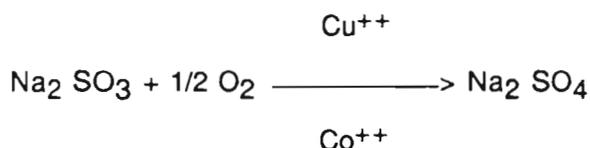


Figure 21: Schéma du dispositif de filtration.

4.17. Détermination du coefficient de transfert volumique de l'oxygène $K_L a$

La méthode utilisée est chimique; elle a été mise au point par Cooper *et al.* (1944). elle suppose que l'étape limitante est le transfert de matière en phase liquide. La concentration en oxygène dissous dans le milieu est mesurée indirectement. L'oxygène transféré oxyde en sulfate une solution de sulfite (0,2 à 1 M) présente dans le fermenteur. Cette oxydation est catalysée par des ions cuivre et cobalt:



Connaissant le débit et le temps d'injection d'air, un double dosage iodométrique des sulfites avant et après aération, permet le calcul de l'oxygène transféré.

4.18. Techniques de microscopie électronique

Le microscope électronique utilise des électrons, dits rapides, d'énergie moyenne comprise entre 10 et 100 keV. Le système optique électronique comporte des lentilles

pré-alignées permettant une concentration optimale du faisceau. L'impact des électrons sur l'échantillon à étudier provoque à partir de ce dernier, l'émission d'électrons secondaires de faible énergie qui sont focalisés sur un photomultiplicateur amplifiant le phénomène (Joels TSM-35 CF).

L'échantillon est collé sur un portoir avant d'être soumis à une métallisation à l'or. La focalisation du faisceau se fait sous l'objet pour obtenir une image en relief. L'observation se fait sur un écran. Les photographies sont réalisées grâce à un appareil conventionnel, placé à l'extérieur du microscope.

5. Plan d'expériences (De Meo et al., 1985)

L'utilisation de plans d'expériences permet de déterminer l'influence des paramètres étudiés avec un minimum d'essais. Le domaine expérimental est défini en effectuant le recensement, le classement et le choix des paramètres. La détermination des niveaux de paramètres étudiés est essentielle, car si celle-ci est correctement effectuée, le risque de conclure à l'absence d'influence d'un facteur sera réduit et l'optimum sera plus rapidement atteint. La matrice d'Hadamard par exemple, permet d'étudier simultanément les effets de k facteurs avec N expériences ($N = k + 1$) (tableau 14). L'emploi de ces matrices d'expériences est très utile pour démarrer un programme d'optimisation et pour trier parmi de nombreux facteurs, ceux qui ont un effet sur la réponse.

La matrice d'Hadamard est une matrice carrée ne contenant que des éléments égaux à + 1 ou - 1 et $N = 12$. Dans cette matrice la valeur moyenne des réponses est:

$$b_0 = \frac{Y_1 + Y_2 + \dots + Y_{12}}{12}$$

Les réponses étant des modèles polynomiaux de la forme $Y_i = b_0 + (b_i X_i)$
(X_i = valeurs des variables explicatives).

Les coefficients b_i à déterminer sont donnés par:

$$b_i = \frac{X_i' Y_i}{12}$$

X_i' étant le transposé de la matrice.

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Etude physico-chimique des margines

Plusieurs échantillons de margines d'origine et de saisons différentes ont été utilisées au cours de ce travail. Ces margines proviennent du département du Gard (87) , de Bou-Ghrara 88, des huileries de Sfax (89-90) et de la station de la ville de Sfax.

1.1. Analyse de la composition chimique

Leurs compositions organiques et minérales ont été analysées. Le tableau 15 indique les caractéristiques de certaines margines utilisées. Le pH est situé entre 5 et 6 et la DCO est très variable; la valeur moyenne se situe aux alentours de 130 à 150 g/l.

Tableau 15: Composition organique de certaines margines utilisées

| Caractéristiques | Gard | Sfax-90 | Bou-Gh-88 | Sfax-89 | Station-90 |
|--------------------------------|------|---------|-----------|---------|------------|
| pH | 5,31 | 5,9 | 5,4 | 5,62 | 5,32 |
| AGV (g/l) | 0,08 | - | - | - | - |
| TAC (g/l) | 0,55 | - | - | - | - |
| MS (g/l) | 48 | 190 | 105 | 118,6 | 123,8 |
| MES (g/l) | 7,7 | 52 | 26,5 | 23,5 | 18,4 |
| MV (g/l) | 43,2 | 58,7 | 73,8 | - | - |
| DCO (g/l) | 73,6 | 108 | 154 | 128,4 | 137 |
| DBO ₅ (g/l) | 36,4 | 38,25 | 63,5 | - | - |
| Sucres réducteurs | 7 | 37 | 16,8 | 15,4 | 40,2 |
| Glucose (g/l) | - | - | 4,7 | 1,96 | 12,8 |
| Protides (g/l) (NKT x 6,25) | 0,56 | 7,5 | 2,37 | - | - |

Le rapport DCO/DBO₅ se situe entre 2 et 4. Ce rapport est de plus en plus petit, au fur et à mesure que l'inoculum aérobie utilisé dans le test de mesure de la DBO₅ est capable de dégrader les composés phénoliques. La présence de sucres indique l'état de fraîcheur des margines. La matière sèche est formée de 90 % de matière volatile ce qui montre la nature organique des margines. La fraction protidique n'est pas importante; elle dépend de la présence des MES. Ces considérations montrent bien que cet effluent peut être traité par les voies

biologiques comme l'a signalé Fiestas Ros de Ursinos (1981).

Malgré la variabilité de la composition des margines, certaines caractéristiques peuvent être corrélées (fig. 22-a). Ces corrélations ont été obtenues en se basant sur le dosage de plusieurs margines prélevées à partir des camions citernes arrivant à la station d'épuration de Sfax. Elles sont peu différentes de certaines margines italiennes (Balice *et al.*, 1982) comme le montre la fig. 22-b.

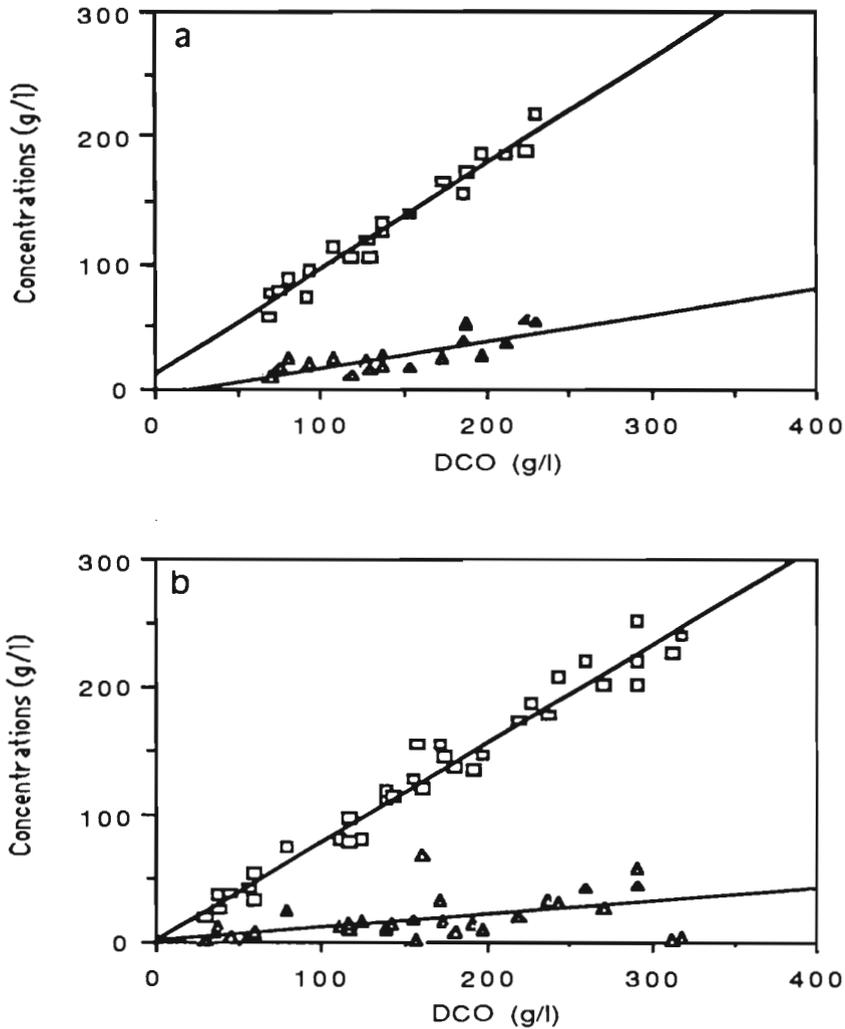


Figure 22: Corrélations entre DCO et MS (\square) ou MES (Δ) pour les margines tunisiennes (a) et italiennes (b).

En ce qui concerne la composition minérale, tous les sels dosés ont été détectés (tableau 16). Les sels les plus abondants sont le potassium et le sodium.

Tableau 16: Composition minérale de certaines margines utilisées.

| Sels | Gard-87 | Sfax 86 | Sfax 87 | Bou-Ghrara-88 | Sfax 89 |
|-------------------------------------|---------|---------|---------|---------------|---------|
| Ca (mg/l) | 180 | 169 | 162 | - | 155 |
| Mg (mg/l) | 84 | 83 | 73,6 | - | 77 |
| Na (mg/l) | 130 | 412 | 400 | - | 391 |
| K (mg/l) | 2600 | 966 | 882 | - | 927 |
| Fe (mg/l) | - | 27,2 | 17,2 | - | - |
| Zn (mg/l) | - | 7,16 | - | 4,88 | - |
| Mn (mg/l) | - | 0,23 | - | 0,205 | - |
| Cu (mg/l) | - | 0,9 | 0,65 | - | - |
| NO ₃ ⁻ (mg/l) | 38 | - | - | - | - |
| N-NH ₄ ⁺ | 30 | - | - | 77 | - |

1.2. Séparation des matières en suspension des margines

L'élimination des MES des margines est réalisée ou non selon l'objectif et les étapes du procédé de dépollution à mettre au point. Ces MES sont différentes selon que l'élimination est réalisée par centrifugation ou par filtration.

1.2.1. La centrifugation

En dépollution, la centrifugation est rarement utilisée pour les séparations liquide-solide à cause de son coût élevé et de son fonctionnement discontinu.

Les études préliminaires de centrifugation des margines ont montré qu'elles sont constituées de deux classes de MES qui décanent à des niveaux de vitesses de rotation différentes:

- à des vitesses de rotation inférieures à 2000 tr/min, le culot est formé essentiellement de particules grossières correspondant aux pulpes d'olives;
- au-delà de 4000 tr/min, le culot est formé de pulpes d'olives et d'une sorte de pâte très collante et compacte qui correspond essentiellement à des mucilages et des gommés déjà identifiés dans les margines (Fiestas Ros de Ursinos, 1981). Le surnageant obtenu est moins visqueux que les margines brutes et les margines filtrées (tableau 24).

L'analyse bibliographique des procédés déjà utilisés pour le traitement des margines a montré que la centrifugation a été seulement utilisée pour la récupération des

levures obtenues par fermentation (Fiestas Ros de Ursinos, 1981).

1.2.2. La filtration

Contrairement à la centrifugation, la filtration et l'ultrafiltration sont souvent utilisées pour l'élimination des MES des margines. Cependant, par suite de l'absence de données bibliographiques concernant la filtration des margines, nous avons étudié la cinétique de filtration de cet effluent pour déterminer les problèmes susceptibles d'être rencontrés lors de cette opération. A priori, la filtration de cet effluent peut être essentiellement contrariée par deux obstacles:

- La viscosité élevée par la présence de pectines et de mucilages;
- La concentration élevée en MES et en MS qui colmatent les membranes de filtration.

Les cinétiques de filtration de plusieurs sortes de margines à travers un tissu de Tergal (100 - 200 μm) sous pression atmosphérique, ont été différentes comme le montre la fig. 23.

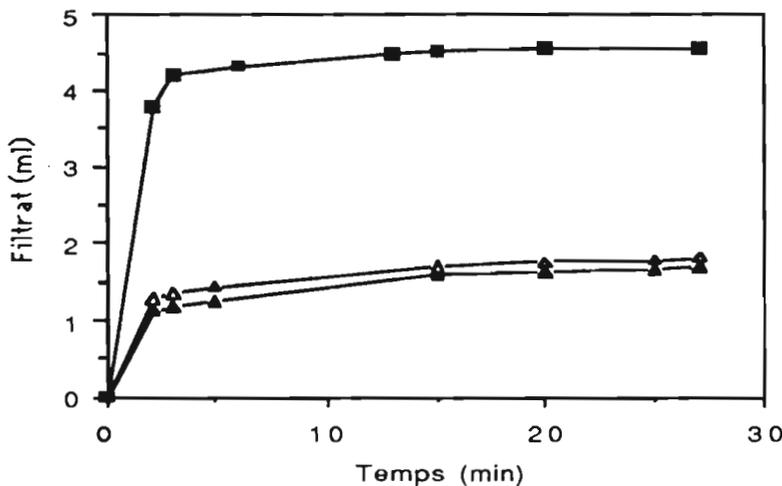


Figure 23: Filtration sous-pression atmosphérique des margines (▲), des margines stérilisées (Δ) et des margines centrifugées (■).

La stérilisation a légèrement amélioré la cinétique de filtration, probablement par un changement de la texture des pulpes d'olives en suspension. L'élimination des MES et des mucilages par centrifugation à 4000 tr/min a rendu très rapide la filtration des margines et la totalité du liquide est récupérée. Ceci montre bien que la filtration des margines brutes est

surtout limitée par la nature compacte du gâteau formé par les MES et les mucilages (Planche 2).

La filtration sous vide a l'avantage de récupérer le maximum de liquide en moins de temps et obtenir ainsi un gâteau moins humide. Cependant, cette amélioration a été réduite dans les deux cycles de filtrations suivants (fig. 24). En effet, si dans le premier cycle le filtrat a été obtenu en 8 min, dans le troisième cycle, il a fallu plus d'une heure pour que la totalité du liquide soit récupérée.

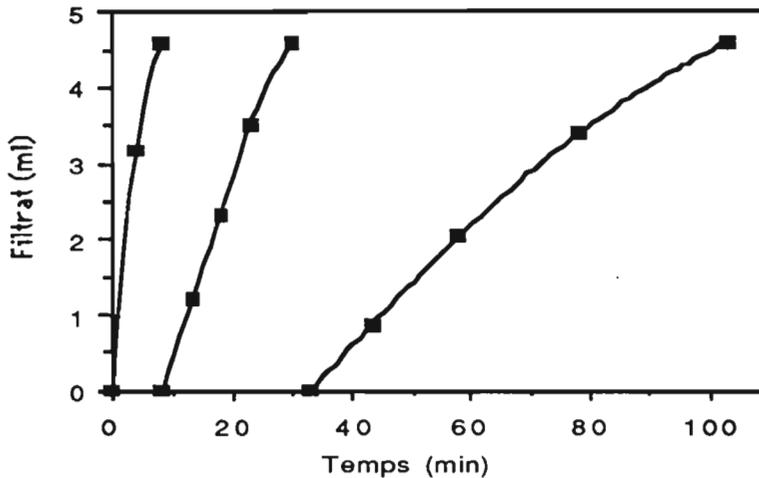


Figure 24: Filtration des margines avec application du vide en trois cycles.

1.3. Analyse des composés phénoliques des margines

ces composés phénoliques sont essentiellement contenus dans la fraction soluble. Tous les spectres des margines sont les mêmes et font apparaître des pics aux alentours de 260 nm comme le montre la fig. 25; ils correspondent aux composés phénoliques et sont de plus en plus nets lorsque les margines sont plutôt rouge foncé que noires.

L'analyse des composés phénoliques simples à partir de différents échantillons de margines, par CPG (fig. 37) a montré que les margines contiennent pratiquement les mêmes composés phénoliques simples mais à des concentrations variables suivant la maturité des olives et la conservation des margines. Les acides phénoliques simples sont présents à des concentrations plus élevées que les alcools phénoliques simples.

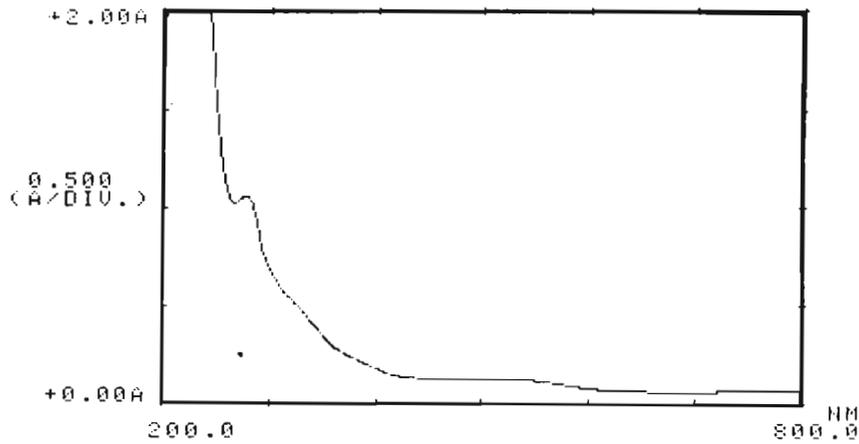


figure 25: Spectre des margines

Le profil d'éluion des margines analysées par chromatographie sur gel de séphadex G-50 a montré qu'elles sont formées essentiellement de deux groupes de polyphénols (fig. 26; planche 3):

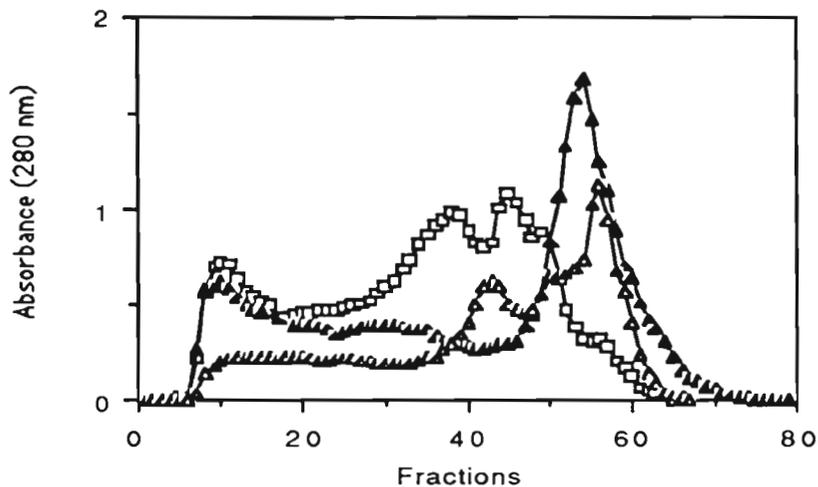


Figure 26: Profil d'éluion des margines sur colonne séphadex G-50.

(□), Sfax-89; (Δ), Station-90; (▲), Huilerie-90.

- Le premier groupe comprend des composés dont le poids moléculaire est inférieur à 20000; ils sont responsables de la couleur rouge violette. Ces composés correspondent aux anthocyanes et aux tanins identifiés dans les margines (Tanchev *et al.*, 1980; Balice *et al.*, 1988). En effet, l'abaissement du pH transforme la couleur des margines du noir au rouge foncé, comparable à celle des anthocyanes des vins décrite par Monties en 1980. Ce groupe contient également une classe de composés responsables d'une coloration jaune masquée par la coloration rouge.

- Le second groupe est formé de composés phénoliques dont le poids moléculaire est supérieur à 20000 et qui sont responsables de la coloration noire. En effet, l'addition d'un acide fort comme l'acide sulfurique ou l'acide phosphorique aux environs de 5 %, provoque la précipitation partielle de ces composés du second groupe au bout de quelques heures et les margines noires deviennent rouge foncé (Planche 3). Le profil d'éluion des margines confirme bien l'élimination de ce groupe responsable de la coloration noire (Fig. 27).

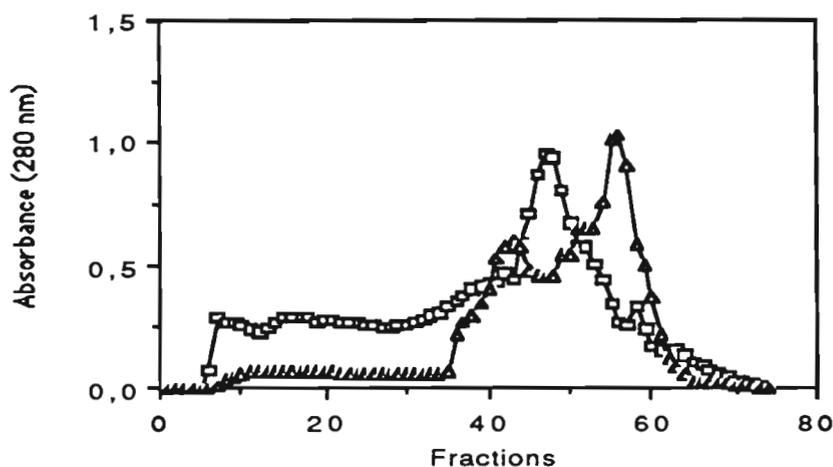


Figure 27: Profil d'éluion des margines acidifiées sur colonne séphadex G-50.

(□), Sfax-89; (Δ), Station-90.

La couleur des margines qui varie du rouge violet foncé au noir foncé est sous la dominance d'un groupe de composés phénoliques par rapport à l'autre. Cette coloration dépend de la variété et de la maturité des olives ainsi que de l'état de fraîcheur des margines. En effet, il a été constaté que durant le stockage des margines, leur coloration devient de plus en plus noire. Ceci peut s'expliquer par l'oxydation des polyphénols du premier groupe qui se polymérisent comme pour les polyphénols du vin (Monties, 1980).

1.4. Conclusions

Les margines renferment donc deux fractions, l'une en suspension essentiellement formée de la pulpe d'olives et l'autre soluble contenant les sucres, les lipides, les acides organiques et les composés phénoliques. L'élimination des matières en suspension par filtration n'est pas facile, le gâteau formé par les pulpes d'olives n'étant pas perméable.

La difficulté de traitement des margines est essentiellement due à la présence de deux groupes de composés phénoliques. Le premier groupe est formé de composés phénoliques responsables de la coloration rouge foncé des margines; leur poids moléculaire est inférieur à

20000. Ils correspondent aux tanins, anthocyanes, oligomères et monomères phénoliques. Ces composés sont connus pour leur effet très toxique pour les microorganismes. Le second groupe est formé de polymères phénoliques responsables de la coloration noire des margines; leur poids moléculaire est supérieur à 20000 et peut dépasser les 200000. Ce groupe de composés semble constituer une forme de la lignine (pseudolignine) et des produits d'oxydation des composés du premier groupe.

2. Etude de la biodégradabilité et de la toxicité des margines

Cette étude est basée sur la production de méthane en batch à partir de plusieurs formes de margines à différentes concentrations par rapport au contrôle. L'effet toxique est mis en évidence par la diminution de la production de méthane avec l'augmentation de la concentration du substrat. Par contre, l'augmentation de la production de méthane avec la concentration du substrat s'explique par une réduction de la toxicité. En ce qui concerne la biodégradabilité, elle est d'autant plus importante que la production de méthane est grande par rapport au contrôle.

2.1. Méthanisation des margines brutes en batch

2.1.1. Effet de la soude et de la chaux sur la digestion anaérobie des margines

Dans le but de choisir entre la soude ou la chaux pour ajuster le pH des margines à la neutralité pour un bon développement des bactéries méthanogènes, nous avons réalisé trois batchs anaérobies dans des bouteilles de 500 ml; le méthane produit a été collecté après barbotage du biogaz dans une bouteille d'eau distillée à 1,5 % de potasse.

Le flacon de contrôle a été rempli avec 300 ml d'inoculum et 100 ml d'eau distillée, les deux autres flacons ont été remplis avec 300 ml d'inoculum et 100 ml de margines (Gard) à 18,2 g/l de DCO chacun. Dans un des flacons, le pH a été ajusté à la soude et dans l'autre avec de la chaux.

Pour amorcer l'activité méthanogène de l'inoculum formé d'un mélange de lisier de porcs et de boues de digesteur urbain, avec des concentrations respectives en MVS de 17,5 et 14,7 g/l, nous avons ajouté de l'urée à 0,5 g/l et un mélange d'acétate, formate et méthanol (2 : 2 : 1) à 10 mM. Les résultats obtenus sont reportés dans la fig. 28 : C'est l'utilisation de la chaux qui a donné le plus de méthane.

En effet, ceci peut s'expliquer par le fait que la chaux :

- augmente l'alcalinité du milieu par la formation de carbonate de calcium;
- précipite les acides gras à longue chaîne des margines, essentiellement l'acide oléique (Roy *et al.*, 1985) qui est très toxique pour la méthanogénèse (Koster et Cramer, 1980);
- peut précipiter ou flocculer certains composés phénoliques des margines, ce qui limite leur contact avec les bactéries méthanogènes (Tschocke, 1989).

En outre, les ions calcium sont moins toxiques pour la méthanisation que ceux du sodium. Dans la suite de toutes nos expériences, nous avons utilisé la chaux pour ramener le pH des margines à la neutralité.

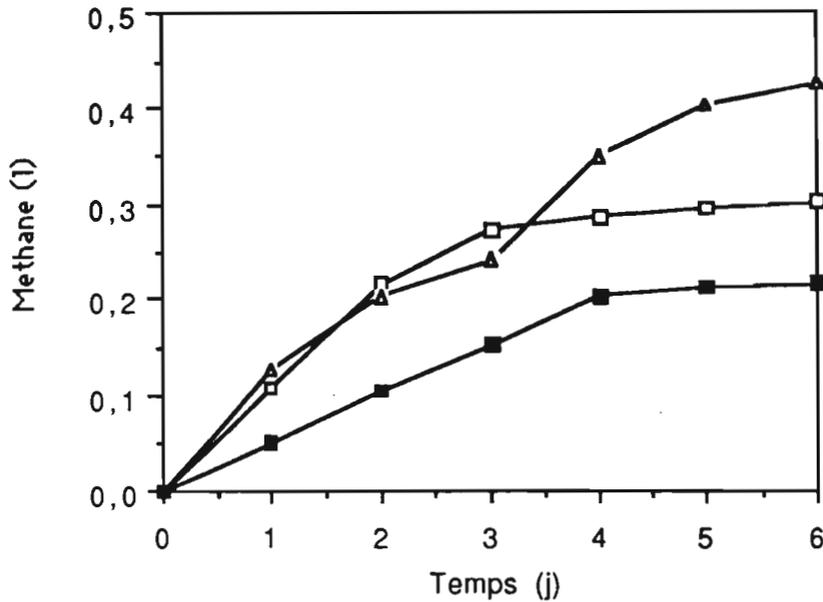


Figure 28: Effet de la soude (□) et de la chaux (Δ) sur la digestion anaérobie des margines.
(■): Contrôle.

2.1.2. Batches anaérobies avec les différentes fractions des margines

Afin d'étudier l'effet toxique des margines sur les populations méthanogènes, nous avons utilisé la boue anaérobie provenant du digesteur urbain de la ville d'Aix en Provence. Cette boue a été concentrée en anaérobiose par sédimentation à 59,2 g/l de MS et 44,2 g/l de MV. Un nombre important de flacons sérum de 60 ml ont été inoculés sous azote avec 10 ml de cette boue dégazée, avec 0,2 ml de $\text{Na}_2\text{S} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (25 % P/V), puis obturés à l'aide de bouchons de butyl noir sertis. Ces flacons ont été conservés à 4°C jusqu'au moment de leur utilisation pour laquelle 10 ml de substrat ont été ajoutés.

Dans le but de trouver un prétraitement physique pour l'amélioration de la digestion anaérobie des margines, trois formes de margines ont été étudiées : la margine brute, les MES et le surnageant séparés par centrifugation. Les caractéristiques des substrats sont rapportées dans le tableau 17.

Tableau 17: Composition chimique des margines Bou-Ghrara, de leur culot et de leur surnageant de centrifugation.

| Caractéristiques (g/l) | Margine | Culot | Surnageant |
|------------------------|---------|-------|------------|
| DCO | 157 | 105 | 128,4 |
| Sucres réducteurs | 16,7 | 2,7 | 17,2 |
| Glucose | 7 | 0,89 | 7,5 |
| Huile | 3,6 | - | 3,9 |
| Protéines | 2,15 | 3,8 | 1,3 |
| Tanins condensés | 2,3 | 1,8 | 0,94 |
| Tanins hydrolysables | 7 | 3,8 | 7,8 |
| Monomères flavoïques | 1,5 | 0,57 | 1,6 |
| Monomères phénoliques | 6,4 | 2,84 | 7,1 |

Ces substrats ont été ajoutés dans les flacons précédemment préparés selon des concentrations croissantes. La production de méthane par ces trois substrats est rapportée dans la fig. 29.

Ces résultats montrent que:

- L'augmentation de la concentration en margines provoque une diminution de la production de méthane. La margine brute et la fraction soluble sont plus toxiques que la fraction solide (culot de centrifugation).

- La cinétique de production du méthane est plus rapide dans le cas des margines brutes et de la fraction soluble aux faibles dilutions. Ceci peut s'expliquer par le fait que les substrats facilement fermentescibles sont solubles. Dans la fraction solide, la production de méthane provient des composés qui forment la pulpe d'olives et qui sont essentiellement des substrats lignocellulosiques et pectiques; ceci explique la faible vitesse de production de méthane.

- A plus faible concentration en l'absence d'inhibition (5 g/l de DCO), la production de méthane à partir des margines brutes s'effectue en deux phases: la première correspond à la fermentation de composés facilement fermentescibles contenus dans le surnageant, la deuxième correspondant à la minéralisation des composés contenus dans la fraction solide ou des composés phénoliques complexes comme les tanins.

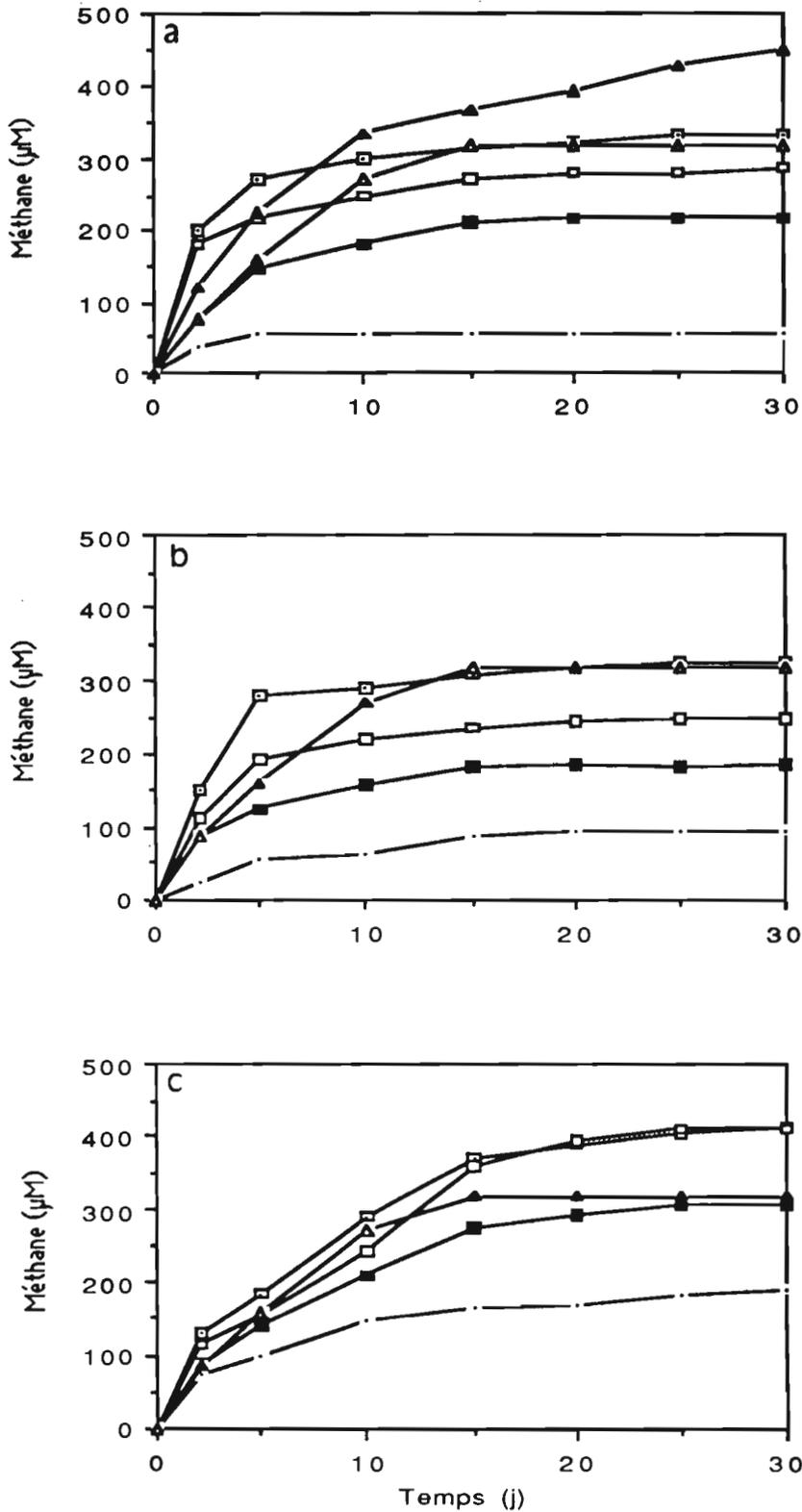


Figure 29: Cinétique de production du méthane par les margines Bou-Ghrara (a), leur surnageant (b) et leur culot de centrifugation (c) à différentes concentrations en DCO.

(Δ): Contrôle, (▲): 5 g/l, (◻): 20 g/l, (◻): 40 g/l, (■): 60 g/l, (·): 80 g/l.

Le suivi de l'évolution des AGV et de la DCO durant la digestion anaérobie des margines brutes à 20 g/l a montré que :

- Les margines ne peuvent être méthanisées que lorsqu'elles sont très diluées.
- Malgré l'accumulation d'AGV (fig. 30) et en particulier d'acétate qui explique l'activité importante de la phase acidogène, la production de méthane n'est pas supérieure à celle du témoin. Ceci montre que les margines sont plus ou moins biodégradables mais néanmoins toxiques.
- La transformation des substrats des margines en AGV ne s'accompagne pas d'une nette diminution de la DCO. Ceci nous a incités à méthaniser ces margines riches en AGV (voir paragraphe suivant).

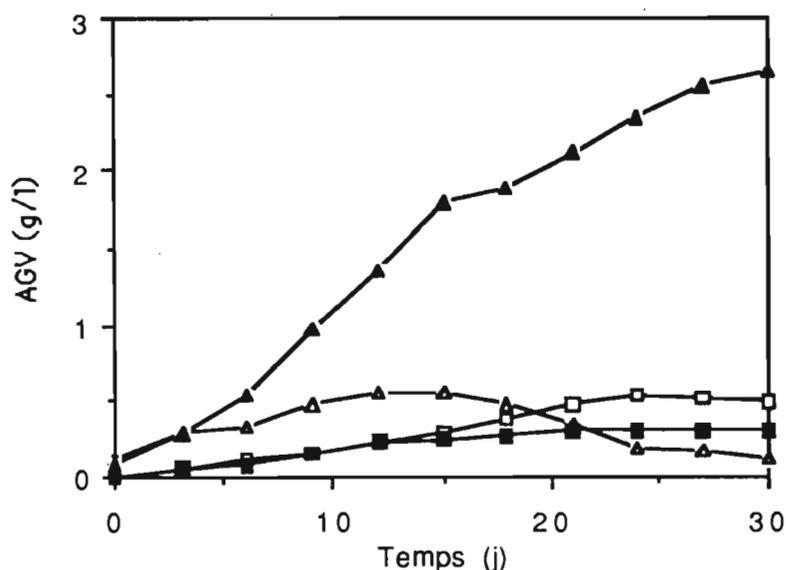


Figure 30 : cinétique d'accumulation de l'éthanol (Δ), de l'acétate (\blacktriangle), du propionate (\square) et du butyrate (\blacksquare), durant la fermentation des margines brutes.

2.2. Batches anaérobies avec des margines préfermentées

Compte tenu des expériences précédentes qui ont démontré que le fractionnement des margines en culot et en surnageant de centrifugation ne résolvait pas le problème de toxicité et de biodégradabilité des margines, nous avons opté pour la recherche d'un prétraitement biologique susceptible d'améliorer la méthanisation des margines sans le recours à des facteurs de dilution très importants.

2.2.1. La biométhanisation des margines préfermentées par acidogénèse ou par *A. niger*

Deux types de fermentations ont été étudiées dans le but de comparer les procédés susceptibles d'améliorer le plus la méthanisation des margines : un procédé anaérobie et un procédé aérobie.

- L'acidogénèse anaérobie a été réalisée avec des margines brutes à une concentration de 80 g/l . Cette expérience correspond aux margines méthanisées décrites dans le paragraphe 2.1.2. L'effet toxique des margines vis à vis des bactéries méthanogènes entraîne une transformation de la méthanisation en une acidogénèse. Les AGV produits lors de cet étape peuvent être métabolisés par l'étape suivante de méthanisation. Après élimination de la boue par sédimentation, le surnageant a pu être méthanisé. Cette sédimentation a entraîné l'élimination de certains composés phénoliques des margines.

- La fermentation aérobie des margines a été réalisée par *A. niger* souche A 10 (Rimbault et Alazard, 1980). Les margines additionnées de sulfate d'ammonium (3 g/l) et de nitrate d'ammonium (5 g/l) ont été inoculées à l'aide d'une suspension de 10^8 spores/ml à raison de 2 ml/50 ml de margines dans une erlenmeyer de 1 l. Ces erlenmeyers ont été incubés sur une table d'agitation à 35°C pendant 72 h. Après récupération du mycélium par filtration, le filtrat a été méthanisé.

Les caractéristiques de ces 2 substrats sont rapportées dans le tableau 18.

Tableau 18: Composition chimique des margines Bou-Ghrara préfermentées.

| Caractéristiques (g/l) | par <i>A. niger</i> | en batch anaérobie acidogène |
|------------------------|---------------------|------------------------------|
| DCO | 63,7 | 64,3 |
| Sucres réducteurs | 2,1 | 6,7 |
| Glucose | 0,7 | 0 |
| Huile | traces | 3,6 |
| Protéines (N x 6,25) | 3,1 | - |
| AGV | - | 13,2 |
| Phénols totaux | 7,71 | 5,8 |

La méthanisation de ces deux substrats a été réalisée après leur ajustement à pH 7,5 par de la chaux éteinte. Ces margines préfermentées ont été méthanisées à l'aide d'un

inoculum plus au moins acclimaté sur margines. Cet inoculum a été réparti dans des flacons sérum de 120 ml avec 28,3 de MS et 21,7 g/l de MV. Les margines acidifiées ont été tamponnées avec du carbonate de sodium à raison de 0,5 équivalent mole de Na_2CO_3 / g de DCO. Le pH a été ensuite ajusté par de la chaux à 7,25. Ces flacons ont été complétés avec 20 ml d'inoculum et 20 ml de substrat sous azote.

Les résultats obtenus sont reportés dans la fig. 31. Le résultat du batch de contrôle n'est pas rapporté par ce que la boue a été très stabilisée et le méthane produit est négligeable.

Ces résultats montrent que :

* Les margines préfermentées en anaérobiose sont moins toxiques que les margines brutes. En effet, 20 g/l de DCO de ces margines préfermentées donnent plus de méthane que 10 g/l, contrairement à ce qu'on observe avec les margines brutes pour lesquelles 10 g/l de DCO donnent plus de méthane que 20 g/l. Cependant, il faut noter que les margines très diluées donnent des rendements (mM de méthane/ g de DCO introduite) plus élevés que les margines préfermentées en anaérobiose .

* Dans le cas des margines préfermentées par *A. niger*, les productions de méthane pour toutes les concentrations en DCO ont été supérieures à celles obtenues avec les margines préfermentées en anaérobiose; l'augmentation de la concentration en DCO n'affecte pas la formation de méthane. En outre, les rendements en méthane (mM de méthane / g de DCO dégradé) sont presque deux fois plus élevés que ceux obtenus avec les margines brutes ou acidifiées.

A. niger, en plus de l'élimination de certains composés inhibiteurs de la méthanogénèse, a contribué à l'hydrolyse de certains polymères comme les tanins hydrolysables qui ont été réduits de 7 g/l à 1,35 g/l . La production de méthanol à partir des pectines peut contribuer au développement des bactéries méthanogènes acétoclastes dont le rôle est prépondérant pour l'élimination de l'acétate. L'accumulation rapide d'acétate dans le cas des margines préfermentées par *A. niger* peut expliquer la bonne cinétique de formation du méthane et confirme bien l'amélioration de la biodégradabilité des margines par ce type de fermentation.

L'emploi des bactéries aérobies n'a pas été envisagé pour la réalisation de ce prétraitement, compte tenu des données suivantes:

- Les bactéries (boues activées) ne peuvent être efficaces pour le traitement des margines que lorsque ces dernières sont diluées de l'ordre de 70 fois (Balice *et al.*, 1988).
- Les bactéries préexistantes dans les margines ne peuvent se multiplier qu'après développement du mycélium du champignon. Ceci montre qu'*A. niger* a éliminé certains composés toxiques pour les bactéries aérobies.

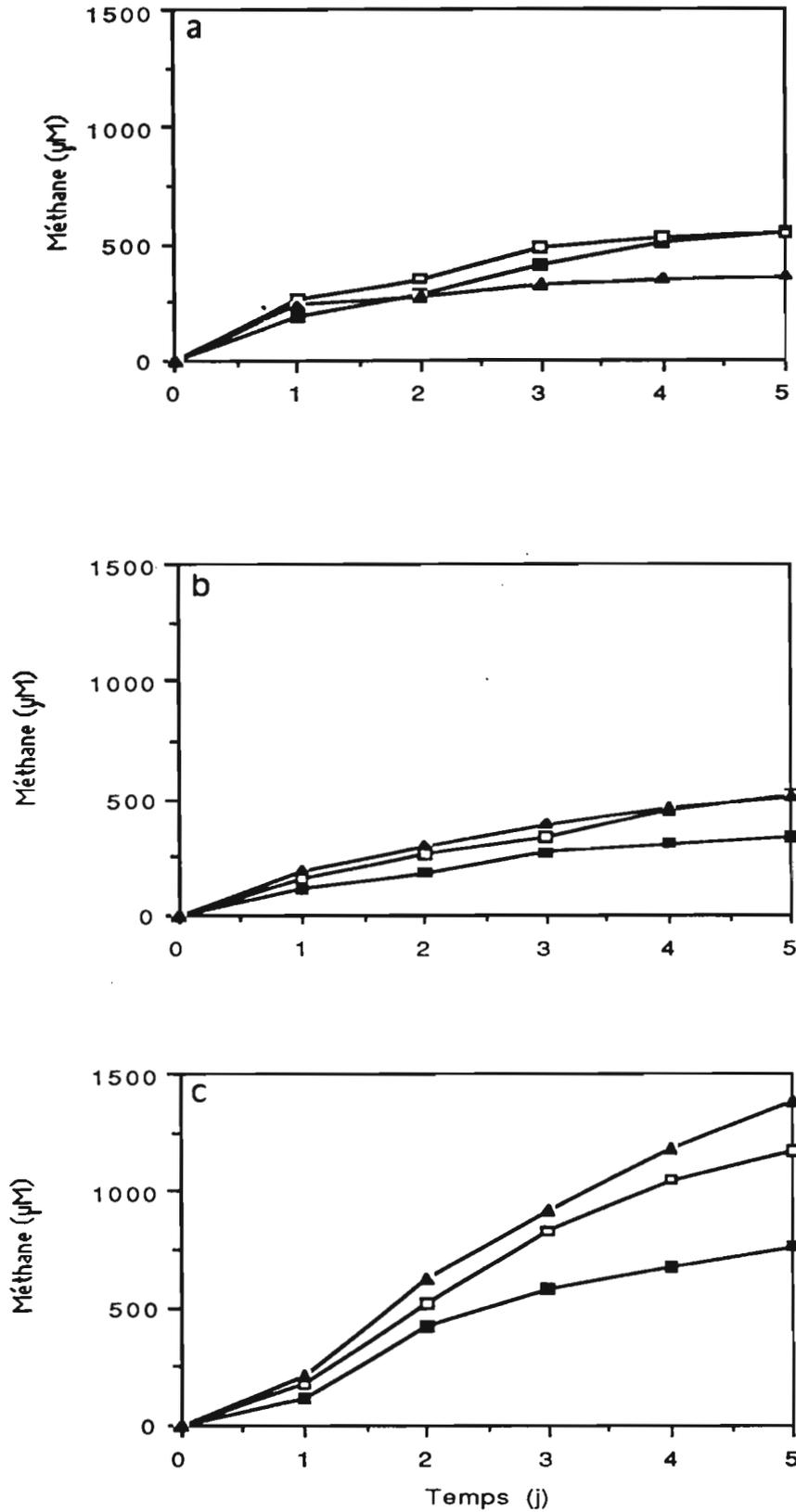


Figure 31: Cinétique de production du méthane à partir des margines Bou-Ghrara brutes (a) préfermentées en acidogénèse (b) ou par *A. niger* (c) à différentes concentrations en DCO.

(\blacksquare): 10 g/l, (\square): 20 g/l, (\blacktriangle): 30 g/l.

La fermentation des margines par *A.niger* qui élimine certains composés toxiques pour la méthanisation et produit des substrats facilement biodégradables et du méthanol qui stimule les bactéries méthanogènes, est plus efficace que la fermentation anaérobie qui ne réalise qu'une fermentation des sucres simples. Après avoir trouvé une amélioration de la méthanisation des margines par leur prétraitement par *A. niger*, nous avons également étudié l'effet sur la méthanisation des margines:

- de l'agitation
- de l'inoculation par des bactéries isolées de termites, connues par leur capacité à dégrader les composés aromatiques des margines.

2.2.2. Effet de l'agitation sur la méthanisation des margines

Ces expériences ont surtout un intérêt pour le choix du procédé et les conditions opératoires à appliquer pour le traitement des margines. L'effet de l'agitation a été étudié dans des flacons sérum de 120 ml contenant 20 ml d'inoculum à 28,3 de MS et 21,7 g/l de MV et 20 ml de margines à 20 g/l de DCO; le pH a été ajusté à 7,25 par de la chaux. Deux types de margines ont été utilisées: les margines brutes et les margines préfermentées par *A. niger*. Les niveaux d'agitation ont été obtenus par variation de la vitesse de la table d'agitation.

Les cinétiques de production du méthane en fonction de l'agitation à partir des deux formes de margines sont reportées dans la fig. 32.

L'agitation affecte d'avantage la formation du méthane avec les margines brutes qu'avec les margines préfermentées par *A. niger*. Si dans ce dernier cas, l'agitation améliore la production de méthane, par contre dans le cas des margines brutes, l'augmentation de la vitesse d'agitation diminue la cinétique de production du méthane. Au delà de 50 tr/min, l'effet de l'agitation est négligeable dans les deux cas. Le résultat de l'analyse des métabolites est reporté dans la fig. 33.

Ces résultats confirment bien ceux obtenus dans les paragraphes 2.1.2. et 2.2.1. En effet, l'acétate s'accumule sans être utilisé dans le cas des margines brutes, alors qu'il est rapidement consommé dans le cas des margines fermentées par *A. niger*. Cependant, la production de méthane et la consommation des AGV sont plus rapides que lors des expériences du paragraphe 2.1.2. Ceci peut essentiellement s'expliquer par le fait que l'inoculum utilisé dans ces dernières expériences a déjà été acclimaté sur margines. Ceci montre bien l'intérêt de l'acclimatation des inoculums pour la dégradation des composés aromatiques comme l'ont signalé Healy et Young (1978).

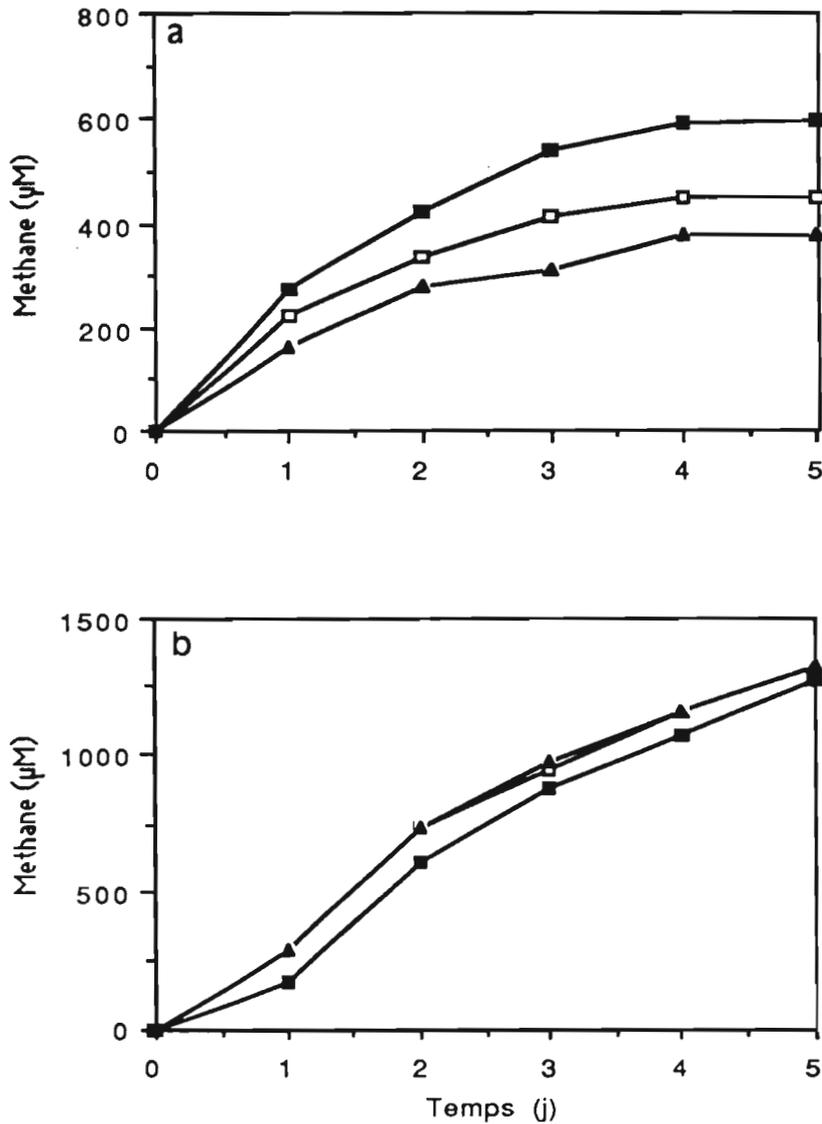


Figure 32: Cinétique de production de méthane à partir des margines brutes (a) et des margines fermentées par *A. niger* (b) à différentes agitations.

(■), 0 tr/min; (□), 50 tr/min; (▲), 200 tr/min.

L'effet de l'accroissement de la vitesse d'agitation sur l'augmentation de la cinétique de production d'acétate est très net dans le cas des margines brutes. Ceci peut s'expliquer de la façon suivante:

- d'une part par le fait que l'agitation améliore le transfert de matière qui favorise le développement des bactéries fermentatives à croissance rapide;
- d'autre part parce que l'agitation augmente l'inhibition des bactéries méthanogènes et provoque l'accumulation d'acétate.

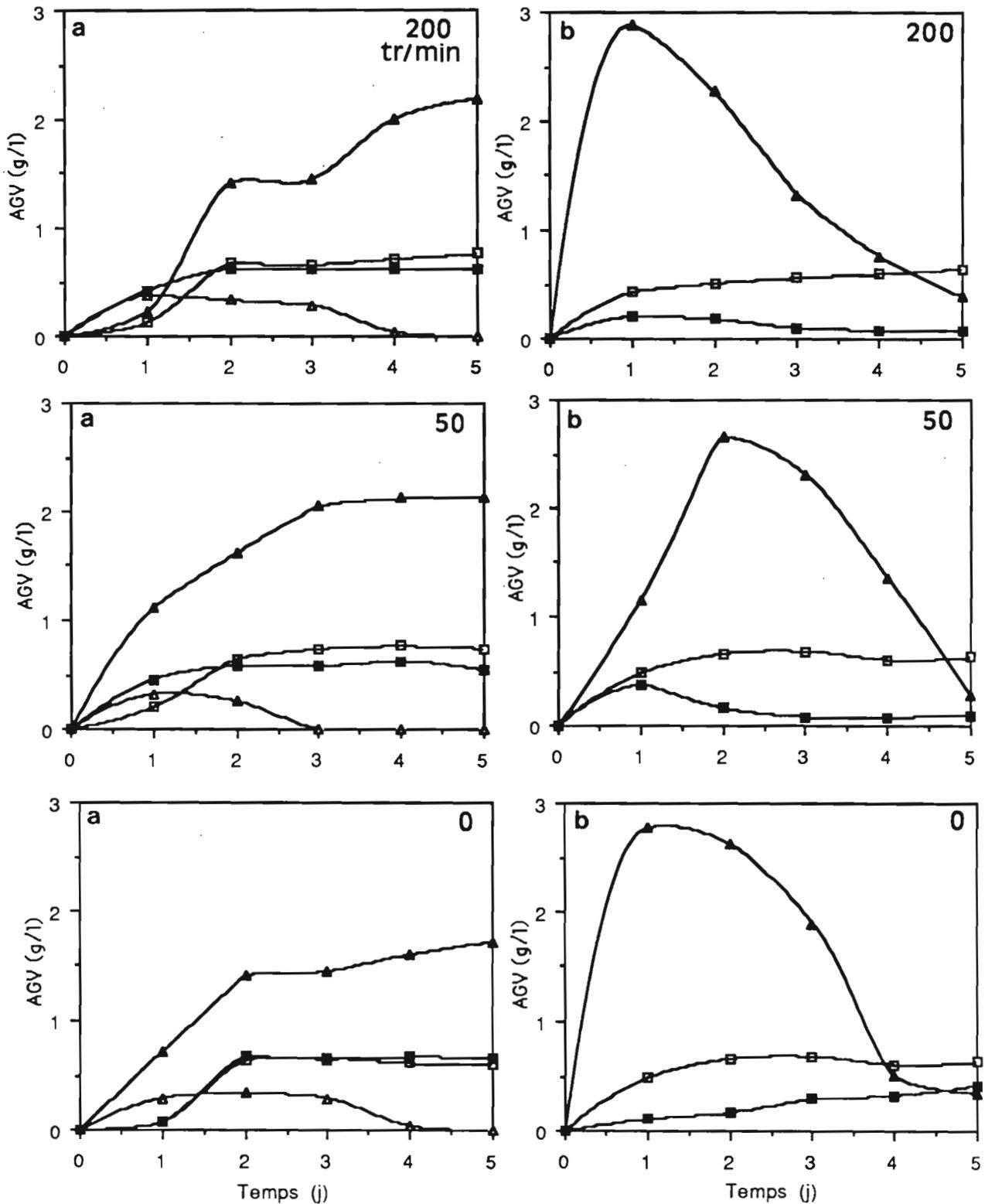


Figure 33: Formation d'éthanol (Δ), d'acétate (\blacktriangle), de propionate (\square) et de butyrate (\blacksquare) à partir des margines brutes (a) et des margines fermentées par *A. niger* (b) à différentes agitations.

L'augmentation de l'inhibition des bactéries méthanogènes par l'agitation en présence de composés toxiques comme les composés phénoliques et les huiles, peut s'expliquer par le fait que l'agitation:

- met en suspension les composés phénoliques qui ont tendance à précipiter en présence de certains composés protidiques et minéraux;
- met en suspension les huiles qui forment un voile à la surface du liquide;
- rompt les biofilms et les granules formés qui sont susceptibles de mieux résister aux composés toxiques que les cellules libres;
- améliore la cinétique d'acidification par rapport à la méthanisation, ce qui rompt l'équilibre et accentue l'inhibition des bactéries méthanogènes aussi bien par les acides que par les composés phénoliques.

Ces résultats concernant l'agitation peuvent expliquer certaines constatations déjà citées dans la littérature et aboutir à de nouvelles stratégies de choix de procédé pour le traitement des margines. En effet :

- il a été déjà mentionné par Boari *et al.* (1984) que les performances du procédé contact anaérobie sont très dépendantes de la vitesse d'agitation;
- l'agitation qui améliore la cinétique de production des AGV, peut être exploitée dans l'étape d'acidogénèse dans un procédé avec séparation de phases. Les margines acidifiées se sont en effet avérées moins toxiques que les margines brutes;
- les réacteurs à lit fixé où la turbulence est limitée (Hall, 1982; Switzenbaum, 1983) et les boues fixées semblent les mieux adaptés pour la biométhanisation des margines (Rozzi *et al.*, 1989);
- en ce qui concerne la méthanisation des margines fermentées par *A. niger*, la production de méthane est légèrement améliorée par l'agitation. Pour cela, nous avons comparé les procédés du filtre anaérobie et contact anaérobie dans le but de choisir le digesteur le mieux adapté (cf Chapitre 4).

2.2.3. Effet de l'addition d'un consortium bactérien isolé du tractus de termites sur la méthanisation des margines Bou-Ghrara.

Les travaux de Brauman (1989) ont montré que les bactéries ou les consortiums isolés à partir du tractus digestif de termites humivores, sont capables de dégrader certains composés aromatiques, en particulier l'acide p-hydroxybenzoïque et l'acide syringique. Or, les margines contiennent beaucoup d'acides phénoliques dont l'acide syringique qui est le plus abondant (Balice et Cera, 1984). Ces acides phénoliques contribuent à l'inhibition des bactéries méthanogènes et rendent difficile la méthanisation de ces margines (Andreoni *et al.*,

1986). Ces considérations nous ont donc amenés à étudier l'effet de l'addition d'un consortium sur la méthanisation des margines.

Les expériences ont été réalisées dans les mêmes conditions que celle décrites dans le paragraphe 2.1.2. Le volume de l'inoculum est le même dans toutes les expériences et l'addition du consortium (2 ml) se fait au dépens de l'eau distillée dégazée utilisée pour diluer les margines.

Dans un premier temps, nous avons comparé l'effet de l'addition du consortium sur la méthanisation des margines brutes et des margines fermentées par *A. niger*. La fig. 34 montre que l'amélioration de la méthanisation des margines brutes n'est pas nette. Cependant, la formation de méthane à partir des margines préfermentées a été améliorée d'environ 50 %. Ceci peut s'expliquer par le fait que le prétraitement a éliminé des composés toxiques aussi bien pour les bactéries méthanogènes que pour les bactéries du consortium.

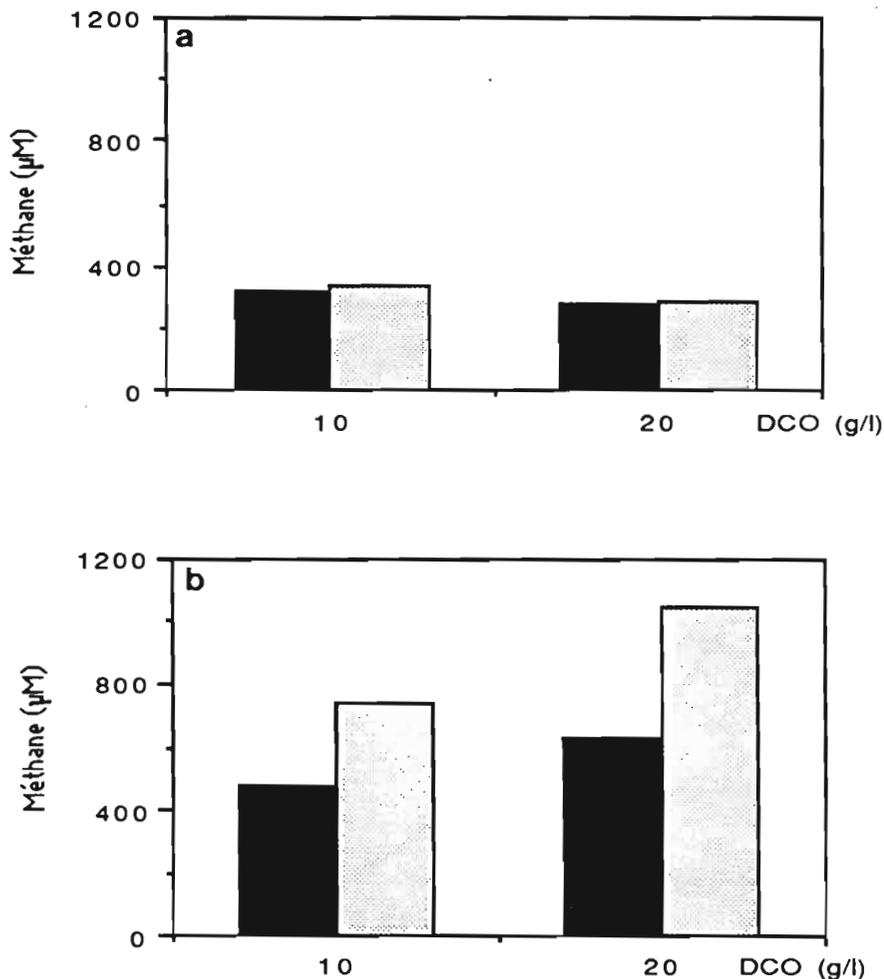


Figure 34: Production de méthane à partir des margines brutes (a) et des margines fermentées par *A. niger* (b) à différentes concentrations en DCO en l'absence (■) et en présence du consortium (▨).

Dans un second temps, nous avons étudié avec plus de détail la méthanisation des margines préfermentées par *A. niger*, avec une charge de 20 g/l de DCO, en présence et en absence du consortium.

La production de méthane confirme les expériences précédentes et montre une amélioration de près de 50 %. Les cinétiques de production de méthane et de consommation d'acétate (fig. 35) ont été plus rapides dans le cas de cultures inoculées avec le consortium. Ceci peut s'expliquer par le fait que les bactéries du consortium ont :

- amélioré l'étape acétogène par l'utilisation de certains composés que l'inoculum seul n'était pas capable de dégrader;
- amélioré la cinétique d'utilisation de l'acétate après dégradation de certains composés, essentiellement phénoliques, qui limitaient l'activité des bactéries méthanogènes.

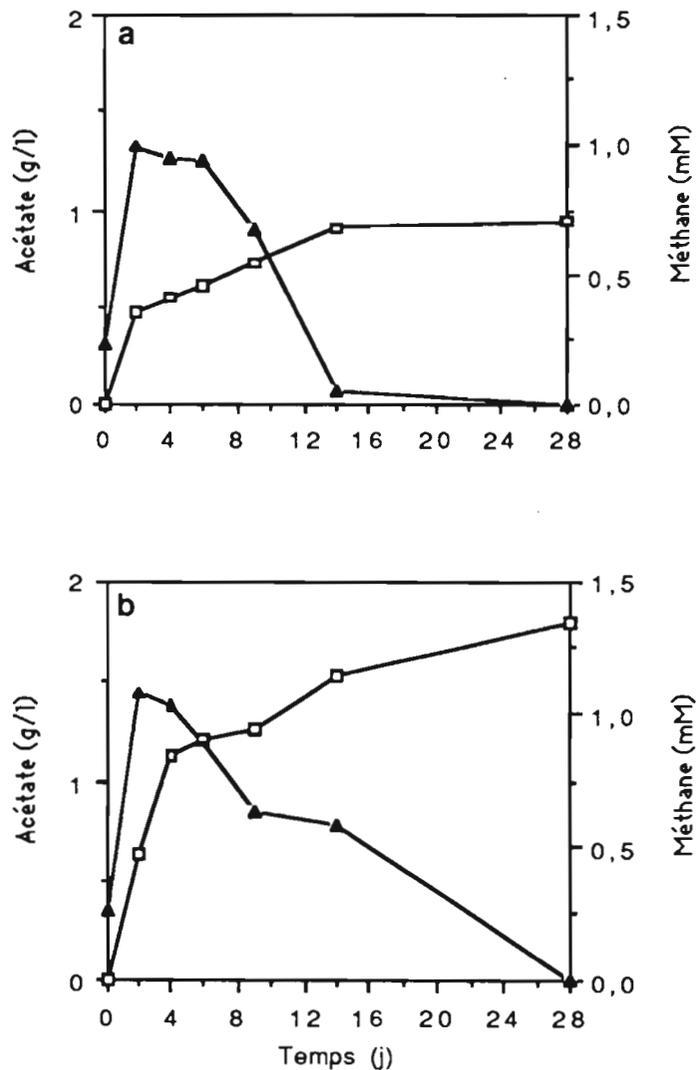


Figure 35: production d'acétate (▲) et du méthane (□) à partir des margines fermentées par *A. niger* en absence (a) et en présence du consortium (b).

Si dans le cas des cultures sans le consortium, l'acétate n'est détecté que sous forme de traces après le 15^{ème} jour d'incubation, par contre, dans le cas des cultures avec le consortium, l'acétate est reformé à partir du 10^{ème} jour. Ceci démontre qu'un second groupe de produits a été transformé par le consortium en acétate, substrat directement utilisable par les bactéries méthanogènes.

Ces résultats montrent bien l'importance de l'acclimatation de l'inoculum et la possibilité d'un dopage par des bactéries performantes pour améliorer sa capacité dégradative de composés récalcitrants.

2.3. Conclusion

Les margines brutes ne peuvent être méthanisées qu'après leur dilution. Nous avons en effet, constaté que lors des essais de méthanisation des margines brutes, certains composés essentiellement de type polyphénols, s'accumulaient et inhibaient l'inoculum.

Le prétraitement des margines par *A. niger* est donc une alternative pour diminuer la toxicité des margines et augmenter les rendements en méthane. En outre, cette fermentation aérobie peut produire une biomasse plus ou moins riche en protéines. Nous allons donc étudier ce prétraitement en détail pour pouvoir le réaliser dans les meilleures conditions et voir quel groupe de composés phénoliques est dégradé par *A. niger*, en diminuant ainsi l'inhibition de la méthanogénèse et en augmentant la biodégradabilité des margines.

3. Prétraitement aérobie des margines

La réalisation de cette étape de prétraitement des margines par *A. niger* nécessite :

- le choix d'une souche capable de dégrader le plus grand nombre de composés inhibiteurs de la méthanisation, avec une bonne réduction de la DCO et de bons rendements en biomasse;
- l'optimisation de la croissance d'*A. niger* sur margines;
- la conception d'un réacteur qui est à la fois adapté aux margines et à la croissance d'*A. niger*.

3.1. Screening et sélection d'une souche d'*A. niger*

La souche à sélectionner doit réaliser un prétraitement efficace dans des conditions faciles et économiques. Pour cela, nous avons pris en considération la sporulation, la croissance sur margines et la dégradation des composés phénoliques.

3.1.1. Screening des souches d'*A. niger*

Cette recherche a été basée sur l'étude de la croissance des différentes souches d'*A. niger* sur des margines complémentées avec 8 g/l de sulfate d'ammonium et 18 g/l de gélose et stérilisées à 120°C pendant 20 min, puis réparties dans des boîtes de Pétri. Ces boîtes ont été inoculées par 0,1 ml d'une suspension de 10^7 spores/ml environ de chaque champignon à tester. Chaque souche a été cultivée sur 5 boîtes pour vérifier la reproductibilité des résultats.

Après incubation de 3 à 6 j, nous avons regardé l'état de la sporulation et la couleur des boîtes. Toutes les spores ont été collectées après une semaine d'incubation, avec 50 ml d'eau distillée stérile par boîte à 0,01 % de tween 80.

La densité de sporulation est déterminée en divisant le nombre total de spores récupérées dans les 50 ml, par la surface de la boîte (spores/cm²). La transformation de la couleur de la margine gélosée du noir au brun clair est un signe de dégradation ou d'hydrolyse de certains pigments des margines.

Sur la cinquantaine de souches testées, Seules celles qui ont bien sporulé et qui ont modifié la couleur des margines gélosées du noir au brun, sont reportées dans le tableau 19.

Les meilleures densités obtenues ont été de l'ordre de 10^8 spores/cm² en 5 jours avec les souches E7, E9, F11, F25, F37, F38, F52, M1, M2, M6 et MB. Les champignons dont la sporulation a été rapide sont E9, F38, M1, M2 et V12. La cinétique et la densité de sporulation sont des paramètres importants pour la production de spores. L'intérêt de l'étude

de la sporulation réside dans le fait que les margines à traiter sontensemencées par des spores. Par exemple, l'inoculation d'un litre de margines de 200 g/l de DCO à raison de 10^7 spores par g de DCO nécessite aux alentours de 10 cm^2 de culture en surface pendant cinq jours.

Tableau 19: Cinétique et densité de sporulation de plusieurs souches d'*A. niger* étudiées.

| N° souche | Origine | Cinétique | Densité (Spores/cm ²) | Brunissement |
|-----------|----------------------|-----------|-----------------------------------|--------------|
| A10 | ORSTOM | 6-7 j | $5.6 \cdot 10^7$ | + |
| C23 | ORSTOM | 7-8 j | $2.2 \cdot 10^7$ | + |
| C28 | ORSTOM | 6-7 j | $1.7 \cdot 10^7$ | + |
| E1 | Huiles | 7-8 j | $8.9 \cdot 10^7$ | - |
| E5 | Farine | 5-6 j | $7 \cdot 10^7$ | - |
| E7 | Sol | 6-7 j | $1.1 \cdot 10^8$ | - |
| E9 | Sable | 6-7 j | $1 \cdot 10^8$ | - |
| F11 | UTC-France | 6-7 j | $1.32 \cdot 10^8$ | + |
| F25 | Inst-Pasteur (Paris) | 6-7 j | $1.4 \cdot 10^8$ | + |
| F37 | Margine | 7-8 j | $1.22 \cdot 10^8$ | + |
| F38 | Margine | 5-6 j | $1.14 \cdot 10^8$ | + |
| F52 | Soja | 6-7 j | $5.6 \cdot 10^7$ | + |
| M1 | Grignons | 5-6 j | $3.5 \cdot 10^7$ | + |
| M2 | Margine | 5-6 j | $1.5 \cdot 10^8$ | + |
| M3 | Grignons | 7-8 j | $5.2 \cdot 10^8$ | - |
| M6 | Grignons | 6-7 j | $1.7 \cdot 10^8$ | + |
| MB | Margine | 6-7 j | $7.8 \cdot 10^7$ | + |
| V12 | ORSTOM | 5-6 j | $3 \cdot 10^7$ | - |

3.1.2. Sélection d'une souche d'*A. niger* adaptée à la croissance sur margines

Afin de réaliser une seconde sélection, toutes les souches précédemment retenues ont été cultivées sur 100 ml de margines à 172,4 g/l de DCO complétées avec 10 g/l de sulfate d'ammonium, en erlen de 1 l. Les cultures ont été mises en incubation pendant 72 h à 35°C sur une table d'agitation. Le poids sec (mycélium et pulpes d'olives) et les protéines formées ont été déterminés à partir de 20 ml de culture filtrée sur un tissu de Tergal. L'abattement de la DCO a été calculé à partir des margines brutes et des margines fermentées et

filtrées. Les résultats obtenus pour les différentes souches sont reportés dans le tableau 20. Ils ont surtout une valeur comparative et peuvent varier d'une marge à l'autre suivant leur état de fraîcheur (concentration en sucres) et la concentration en pulpes d'olives en suspension. Le mycélium produit donne un gâteau très facilement filtrable, dont le pourcentage en protéines peut atteindre 30 %.

Tableau 20: Biomasse, pourcentage en protéines et abattement de DCO obtenus après la fermentation des margines par différentes souches d'*A. niger*.

| Souche | Biomasse (g/l) | Protéines (%) | Δ DCO (%) |
|--------|----------------|---------------|------------------|
| A10 | 55.1 | 21.2 | 57.4 |
| C23 | 57.7 | 19.3 | 42.2 |
| C28 | 56.7 | - | 37.8 |
| E7 | 43.8 | 20.9 | 53.1 |
| E9 | 54.8 | 18.4 | 52.8 |
| F11 | 57.4 | 19.5 | 58.1 |
| F25 | 48.2 | 19.3 | 51.4 |
| F38 | 57.5 | 22.2 | 58.7 |
| MB | 52.6 | 20.1 | 57.7 |
| V12 | 59.6 | 13.8 | 46.3 |

Les souches qui ont donné les meilleures performances sur margines en milieu liquide, ont été testées sur quelques acides phénoliques identifiés dans les margines (Balice et Cera, 1984; Cichelli et Solinas, 1984). Les absorbances résiduelles des différents acides phénoliques incubés séparément en présence des souches d'*A. niger*, sont reportées sur la fig. 36.

La souche F38 qui a été isolée sur margines semble la meilleure; elle est capable de dégrader tous les acides phénoliques testés. Les souches F11, V12, et C23 sont également intéressantes.

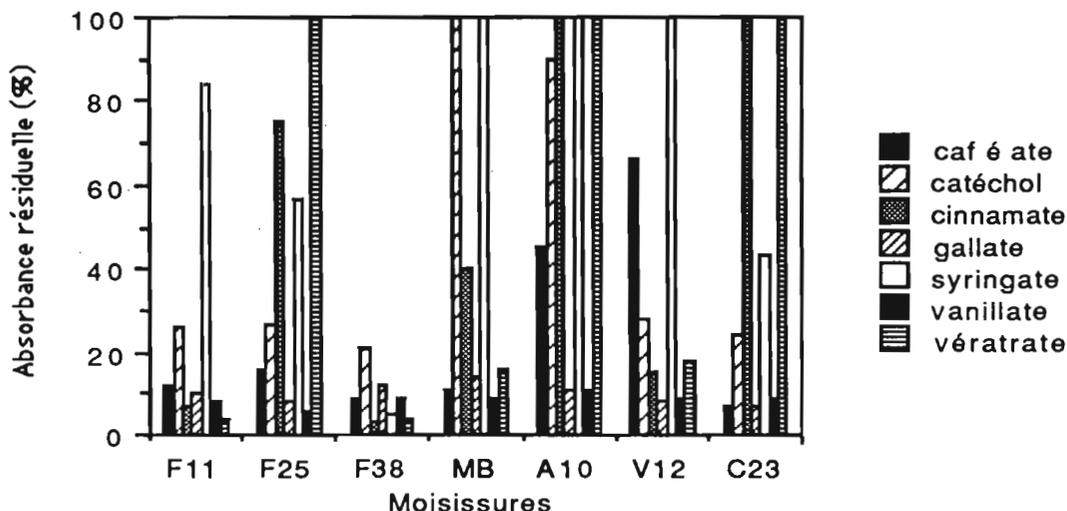


Figure 36: Absorbance résiduelle des acides phénoliques après leur incubation en présence des souches d'*A. niger*.

Les chromatogrammes des monomères phénoliques obtenus par CPG avant et après fermentation des margines par la souche d'*A. niger* F38, montrent la disparition de plusieurs composés ainsi que l'apparition d'autres produits (fig. 37) provenant de la bioconversion de certains monomères déjà existants dans les margines, et (ou) de l'hydrolyse de certains polymères. En outre, la chitine des parois d'*A. niger* connue par ses capacités à fixer les composés phénoliques (Seng, 1988), peut contribuer à leur élimination des margines.

La souche d'*A. niger* F38 qui a été isolée des margines semble être plus intéressante que les autres souches pour ce prétraitement. Toutefois, il est à remarquer que cette souche particulière a été retenue pour des raisons pratiques mais que d'autres souches testées auraient également pu être utilisées comme F11 et A10 et *P. chrysosporium*. En effet, lors d'une étude préliminaire, nous avons constaté que *P. chrysosporium* est plus apte à décolorer les margines que la souche F38. Perez *et al.* (1987) ont également montré qu'une culture de 35 j de *P. chrysosporium* décolorait les margines avec production de nombreux composés phénoliques. Cependant, ce basidiomycète présente des difficultés à sporuler et à germer sur margines. En outre, *P. chrysosporium* qui est très difficile à cultiver n'a pas encore été utilisé à une échelle industrielle.

3.2. Optimisation de la fermentation des margines par *A. niger*

Afin d'optimiser cette fermentation, la recherche des facteurs influençant la croissance d'*A. niger* F38 s'est révélée indispensable.

3.2.1. Sélection des facteurs influençant la bioconversion des margines par *A. niger*

Durant ces expériences, les margines ont été stérilisées pour favoriser le seul développement du champignon. Pour évaluer l'effet de différents sels susceptibles d'être ajoutés pour améliorer la croissance du champignon sur margines, une étude basée sur le plan expérimental de type matrice d'Hadamard a été réalisée (tableau 14). Les résultats des 12 expériences correspondantes sont rapportés dans le tableau 21.

La comparaison des différents coefficients calculés et correspondant aux différents sels, est rapportée dans le tableau 22. Six facteurs au moins ont une influence positive simultanée sur la production de biomasse et de protéines et sur l'élimination de la DCO.

Tableau 21: Résultats expérimentaux issus du plan expérimental matriciel

| Expérience N° | Biomasse (g/l) | Protéines (g/l) | Δ DCO (%) |
|---------------|----------------|-----------------|------------------|
| 1 | 17 | 2,1 | 23,6 |
| 2 | 18,4 | 4,4 | 42,4 |
| 3 | 6,1 | 1,8 | 18,4 |
| 4 | 13,1 | 3,8 | 24,6 |
| 5 | 48,4 | 14,3 | 63,7 |
| 6 | 8,1 | 1,3 | 16,9 |
| 7 | 27,4 | 9,3 | 65,7 |
| 8 | 36,4 | 7,5 | 47,9 |
| 9 | 14,1 | 5,2 | 42,2 |
| 10 | 19,2 | 4,8 | 60,5 |
| 11 | 17 | 2,6 | 22,3 |
| 12 | 2,7 | 0,9 | 16,9 |

Tableau 22: Coefficients indiquant l'effet des paramètres du milieu sur la production de biomasse, de protéines et sur l'abattement de la DCO.

| N° Facteur | Niveau | | Coefficients calculés pour la réponse en | | | |
|------------|---|-------|--|-----------|----------|--------|
| | - | + | Biomasse | Protéines | ΔDCO (%) | |
| 1 | KH ₂ PO ₄ (g/l) | 0 | 2 | 0,675 | -0,083 | -0,408 |
| 2 | Extrait de levures (g/l) | 0 | 2 | 0,708 | -0,2 | 3,108 |
| 3 | Urée (g/l) | 0 | 2 | 1,54 | 0,683 | 4,491 |
| 4 | MgCl ₂ (g/l) | 0 | 1 | -5,57 | -2,1 | -9,375 |
| 5 | Inoculum (spores/g DCO) 10 ⁵ | | 10 ⁷ | 4,55 | 1,25 | 3,291 |
| 6 | NaCl (g/l) | 0 | 2 | 3,40 | 0,4 | -1,6 |
| 7 | CaCl ₂ (g/l) | 0 | 1 | -4,17 | -0,533 | -2,058 |
| 8 | NO ₃ NH ₄ (g/l) | 0 | 4 | 6,10 | 2,083 | 9,708 |
| 9 | DCO (g/l) | 89,25 | 178,5 | 3,858 | 0,95 | -0,825 |
| 10 | K ₂ SO ₄ (g/l) | 0 | 2 | 4,39 | 1,633 | 11,40 |
| 11 | MES (g/l) | 2,8 | 19,4 | 11,17 | 2,833 | 19,20 |

La source d'azote, la teneur en sulfates, la concentration en DCO des margines, leur teneur en MES et la taille de l'inoculum sont des paramètres importants pour la croissance d'*A. niger* sur margines. Cependant, l'ajout de certains sels comme le sodium, le potassium, le magnésium et le phosphore ou l'extrait de levures n'est pas indispensable pour la croissance du champignon.

Ces facteurs importants ont été étudiés séparément pour déterminer l'optimum de la croissance du champignon sur margines.

3.2.2. Optimisation des facteurs influençant la bioconversion des margines par *A. niger*

3.2.2.1. Influence de la taille de l'inoculum

La fig. 38 illustre l'effet du nombre de spores sur la croissance d'*A. niger* F38; les meilleurs cinétiques ont été obtenues avec des inoculums de l'ordre de 10⁷ spores/g DCO. A 10⁹ spores/ g de DCO, la croissance est plus rapide au départ mais s'arrête aussitôt; les

pelotes formées sont plus nombreuses mais plus petites. En effet, d'après le modèle approximatif de Smith et Greenshields (1974), la formation d'une pelote correspond à un ensemencement de $3 \cdot 10^3$ spores. La taille de l'inoculum contrôle ainsi la croissance du champignon en modifiant la morphologie du mycélium et le transfert d'oxygène.

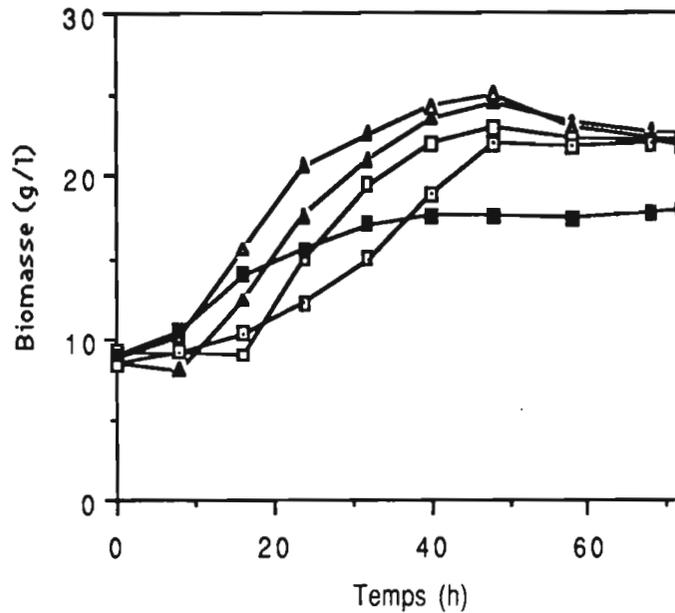


Figure 38 : Influence du nombre de spores sur la croissance d'*A. niger* sur margines.
(□): $5 \cdot 10^4$, (□): $5 \cdot 10^5$, (Δ): $5 \cdot 10^6$, (▲): $5 \cdot 10^7$, (■): $5 \cdot 10^9$.

3.2.2.2. Effet de la concentration de sulfate et d'azote

Ces expériences ont été réalisées avec des margines contenant 67 g/l de DCO à des concentrations croissantes de sulfate d'ammonium: 1,25; 2,5; 5 et 7,5 g/l correspondant respectivement aux expériences A, B, C et D (fig. 39).

La biomasse produite et la DCO éliminée augmentent lorsque la concentration en sulfate d'ammonium augmente. Le sulfate d'ammonium peut être considéré comme source d'azote (1 g de sulfate d'ammonium / 9 g de DCO). Cependant, Les dosages d'azote minéral et de sulfates ont montré qu'après fermentation (expériences A, B, C et D), les sulfates restent en excès. Dans l'expérience D où l'azote n'est pas limitant, les sulfates résiduels sont de l'ordre de 5 g/l.

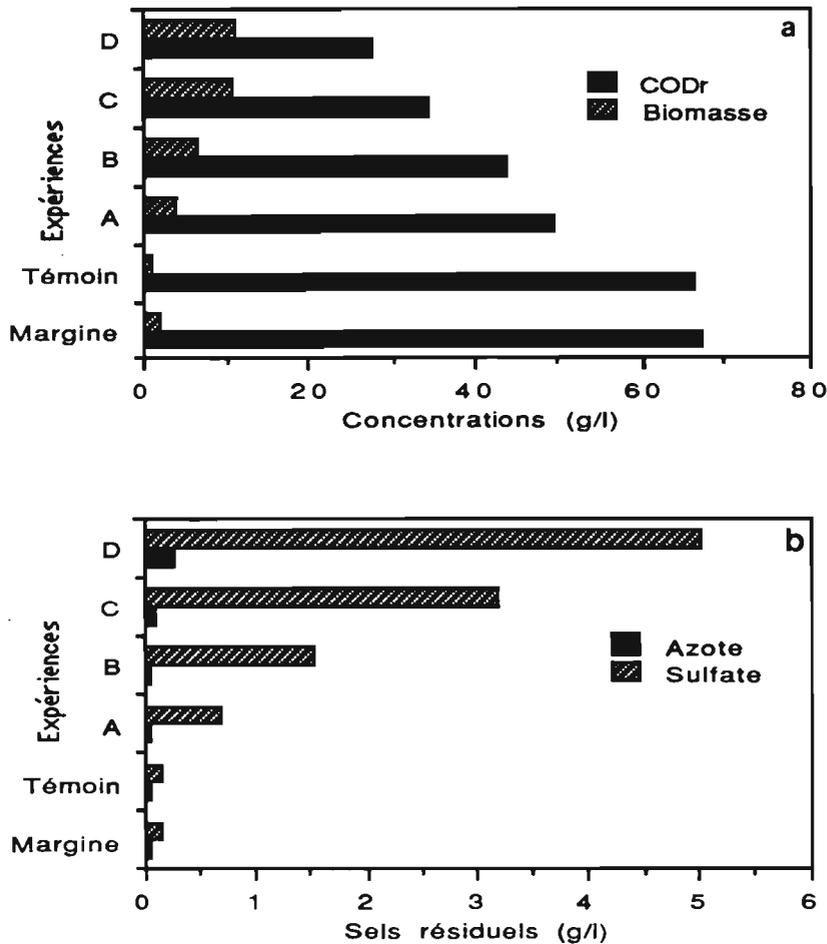


Figure 39: Effet de la concentration en azote et sulfate sur la production de biomasse, l'abattement de la DCO (a) et les sels résiduels (b).

Ce résultat montre que la concentration en sulfates résiduels est supérieure à celle de l'azote et l'optimum de croissance intervient pour un rapport DCO éliminé: N: SO_4^{2-} égal à 100 : 3 : 1,5. Le rapport DCO/N qui semble être inférieur à la normale, peut s'expliquer par le fait qu'une bonne fraction de la DCO est simplement modifiée ou fixée sur le mycélium sans être transformée en biomasse.

3.3.2.3. Effet de la nature de la source d'azote

Pour éviter l'excès en sulfate qui favorise la production d' H_2S au dépens du méthane dans l'étape ultérieure de méthanisation, d'autres formes de source d'azote ont été testées. Nous avons choisi de mélanger du sulfate d'ammonium et de l'urée ou du sulfate d'ammonium et du nitrate d'ammonium pour réaliser notre comparaison:

- sulfate d'ammonium à 10 g/l
- ou 2 g/l de sulfate d'ammonium et 5,7 g/l de nitrate d'ammonium
- ou 2 g/l de sulfate d'ammonium et de 3,6 g/l d'urée.

Les résultats obtenus montrent que l'abatement de la DCO et la quantité de biomasse produite sont pratiquement identiques avec du sulfate d'ammonium ou un mélange de sulfate et de nitrate (fig. 40). Ce mélange a donc été retenu pour la suite de nos expériences.

Le mycelium obtenu avec cette combinaison entre sulfate d'ammonium et nitrate d'ammonium se présente sous la forme de pelotes plus fragiles que celles obtenues avec le sulfate d'ammonium seul. En effet, Joung et Blaskovitz (1984) ont observé que le nitrate d'ammonium favorisait la ramification d'*A. niger*.

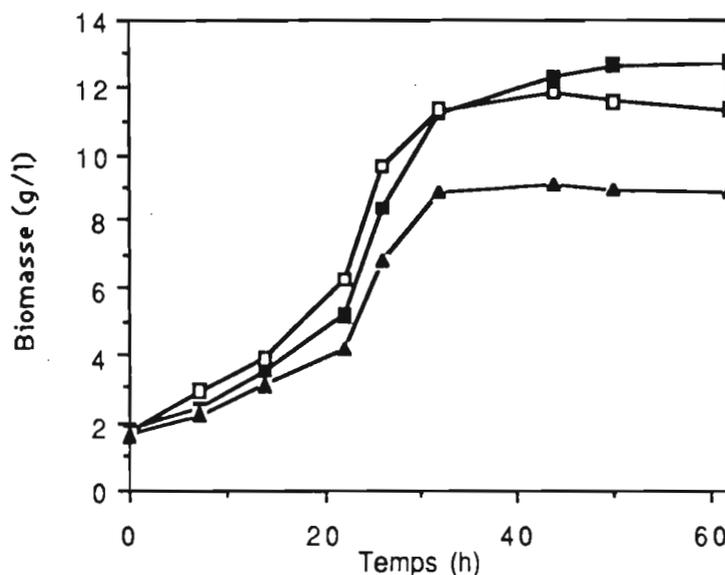


Figure 40 : Influence de la nature de la source d'azote sur la croissance d'*A. niger* sur margines. (■) : Sulfate d'ammonium, (□) : Sulfate d'ammonium + Nitrate d'ammonium, (▲) : Sulfate d'ammonium + Urée.

3.3.2.4. Effet de la concentration des margines

Nous avons effectué une étude de la croissance d'*A. niger* sur des margines à 167 g/l, 109 g/l et 63 g/l de DCO. Les résultats obtenus (fig. 41) montrent que l'augmentation de la DCO n'inhibe pas la croissance de ce champignon.

La variation de la concentration de DCO modifie la cinétique de croissance et les rendements en biomasse. Lorsque la DCO augmente, le champignon croît plus vite mais l'arrêt de la croissance est plus précoce. A faible concentration en DCO, les pelotes sont moins nombreuses mais plus rigides qu'à forte concentration en DCO.

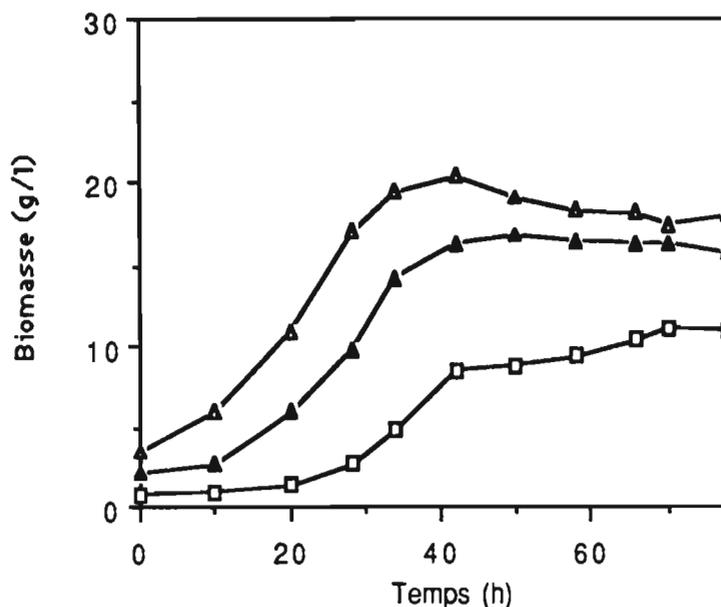


Figure 41 : Effet de la concentration en DCO sur la croissance d'*A. niger* sur margines.

(□): 63 g/l, (▲): 109 g/l, (△): 167 g/l.

3.3. Fermentation des margines par *A. niger* en fermenteur

3.3.1. Comparaison entre la croissance d'*A. niger* sur margines en erlenmeyer et en fermenteur agité

Le fermenteur utilisé est décrit dans le chapitre matériel et méthodes; la fermentation a été réalisée avec 2 l de margines à 154 g/l de DCO additionnées de 4 g/l de sulfate d'ammonium et 6 g/l de nitrate d'ammonium. Le pH n'est pas contrôlé car les margines ont un fort pouvoir tampon autour de pH 4,5. Ces margines ont été inoculées par 10^9 spores/l d'*A. niger* A10.

Ces mêmes margines ont été fermentées en erlenmeyers de 500 ml contenant 50 ml de substrat et placés sur une table d'agitation rotative à 150 tr/min.

Durant ces expériences, nous avons constaté que la germination des spores est plus précoce dans le cas de la fermentation en erlen. La germination des spores en fermenteur est perturbée par leur concentration dans la mousse qui se forme en abondance; l'addition d'antimousse (silicone) est nécessaire et qui peut modifier le taux et la cinétique de germination des spores.

En erlenmeyer, le champignon se développe sous la forme de pelotes dont le

diamètre généralement irrégulier, peut atteindre 5 mm. La biomasse obtenue en fin de fermentation est de l'ordre de 55 g/l de matière sèche. Elle est essentiellement constituée par le mycélium qui enrobe des particules correspondant aux pulpes d'olives. Le pourcentage en protéines de cette biomasse obtenue varie entre 11,5 et 23 % et dépend de la composition des margines et du temps de fermentation. En fermenteur, le mycélium croît normalement pendant 15 h. Ensuite, tout le mycélium formé adhère sur les parois du fermenteur et sur le système d'agitation qui se bloque parfois.

Les cinétiques de consommation du glucose et des sucres réducteurs et de la production de protéines en erlen et en fermenteur sont différentes (fig. 42).

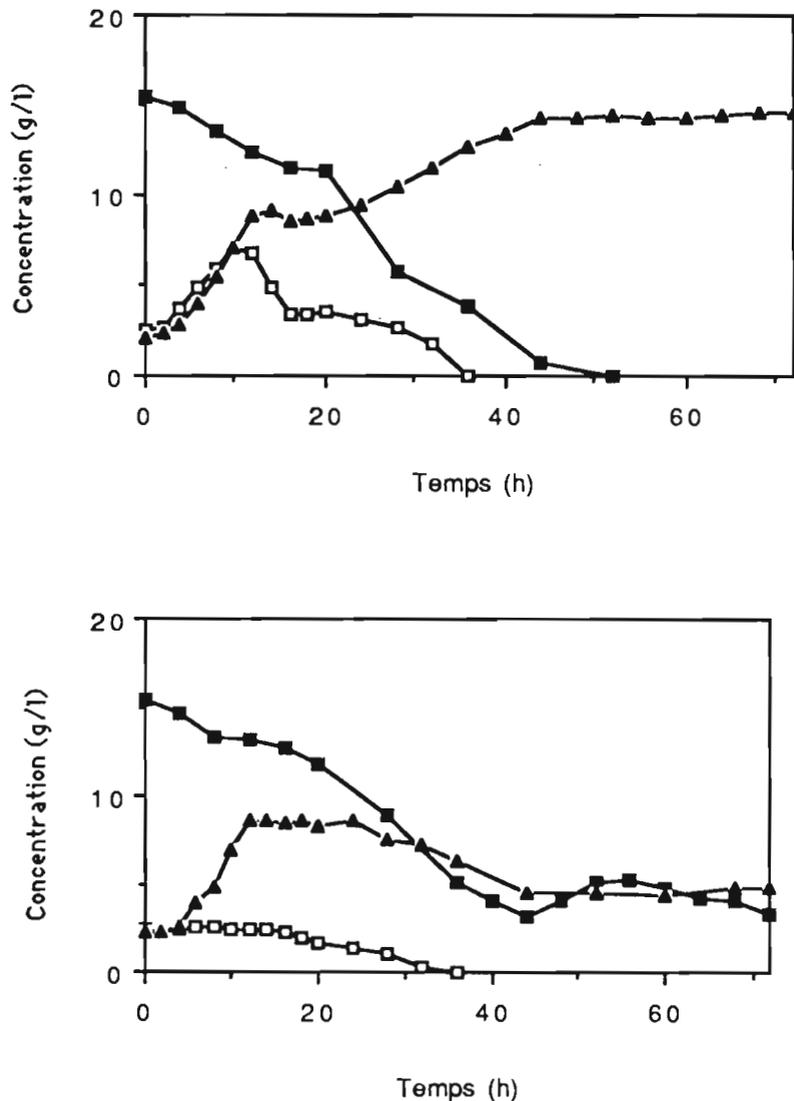


Figure 42: Evolution du glucose (□), des sucres réducteurs (■) et des protéines (▲) pendant la fermentation des margines par *A. niger* en erlenmeyer (a) et en fermenteur agité (b).

L'augmentation de la concentration en glucose en erlenmeyer peut s'expliquer d'une part, par l'hydrolyse enzymatique de certains composés comme la cellulose, la pectine et les tanins et d'autre part, par le faible transfert d'oxygène qui limite la croissance du champignon. Si en fermenteur, la consommation du glucose est plus rapide qu'en erlenmeyer, les sucres réducteurs sont accumulés en fin de fermentation à cause de l'endommagement du mycelium et la formation d'un biofilm très épais. Les abattements de la DCO, après élimination de la biomasse par filtration, ont été de 52,5 % en fermenteur et 61,6 % en erlenmeyer.

L'analyse des composés phénoliques par la méthode de Balice *et al.* (1988) a montré qu'en plus de l'élimination des composés phénoliques simples (55,4 %), les tanins hydrolysables ont été réduits de 72,5 %. Le méthanol qui est un composé issu de la dégradation des pectines (Wood et Siddiqui, 1971), a été détecté en erlenmeyer (0,55 g/l) et en fermenteur (0,47 g/l). Les acides organiques et les polyols caractéristiques du métabolisme d'*A. niger* n'ont pas été déterminés au cours de la fermentation.

Ces expériences ont donc montré que :

- Le fermenteur agité, tout en permettant une meilleure aération qu'en erlenmeyer, n'est pas adapté à la bioconversion des margines par *A. niger*. En outre, l'agitation cisaille le mycelium et la biomasse formée se fixe sur les parois du fermenteur et sur tout le système d'agitation, ce qui rend très difficile sa récupération.

- L'erlenmeyer n'endommage pas le mycelium et la formation de pelotes facilite la récupération de la biomasse par simple filtration. Cependant, la croissance est souvent limitée d'une part, à cause des concentrations élevées en DCO des margines et d'autre part, par suite de l'anaérobiose qui se crée à l'intérieur des pelotes. En outre, l'erlenmeyer ne peut pas être extrapolé à de grandes échelles; la conception d'un autre fermenteur mieux adapté à la croissance d'*A. niger* sur margines est donc nécessaire.

3.3.2. Conception d'une colonne à bulles et détermination de ses performances

La colonne à bulles ou le fermenteur gazosiphon peuvent être adaptés à ce type de fermentation en raison de la nature visqueuse des margines et la croissance d'*A. niger* sous forme de mycélium. Cependant, la fermentation des margines par *A. niger* en gazosiphon a montré que le mycélium a tendance à adhérer sur les parois du cylindre interne du réacteur, perturbant ainsi la circulation du milieu et la croissance du champignon. La colonne à bulles a l'avantage d'être simple à concevoir et ne présente pas d'accessoires qui fixeraient le mycélium, perturberaient sa croissance et rendraient très difficile sa récupération.

La conception de cette colonne à bulles a été faite selon les données indiquées par Smith et Greenshields (1974) qui ont montré que la dimension optimum correspondait à un rapport hauteur sur diamètre égal à 10 et que la double enveloppe était suffisante pour évacuer la chaleur de fermentation pour un volume de fermenteur pouvant atteindre 45 m³.

L'étude des performances de la colonne à bulles conçue pour cette expérience a été basée sur l'examen des différents aspects de comportement hydrodynamique. Ainsi la taille des bulles, la rétention gazeuse, le temps de mélange et le coefficient de transfert d'oxygène peuvent être augmentés ou diminués selon le débit gazeux injecté et la nature du milieu de fermentation.

3.3.2.1. La rétention gazeuse

Le taux de rétention gazeuse peut être défini comme le rapport entre le volume occupé par le gaz et le volume total (gaz et milieu liquide) dans le fermenteur; il a été déterminé globalement à partir du liquide expansé. L'ensemble des résultats obtenus est regroupé dans deux courbes; la première relative au milieu eau distillée-air et la seconde correspondant aux margines-air (fig. 43-a).

Le taux global de rétention gazeuse est une fonction croissante de la vitesse ascensionnelle de l'air. Le milieu de fermentation (margines et mycélium) conduit à l'obtention de bulles de gaz de taille inférieure à celles qu'on observe en présence d'eau et d'air; la vitesse ascensionnelle diminuant, le temps de séjour des bulles augmente ainsi que le volume gazeux présent dans le milieu.

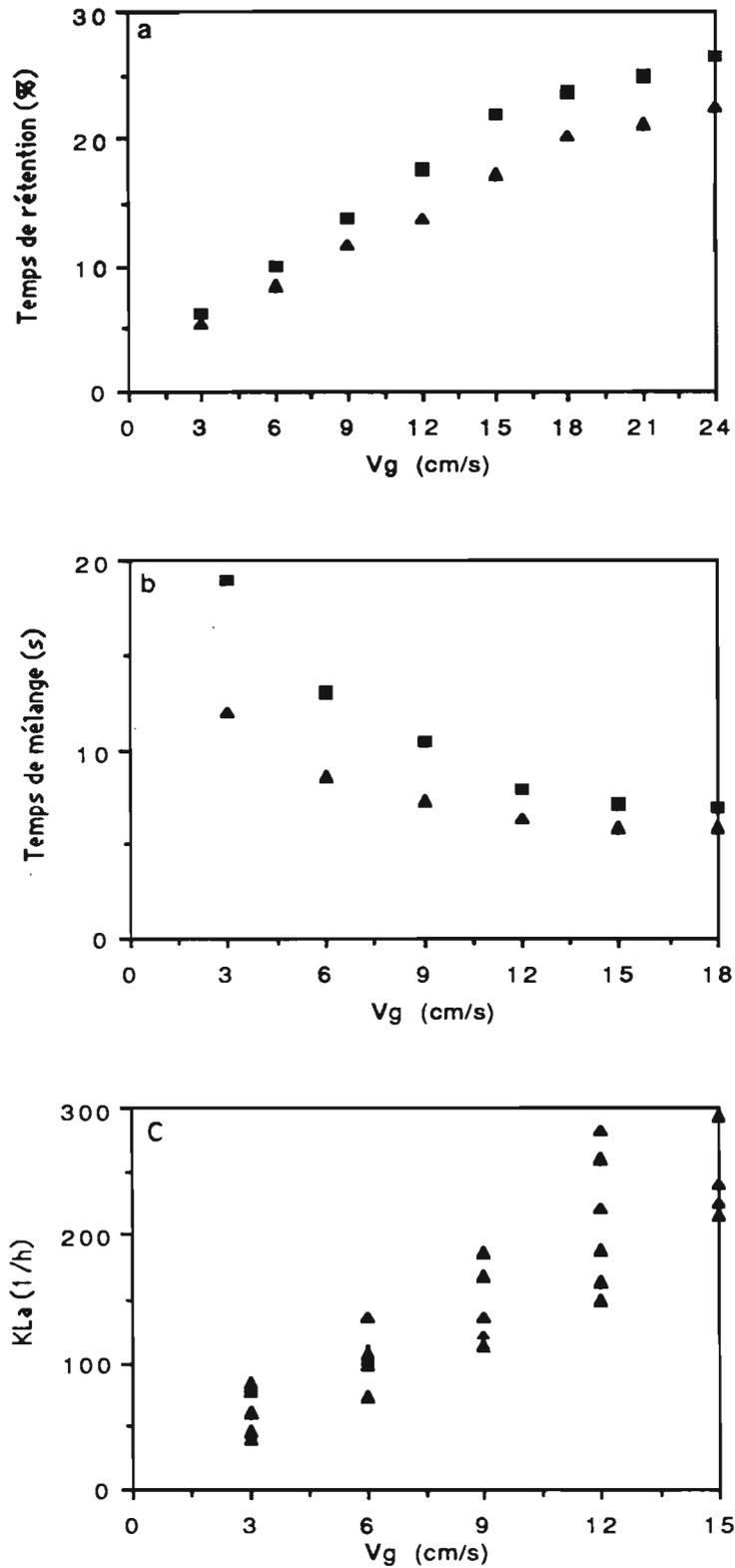


Figure 43: Effet de la vitesse ascensionnelle de l'air sur la rétention gazeuse (a), le temps de mélange (b) et le $K_L a$ (c) dans la colonne à bulles. (▲): eau distillée, (■): margines brutes.

3.3.2.2. Le temps de mélange

Différentes méthodes de mesure sont présentées dans la littérature: méthodes de coloration, de décoloration, thermométrie, pH-métrie, conductimétrie. Nous avons utilisé la méthode de pH-métrie à cause de la couleur noire des margines. L'ensemble des résultats est résumé sur la fig. 43-b où nous avons exprimé le temps de mélange en fonction de la vitesse ascensionnelle de l'air. Cette dernière détermine le régime hydrodynamique de l'émulsion air-liquide. En effet, Smith et Greenshields (1974) ont constaté que le régime passe de l'état laminaire au turbulent à partir de 5 cm/s. Le temps de mélange minimum est obtenu avec l'eau distillée et à forte vitesse ascensionnelle de l'air (au delà de 12 cm/s). Le temps de mélange diminue quand la vitesse ascensionnelle de l'air diminue. Ce temps de mélange est d'autant plus grand que la matière sèche des margines augmente. Il dépend aussi du volume liquide et de la géométrie et de la taille du fermenteur. A titre d'exemple, le temps de mélange dans un gazosiphon de 1900 l est de l'ordre de 2 min (Euzen, 1980).

3.3.2.3. Le transfert d'oxygène

La comparaison entre des conditions opératoires, ou des géométries de réacteur différentes peut être faite sur la base des aires interfaciales. Pour cela, nous avons utilisé la méthode chimique de Cooper *et al.* (1944). La variation du coefficient de transfert d'oxygène (K_{La}) en fonction de la vitesse ascensionnelle de l'air en présence d'eau distillée est reportée sur la fig. 43-c. Ces résultats montrent que le K_{La} augmente linéairement avec l'augmentation de la vitesse ascensionnelle de l'air. Cependant, du fait de la présence de MS et du mycélium en concentrations élevées dans les margines en fermentation, les valeurs de K_{La} seront plus faibles que les valeurs obtenues avec de l'eau distillée.

3.3.2.4. Effet des margines sur la pO_2

Pour étudier l'effet des margines sur la solubilité de l'oxygène, nous avons commencé par fixer l'aération à 20 l/min et la pO_2 à 100 % avec 2 l d'eau distillée. Ensuite, nous avons commencé à ajouter les margines par portion de 100 ml (en prélevant à chaque fois 100 ml de milieu) pour augmenter la proportion de margines dans le fermenteur sans modifier le volume liquide (fig. 44).

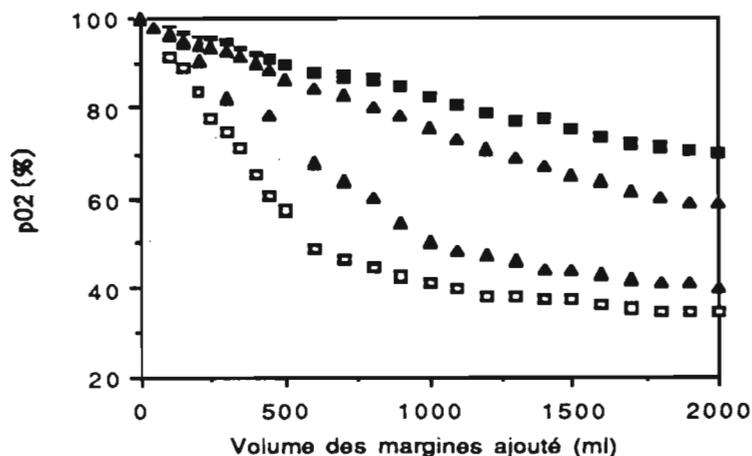


Figure 44: Influence de la concentration des margines brutes (□), des margines filtrées (△) et des margines fermentées par *A. niger* dans la colonne à bulles (▲) et en erlenmeyer (■) sur la pO₂.

La valeur de pO₂ diminue avec l'augmentation du pourcentage de margines dans l'eau distillée, différemment selon que celles-ci sont brutes ou fermentées par *A. niger*. Ceci est dû essentiellement au fait qu'*A. niger* a éliminé certains composés qui limitent le transfert d'oxygène. Les valeurs de viscosité des margines qui augmentent après leur fermentation par *A. niger*, ne peuvent pas expliquer ce fait (tableau 24). Par contre, les margines fermentées par *A. niger* en colonne à bulles sont plus visqueuses que celles fermentées en erlenmeyer, ce qui explique la meilleure solubilité de l'oxygène obtenue avec les margines issues de la culture en erlenmeyer. En effet, Kim et Lebault (1980) ont constaté que la croissance sous forme de pelotes donne des viscosités plus faibles que celles obtenues avec une croissance filamenteuse. La pO₂ a moins diminué avec les margines filtrées qu'avec les margines brutes, ce qui montre que la dissolution de l'oxygène peut être affectée par la présence des MES. Ces taux de diminution de pO₂ de l'ordre de 60 % par l'addition de margines brutes et de 25 % pour les margines fermentées, semblent plus élevés que les valeurs prétendues.

3.3.3. Fermentation des margines par *A. niger* en colonne à bulles

La fermentation a été réalisée avec 2 l de margines stériles à 139,4 g/l de DCO et 117,8 g/l de MS, additionnées de 6 g/l de nitrate d'ammonium et 3 g/l de sulfate d'ammonium et inoculées avec 30 ml d'une suspension de spores d'*A. niger* à 10⁹ spores/l. L'aération a été fixée à 20 l/min.

L'observation microscopique de la culture montre que la germination des spores

commence à partir de la 8^{ème} heure (planche 4). Ensuite, les hyphes s'allongent puis se ramifient rapidement pour donner une suspension filamenteuse sans formation de pelotes car les margines utilisées sont fraîches et ne contiennent pas de MES. Le suivi de la biomasse récupérée par filtration sous vide sur un tissu de Tergal, a montré que le mycélium se développe seulement pendant les premières 24 h au dépens du glucose et des sucres réducteurs comme le montre la fig. 45.

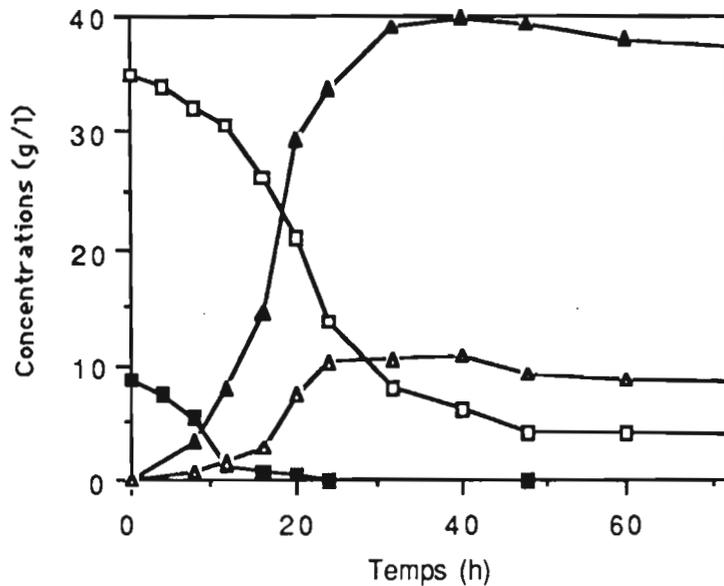


Figure 45 : Cinétique de consommation du glucose (■) et des sucres réducteurs (□) et de la production de biomasse humide (▲) et biomasse sèche (Δ) lors de la fermentation des margines par *A. niger* en colonne à bulles.

Le taux de croissance d'*A. niger* sur ces margines riches en sucres, est de l'ordre de $0,2 \text{ h}^{-1}$. Par contre, avec d'autres margines non fraîches et pauvres en sucres, la croissance est plus lente (fig. 41) et le taux de croissance peut baisser jusqu'aux alentours de $0,1 \text{ h}^{-1}$. Les rendements en biomasse par rapport au substrat ($Y_{X/S}$) et par rapport à l'oxygène (Y_{X/O_2}) pendant la phase de croissance, ont été de $0,33 \text{ g}$ de biomasse par g de sucres et $0,624 \text{ g}$ de biomasse par g d'oxygène.

Le résultat de la mesure du pourcentage d'oxygène et de CO_2 dans les gaz de sortie et de la pression partielle en oxygène (p_{O_2}) dans le milieu de fermentation est représenté sur la fig. 46.

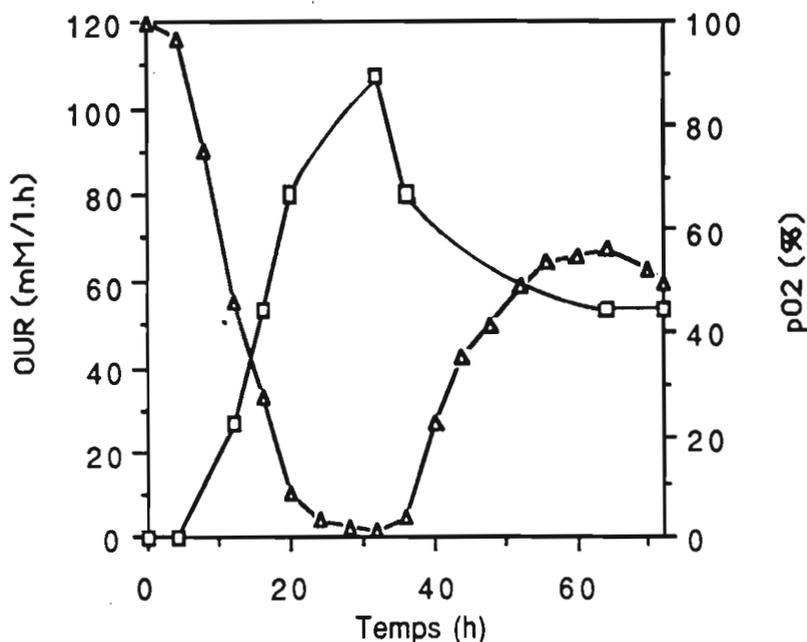


Figure 46 : Evolution de la vitesse d'utilisation de l'oxygène (□) et de la pression partielle de l'oxygène (Δ) au cours de la fermentation des margines par *A.niger* en colonne à bulles.

La vitesse d'utilisation de l'oxygène (OUR) commence à augmenter à partir de la 4^{ème} heure de fermentation pour dépasser les 100 mM/l.h. au bout de 32 h de culture. Puis cette vitesse commence à diminuer pour se stabiliser à 25 mM/l.h. Cependant, la pO_2 évolue inversement à la vitesse d'utilisation de l'oxygène. Les valeurs minimales de pO_2 (2 %) sont atteintes après 20 h de fermentation lorsque les vitesses d'utilisation de l'oxygène dépassent les 70 mM/l.h. En effet, l'allure de la courbe de la biomasse change (fig. 45) au bout de 20 h ce qui montre bien que la croissance a été limitée par l'oxygène. Cette limitation est due non seulement aux performances de transfert d'oxygène du réacteur, mais surtout aux caractéristiques physiques du substrat et à la croissance d'*A. niger* sous forme de suspension filamenteuse qui ne sont pas favorables à la dissolution de l'oxygène (fig. 44). C'est ainsi que la croissance de *Penicillium cyclopium* sous forme de suspension filamenteuse affecte plus le coefficient de transfert d'oxygène que sous forme de pelotes (Kim et Lebault, 1980).

La proportion de l'eau évaporée par rapport au milieu de fermentation a été de l'ordre de 10 %. La chaleur maximale produite en se basant sur les corrélations (fig. 6) peut atteindre 10 Kcal/l. h, lorsque la vitesse d'utilisation de l'oxygène dépasse 90 mM/l.h. En fin de fermentation, la DCO a été réduite de 54 %.

L'analyse des extraits phénoliques par CPG en début et en fin de fermentation, a montré qu'il y a dégradation des monomères phénoliques, mais également apparition d'autres monomères en concentrations significatives comme l'acide gallique issu de l'hydrolyse des tanins (fig. 47).

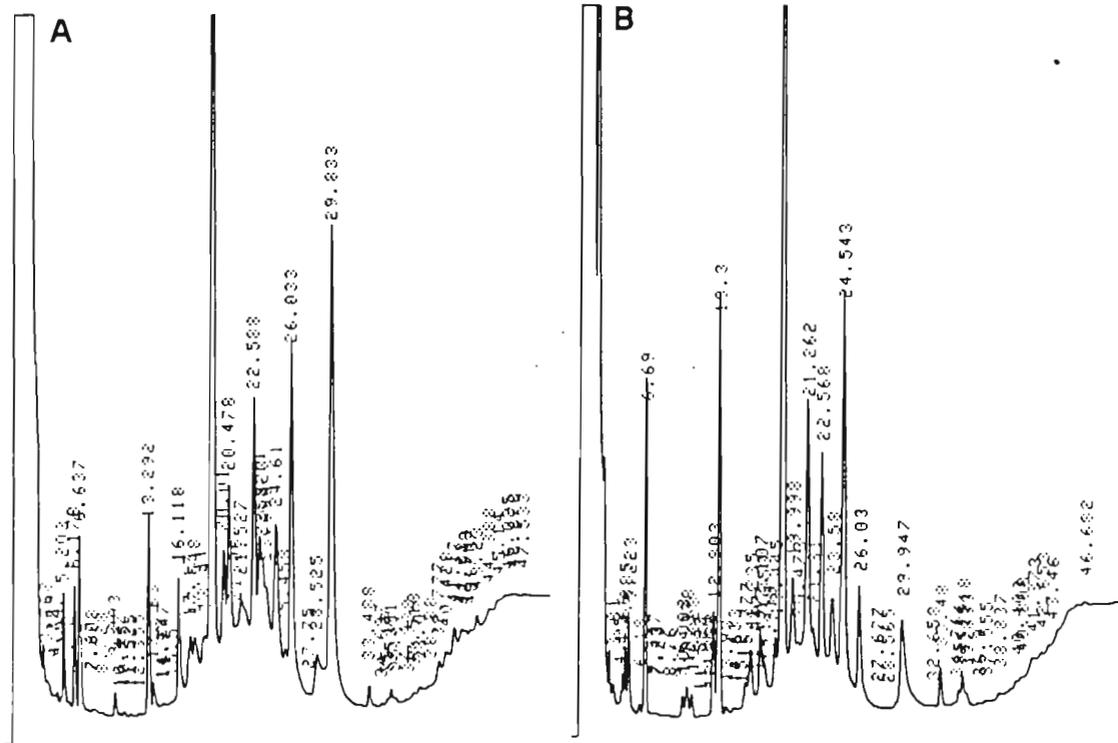


Figure 47: Chromatogrammes en phase gazeuse des margines avant (A) et après (B) fermentation par *A. niger* en colonne à bulles.

Les analyses sur gel de Séphadex G 50 de deux margines différentes fermentées par *A. niger* en colonne à bulles, ont montré que les polymères du premier groupe sont les plus dégradés durant ce type de fermentation (fig. 48). Nous avons constaté que ces polymères sont moins dégradés lorsque les margines sont riches en sucres.

Le bilan matière de la fermentation des margines Sfax-89 par *A. niger* en colonne à bulles durant 72 h, est donné dans le tableau 23.

Tableau 23: Composition des margines Sfax-89 avant et après fermentation en colonne à bulles par *A. niger*

| Caractéristiques (g/l) | Margines | Margines fermentées |
|------------------------|----------|---------------------|
| DCOt | 136,4 | 56,2 |
| DCOs | 117,3 | 48 |
| MS | 134 | 61,3 |
| MES | 19,5 | 4,6 |
| Sucres réducteurs | 15,2 | 5,4 |
| Glucose | 2,4 | trace |
| Nombre de bactéries/ml | 8.10^3 | $5,4.10^6$ |
| pH | 5,54 | 5,6 |

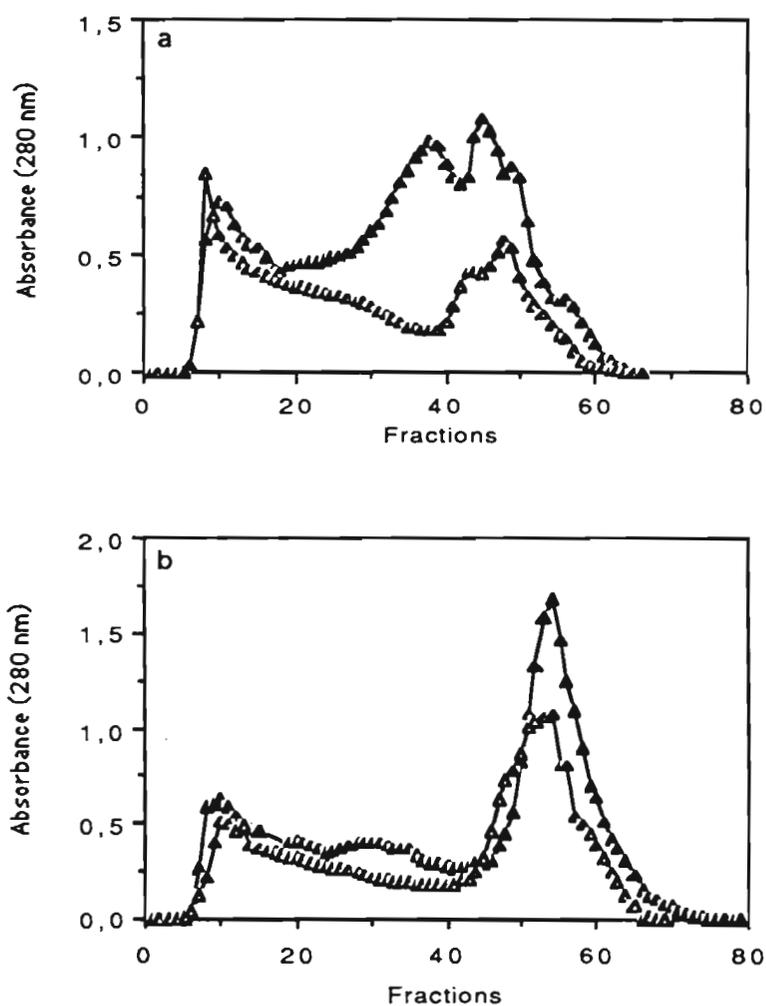


Figure 48: Profil d'éluion sur gel de séphadex G 50 des margines Sfax-89 (a), et des margines huilerie-90 (b), avant (▲) et après fermentation (Δ).

3.3.4. Amélioration de la filtration des margines après leur fermentation par *A. niger*

La croissance d'*A. niger* sur margines produit un mycélium très ramifié qui piège les MES (Planche 5) et améliore la porosité du gateau formé lors de la filtration des margines fermentées (Planche 6). En outre, il dégrade certains composés comme les pectines, les mucilages et les huiles qui limitent la cinétique de filtration. La fig. 49 montre l'amélioration très nette de la cinétique de filtration des margines fermentées par *A. niger* pendant 48 h.

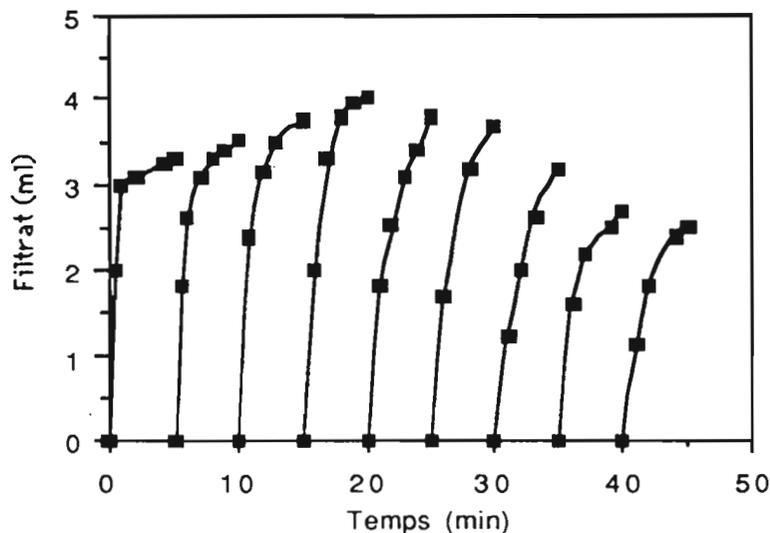


Figure 49: Cinétique de filtration sous pression atmosphérique des margines fermentées par *A. niger* en erlenmeyer.

Lors de la filtration sous pression atmosphérique des margines brutes, seuls 1,5 ml de liquide ont été récupérés en 25 min (fig. 23). Alors qu'avec les margines fermentées par *A. niger*, la filtration sous pression atmosphérique a engendré plus de 3 ml de liquide en 1 min seulement et plusieurs cycles de filtration ont pu être réalisés sans avoir de problèmes de colmatage (fig. 49).

Cette augmentation du volume du filtrat récupéré jusqu'au quatrième cycle de filtration puis sa diminution peuvent s'expliquer par un compromis obtenu entre la pression provoquée par la hauteur du gateau et du liquide à filtrer d'une part, et les propriétés de compressibilité du gateau d'autre part. En effet, le gateau obtenu lors de la filtration des margines brutes est plus compact et moins compressible que celui obtenu par filtration des margines fermentées par *A. niger*.

Les neuf cycles de filtration sous pression atmosphérique correspondant à 45 ml de

margines fermentées, ont donné un gateau imbibé d'eau avec une hauteur de 5 cm et un poids de 7,62 g. La matière sèche de ce gateau est de 9,65 %. l'application d'une filtration sous vide a réduit sa hauteur à 1,8 cm et son poids à 3,41 g et a augmenté sa matière sèche à 20,5 %. Le mycélium et les MES humides contenus dans ces margines fermentées sont de l'ordre de 75 g/l. L'application du vide à la filtration des margines fermentées a réduit 10 fois le temps de filtration obtenu sous pression atmosphérique (fig. 49 et 50).

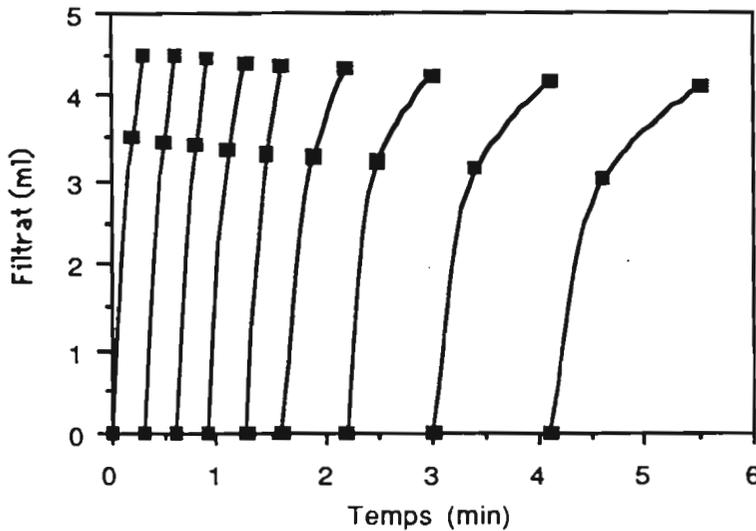


Figure 50: Cinétique de filtration sous vide des margines fermentées par *A. niger* en erlenmeyer.

La totalité du liquide a été très rapidement récupérée et trois cycles de filtration ont pu être effectués en moins d'une minute. La cinétique de filtration des margines fermentées par *A. niger* n'est affectée qu'au bout du 6^{ème} cycle; elle dépend du temps de fermentation et des conditions de cultures qui déterminent la physiologie de la croissance du champignon. Si par exemple, le temps de filtration est défini comme étant le temps nécessaire pour récupérer la moitié du volume de l'échantillon à filtrer, ce temps de filtration varie avec le temps de fermentation et selon que la culture d'*A. niger* est réalisée en colonne à bulles ou en erlenmeyer (fig. 51).

La meilleure cinétique de filtration obtenue avec les margines fermentées en colonnes à bulles pendant 24 h peut s'expliquer par une meilleure croissance d'*A. niger* en fermenteur par rapport à l'erlenmeyer. Cependant au delà de 24 h de fermentation, la cinétique de filtration devient meilleure pour les margines fermentées en erlenmeyer.

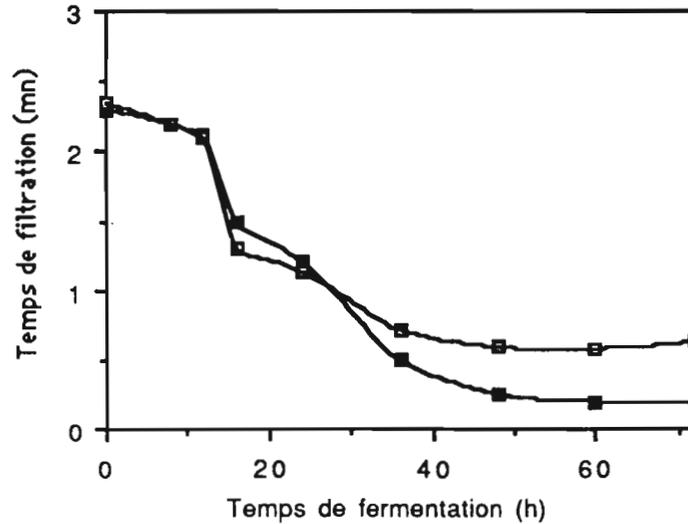


Figure 51: Influence du temps de fermentation des margines par *A. niger* en erlenmeyer (■) et en colonne à bulles (□), sur la cinétique de filtration.

Ceci peut s'expliquer par le fait que ce champignon pousse sous forme de pelotes en erlenmeyer et sous forme de suspension filamenteuse en colonne à bulles; la forme en pelotes donne une suspension moins visqueuse (tableau 24) et un gâteau plus poreux, donc plus favorable à la filtration.

Tableau 24: Viscosités des margines en fonction de leur état physico-chimique.

| Caractéristiques | DCO (g/l) | MS (g/l) | MES (g/l) | Viscosité* (mPa. s ⁻¹) |
|--------------------------------|-----------|----------|-----------|------------------------------------|
| Margines brutes | 123.7 | 124.6 | 4.5 | 7.2 |
| Margines brutes filtrées | 126.3 | 128.1 | nd | 2.64 |
| Margines brutes centrifugées | 106.7 | 107.6 | nd | 1.92 |
| Margines fermentées en colonne | nd | 118.5 | 22.7 | 38.4 |
| Margines fermentées en erlen | nd | 118.5 | 22.7 | 31.2 |
| Margines fermentées filtrées | 64.6 | 63.8 | nd | 2.64 |

nd : non déterminé. * : Viscosité mesurée à une contrainte de cisaillement de 1 s⁻¹.

3.4. Conclusions

La fermentation des margines complémentées en sulfate et en azote, par *A. niger* F38 dans une colonne à bulles, a permis d'obtenir une réduction de la DCO d'environ 55 %, avec une amélioration de leur filtration et une dégradation des composés phénoliques de nature tanique et monomérique. La toxicité des margines est due essentiellement aux composés phénoliques correspondant aux tanins, aux anthocyanes et aux monomères aromatiques, puisque leur réduction par *A. niger* a permis une meilleure croissance des bactéries aérobies et une meilleure méthanisation. Les composés phénoliques responsables de la coloration noire sont très peu dégradés par *A. niger*, et semblent être peu toxiques.

Dans le chapitre suivant, nous allons étudier le traitement des margines fermentées par *A. niger* par voie anaérobie ou (et) aérobie, dans le but de compléter la dégradation des composés résiduels des margines et ceux issus du métabolisme d'*A. niger*.

4. Traitement des margines préfermentées par *A. niger*

Le filtrat de fermentation par *A. niger* F₃₈ des margines Sfax - 89 en colonne à bulles (tableau 23) a été traité par trois voies différentes dans le but de choisir la meilleure solution:

- par voie anaérobie (méthanisation),
- par voie aérobie (boues activées),
- en couplant la voie anaérobie et la voie aérobie (filtre anaérobie suivi d'un traitement par boues activées).

Sachant que les margines contiennent des produits inhibiteurs de la méthanisation, nous avons essayé de travailler dans des conditions qui minimisent les phénomènes d'inhibition en utilisant:

- des réacteurs pistons et à film fixé, le filtre anaérobie (Khan *et al.*, 1981);
- un mode d'alimentation ascendant parce qu'il permet des temps de démarrage plus courts, de meilleures efficacités épuratoires et des rendements en méthane plus élevés que pour le mode descendant (Weiland et Wulfert, 1987);
- une alimentation en cascade par des programmeurs.

4.1. Méthanisation des margines préfermentées

Nous avons commencé par étudier l'effet de la nature du support sur les performances du filtre anaérobie. Ensuite, le filtre anaérobie garni du support choisi a été comparé à un réacteur de type contact anaérobie.

4.1.1. Effet de la nature du support sur les performances du filtre anaérobie

Un filtre anaérobie à support en vrac et un filtre anaérobie à support orienté fonctionnant en parallèle (fig. 17) ont été alimentés en cascades par les margines GARD diluées, additionnées d'urée et de chaux pour corriger respectivement le rapport DCO : N et le pH. Le temps de séjour hydraulique (TRH) a été maintenu constant aux alentours de 7 à 9 j et l'augmentation de la charge a été réalisée par la préparation de concentration croissantes de margines.

Les charges volumiques ont été calculées sur le volume total du réacteur sans tenir compte du volume occupé par le support. Durant notre étude, nous avons alimenté les deux filtres avec des charges croissantes en vue d'atteindre la charge maximale. Le passage d'une charge à une charge supérieure s'effectue après stabilisation de la productivité en biogaz. En pratique, la durée nécessaire à cette stabilisation est de l'ordre de 3 fois le TRH appliqué. Dans

notre cas, le maintien du fonctionnement du réacteur à une charge donnée a duré, en général, 3 à 4 semaines.

Théoriquement, le filtre anaérobie à support en vrac, constitué de 400 g d'argile, fournit une surface globale de 90 000 m² alors que le filtre anaérobie à support orienté, garni de 60 g de plasdeck B 27, ne fournit que 0,2 m² de surface globale. Cependant, les surfaces pratiquement disponibles pour l'adhésion des bactéries sont très inférieures, en particulier, pour le support en vrac.

La fig. 52 montre que la productivité journalière en biogaz s'est nettement améliorée avec l'augmentation de la charge volumique, mais seulement dans le cas du filtre anaérobie à support d'argile.

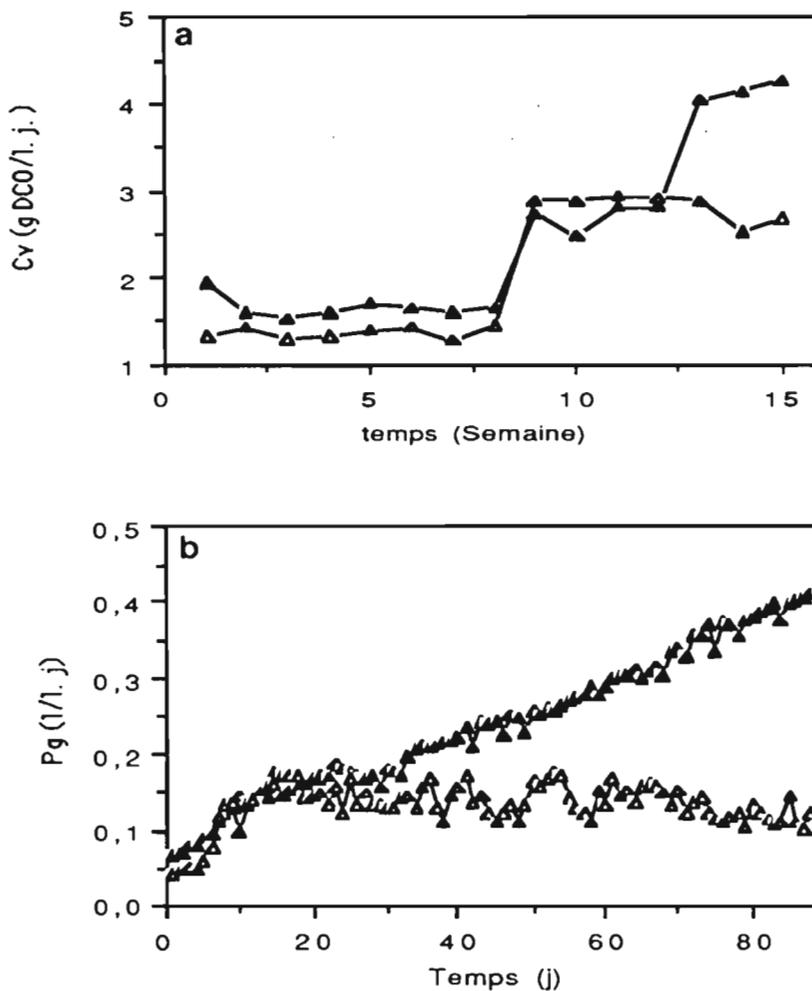


Figure 52: Variation de la charge volumique (a) et des productivités journalières en biogaz (b) dans le filtre anaérobie à support d'argile (▲) et dans le filtre anaérobie à support de PVC (Δ).

En effet, la fixation de la biomasse bactérienne est moins efficace dans le filtre anaérobie garni de PVC, comme le montre la perte en MVS dans l'effluent (fig. 53). Cette même

figure montre que l'abattement de la DCO et le pourcentage en méthane sont meilleurs dans le cas du filtre anaérobie à support en vrac. En outre, procédé a montré une stabilité de fonctionnement meilleure que celle du filtre anaérobie à support orienté.

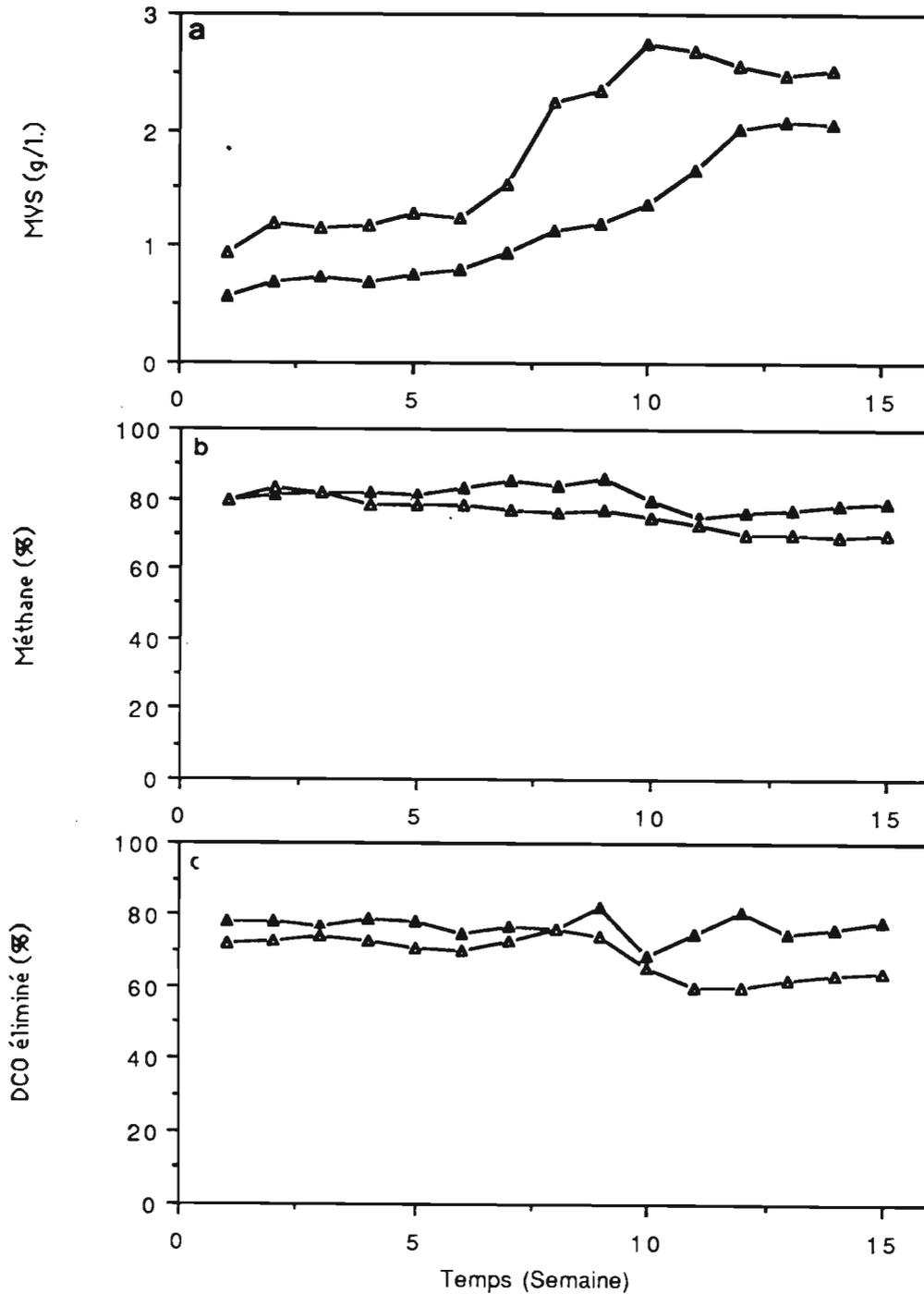


Figure 53: Effet de la charge volumique sur la concentration en MVS dans les effluents (a), le pourcentage en méthane dans le biogaz (b) et l'abattement de la DCO (c) dans le filtre anaérobie à support d'argile (\blacktriangle) et dans le filtre anaérobie à support de PVC (Δ).

La teneur en AGV exprimés en équivalents acétate était de 0,5 g/l dans le filtre anaérobie à support en vrac et 0,6 g/l dans le filtre anaérobie à support orienté. Cette expérience nous a montré que la faible porosité des argiles favorise le démarrage du filtre anaérobie. Cependant, au cours de la montée en charge, il y a eu par deux fois colmatage du filtre anaérobie à support d'argile. Pour cette raison, nous avons utilisé comme support pour la suite de notre étude, des fragments de gaine électrique plastique qui présente des caractéristiques intermédiaires entre les deux supports testés.

4.1.2. Comparaison entre filtre anaérobie et contact anaérobie

Bien que le filtre anaérobie ait montré une meilleure efficacité pour la méthanisation des margines brutes (Rozzi *et al.*, 1989), nous avons voulu le comparer avec le procédé du contact anaérobie parce que l'agitation avait augmenté la cinétique de production du méthane à partir des margines fermentées par *A. niger* (fig. 30).

Un filtre anaérobie garni de 750 g de fragments de gaine électrique et un contact anaérobie (fig. 16) ont été alimentés en cascades avec les mêmes margines Bou-Ghrara préfermentées par *A. niger* (30 g/l de DCO et pH 7,5) avec des débits respectifs de 0,21 et 4,16 ml/min. Les pompes ont fonctionné toutes les 4 h pendant 20 min pour donner un TRH de 15 j. Les charges volumiques ont été d'environ 2 g DCO/l. j.

Les productivités en biogaz obtenues pour ces deux digesteurs montrent que leur efficacité est différente (fig. 54).

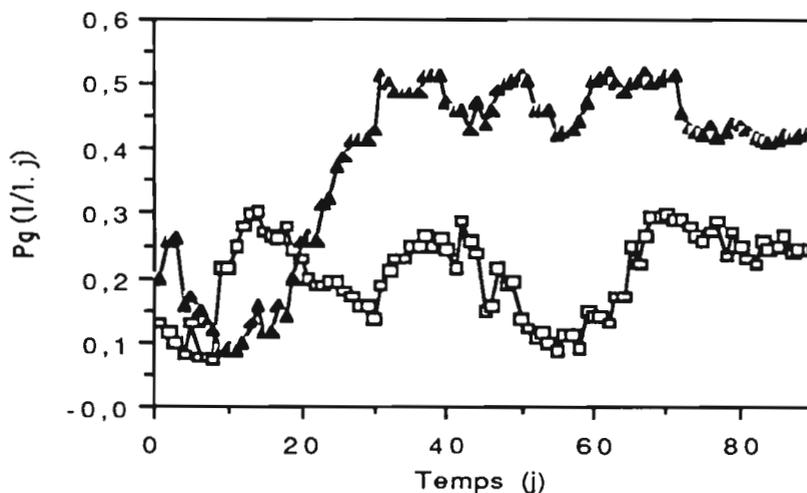


Figure 54: Productivités journalières en biogaz du filtre anaérobie (▲) et du contact anaérobie (□).

Durant les dix premiers jours, les productivités en biogaz ont diminué alors que la concentration en AGV augmentait par suite de l'augmentation de la charge volumique de 1 g/l.j (dans l'étape d'acclimatation) à 2 g/l.j. Par la suite, la croissance des bactéries méthanogènes a rétabli l'équilibre correspondant à l'état stationnaire et la concentration en AGV est retombée à son niveau normal (fig. 55). L'étape qui précède l'état stationnaire correspond à un état transitoire dont la durée détermine la vitesse de démarrage du procédé. Le contact anaérobie a atteint son état stationnaire au bout de 15 j alors que le filtre anaérobie ne l'atteignait qu'après 30 j. Ce temps plus court de l'étape transitoire dans le contact anaérobie peut s'expliquer par le fait que la croissance bactérienne est plus rapide en réacteur à cellules libres (contact anaérobie) qu'en réacteur à film fixé (Van Den Berg *et al.*, 1980). Cependant, l'état stationnaire du filtre anaérobie est très stable comparé à celui du contact anaérobie dans lequel il y a eu plusieurs fluctuations. Le rétablissement d'un fonctionnement correct est très rapide dans le cas du filtre anaérobie qui a montré une meilleure stabilité face aux fluctuations de charge et aux entrées d'air. En effet, au 40^{ème} jour les deux digesteurs ont reçu 0,3 l d'air/l de réacteur durant 40 min; le filtre anaérobie a maintenu ses performances, alors que dans le contact anaérobie, les productivités en biogaz ont diminué et la concentration en AGV a augmenté (fig. 55).

Le biogaz produit par le filtre anaérobie contient plus de méthane et moins d'hydrogène que celui produit par le contact anaérobie. La faible pression en hydrogène est en faveur de la dégradation syntrophique des alcools (Bryant *et al.*, 1967), des acides gras (McInerney *et al.*, 1981) et des composés aromatiques (Mountfort et Bryant, 1982). L'analyse des AGV des deux réacteurs (fig. 55) montre que le filtre anaérobie, contrairement au contact anaérobie qui est infiniment mélangé, se comporte comme un réacteur piston puisqu'un gradient de concentrations d'AGV s'établit entre l'entrée et la sortie du réacteur. Cependant, le filtre anaérobie se rapproche du réacteur infiniment mélangé lorsque la production en biogaz devient forte (Hall, 1982). L'effluent issu du filtre anaérobie contient moins d'AGV que celui issu du contact anaérobie, ce qui implique des abattements de DCO meilleurs dans le filtre anaérobie (fig. 56-d).

Le biogaz du filtre anaérobie est plus riche en méthane et plus pauvre en hydrogène que celui produit par le contact anaérobie (fig. 56 a-b). Les meilleures performances obtenues par le filtre anaérobie peuvent s'expliquer par la fixation et le piégeage des boues dans les interstices du support qui augmentent ainsi leur concentration au sein du réacteur et atténuent l'inhibition des bactéries méthanogènes (Parkin et Speece, 1983; Khan *et al.*, 1981). En effet, la mesure des matières volatiles dans l'effluent des deux réacteurs a montré que la biomasse s'échappant du contact anaérobie est plus importante que celle issue du filtre anaérobie (fig. 56-c).

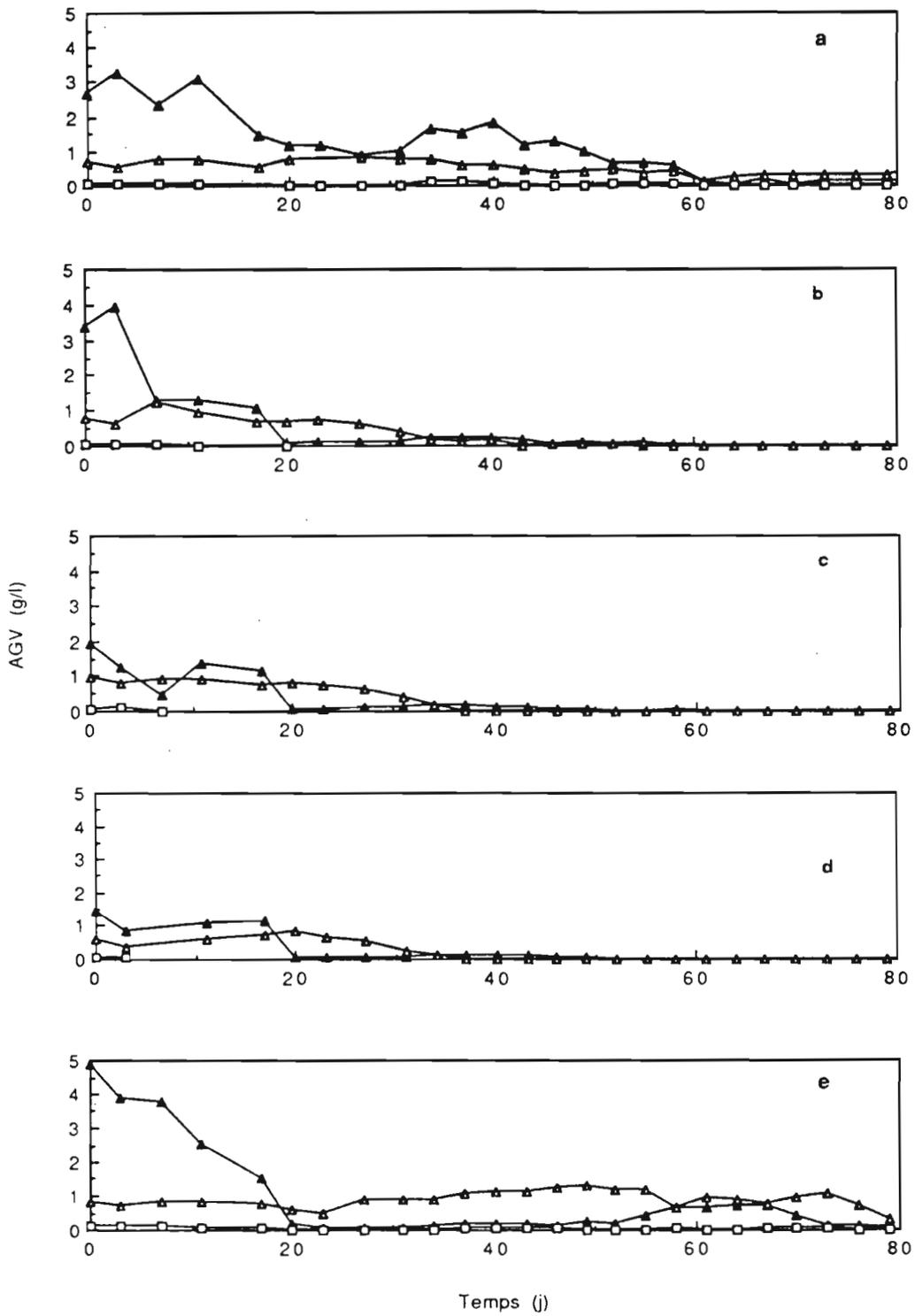


Figure 55: Accumulation d'acétate (▲), propionate (△) et butyrate (□) dans les niveaux a, b, c et dans l'effluent du filtre anaérobie (d), et dans l'effluent du contact anaérobie (e).

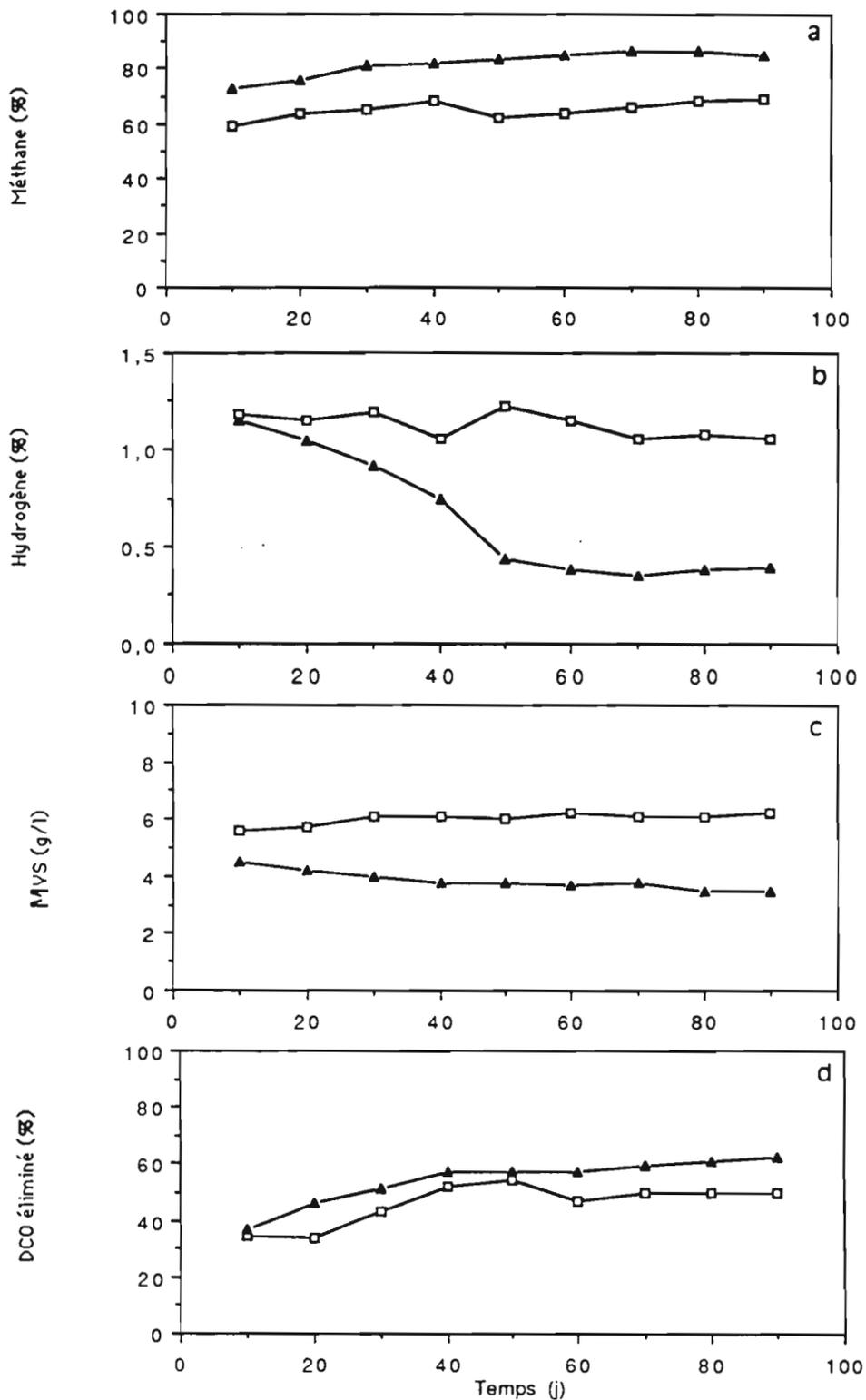


Figure 56: Evolution du pourcentage en méthane (a) et en hydrogène (b) dans le biogaz, de la concentration des MV dans l'effluent (c) et de l'abattement de la DCO (d) dans le filtre anaérobie (▲) et dans le contact anaérobie (□).

Les rendements en méthane (l de méthane par g de DCO éliminée) calculés sur la base des données expérimentales, montrent que la quasi-totalité du flux de carbone est orienté vers la formation de méthane dans le filtre anaérobie. Par contre, dans le contact anaérobie, une partie non négligeable du flux de carbone donne de la biomasse et des AGV (fig. 57).

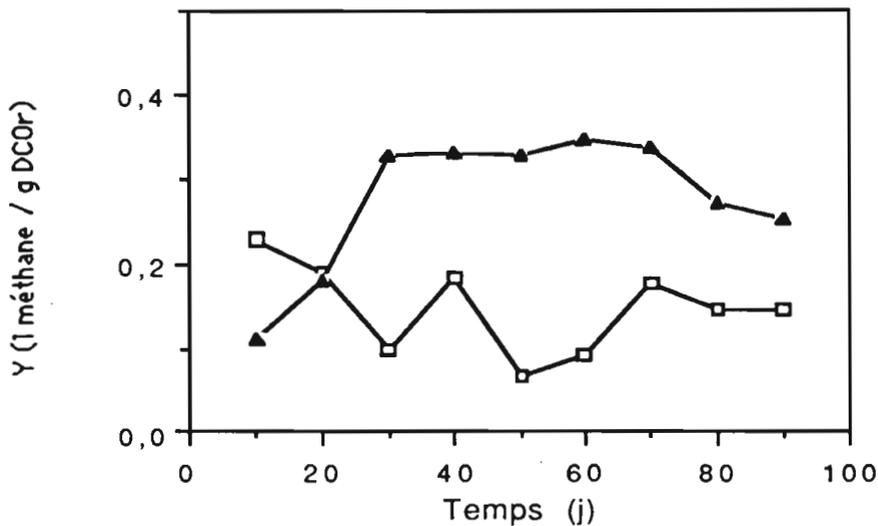


Figure 57: Evolution des rendements en méthane dans le filtre anaérobie (▲) et le contact anaérobie (□).

Le filtre anaérobie qui a une bonne stabilité et un démarrage rapide, convient plus particulièrement à la digestion anaérobie des margines de nature saisonnière. En effet, Rozzi *et al.* (1989) ont constaté que pour traiter les margines, le filtre anaérobie est nettement plus rapide que les digesteurs à cellules libres comme le contact anaérobie ou le procédé UASB. Compte tenu des bonnes performances et de la meilleure stabilité obtenues avec le filtre anaérobie et de l'évolution des digesteurs appliqués à la méthanisation des margines vers ce type de procédé (Tableau 5), ce dernier a été retenu pour la méthanisation des margines préfermentées pour la suite de notre travail. En outre, ce filtre anaérobie a pu fonctionner avec 30 g/l de DCO (marges préfermentées diluées deux fois) sans que les AGV puissent être détectés dans son effluent (fig. 55). Ceci montre bien que ce réacteur est susceptible de recevoir des margines plus concentrées, avec des charges plus importantes.

4.2. Comparaison entre le traitement en filtre anaérobie et le traitement aérobie en lit fluidisé des margines préfermentées

Compte tenu des données bibliographiques qui montrent l'intérêt de l'usage de bactéries aérobies dans la dégradation des composés aromatiques (Kirk, 1984) et de leur développement en fin de fermentation des margines par *A. niger*, nous avons pensé comparer un traitement aérobie par boues activées à celui de la digestion anaérobie en filtre anaérobie.

4.2.1. Traitement en filtre anaérobie

Le filtre anaérobie retenu a été alimenté dans les mêmes conditions que le lit fluidisé à boues activées (fig. 14) par les margines Sfax - 89 préfermentées par *A. niger* et ajustées à la chaux à pH 7,2. Le filtre anaérobie et le lit fluidisé ont été alimentés toutes les 4 h pendant 10 min avec des débits respectifs de 12,5 et 1,7 ml/min, ce qui donne un TRH de 7j pour une charge volumique de 1,3 g DCO/l.j dans les deux réacteurs. Après stabilisation du réacteur en phase stationnaire, les performances d'élimination de la DCO et de la production de méthane ont été stables tout au long de cette étude (4 semaines)(tableau 25).

Tableau 25 : Composition de l'alimentation et de l'effluent du filtre anaérobie.

| Caractéristiques | Filtrat des margines fermentées par <i>A. niger</i> | Effluent du Filtre anaérobie |
|------------------|--|---------------------------------|
| DCOt (g/l) | 9.22 | 3.04 |
| DCOs (g/l) | 8.15 | 2.6 |
| MS (g/l) | 8.5 | 2.8 |
| MES (g/l) | 1.08 | 0.4 |
| pH | 7.4 | 7.8 |

Cet essai a montré que le réacteur:

- a produit une quantité importante de biogaz de l'ordre de 1,3 l/j pour une DCO introduite de 4,6 g/j;
- a entraîné un abattement de la DCO totale de 67 % environ et de la DCO soluble de 59 %.

4.2.2. Traitement aérobie par boues activées en lit fluidisé

Cette étude a nécessité la sélection de bactéries dégradant les monomères aromatiques et le choix d'un support bactérien pour former des boues activées en lit fluidisé.

4.2.2.1. Sélection des bactéries et formation de boues activées

L'isolement de 10 souches de bactéries a été réalisé à partir d'environnements riches en composés phénoliques (margines brutes et margines fermentées). Après des essais d'identification par l'utilisation de galeries API 20 E, les souches 1, 3, 4 et 10 semblent proches des genres *Pseudomonas*, *Achromobacter* et *Chromobacterium*, les souches 7 et 8 proches du genre *Aeromonas*, et la souche 9 du genre *Serratia*. Les souches 2, 5 et 6 n'ont pas pu être classées.

Chacune de ces bactéries a été cultivée sur 9 acides phénoliques présents dans les margines, en tubes agités pendant 7 j. La mesure de l'absorbance de chacun de ces composés à son maximum d'absorption avant et après fermentation, indique sa biodégradabilité (fig. 58). Ces bactéries dégradent plus ou moins facilement ces acides phénoliques. Les souches 2, 4, 5, 7, 9 et 10 ont dégradé une partie de tous les acides phénoliques. Elles ont été retenues pour une étude ultérieure sur les margines.

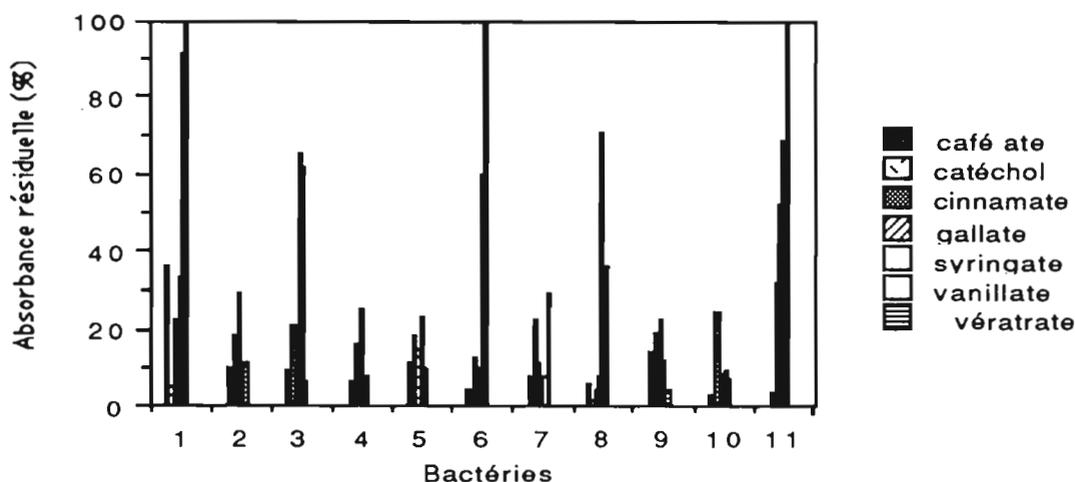


Figure 58: Dégradation des acides phénoliques par les différentes bactéries isolées

Le filtrat des margines préfermentées par *A. niger* a servi de substrat pour la culture des souches 2, 4, 7, 8 et 10 séparément ainsi que pour le mélange des 11 souches. L'analyse par CPG du produit de dégradation des margines préfermentées par *A. niger* par ces bactéries a montré que la souche 10 et la culture mixte se sont avérées les meilleures à

métaboliser les composés phénoliques de ces margines. Nous avons donc retenu la culture mixte pour la formation des boues activées. Ce mélange de souches bactériennes a permis d'inoculer un fermenteur de 0,5 l contenant 50 g de coques d'olives et des margines préfermentées par *A. niger* à 9,5 g/l DCO. Après 7 j de culture en batch, ce fermenteur a été alimenté quotidiennement par 70 ml de margines préfermentées à 9,22 g/l de DCO, pour acclimater les bactéries et parvenir à l'état stationnaire.

4.2.2.2. Etude physique et microscopique du support bactérien (coques d'olives)

Les dimensions et les propriétés de décantation et de porosité des coques d'olives sont reportées dans le tableau 26. Il est à remarquer que la surface spécifique est très proche de celle du sable conventionnellement utilisé dans les lits fluidisés (Switzenbaum, 1983).

Tableau 26: Caractéristiques du support utilisé dans le lit fluidisé à boues activées

| Caractéristiques | Taille des coques | |
|---------------------------------------|-------------------|--------|
| | Moyenne | Petite |
| Dimensions (mm) L:l :H | 2:2:1 | 1:1:1 |
| Surface (mm ²) | 16 | 6 |
| Volume (mm ³) | 4 | 1 |
| S/V (m ² /m ³) | 4000 | 6000 |
| Densité (Kg/m ³) | 1,2 | 1,184 |
| Vitesse de décantation (cm/s) | 5,8 | 5 |
| Porosité (%) | 65 | 60 |
| Matière sèche (%) | 92,2 | 92,2 |
| Matière volatile (%) | 91,8 | 91,8 |

Outre sa nature biologique, sa grande surface spécifique et sa bonne porosité, ce support a l'avantage d'être maintenu en suspension par la seule aération, sans recours à des débits élevés de recirculation du milieu de culture, comme c'est le cas pour les grains de sable. Les photos en microscopie à balayage de ces coques montrent qu'elles présentent une surface très poreuse qui faciliterait la fixation des bactéries (Planche 7).

4.2.2.3. Traitement aérobie des margines préfermentées par boues activées en lit fluidisé

Ce traitement a été réalisé dans les mêmes conditions que le filtre anaérobie (4.2.1.) après stabilisation du réacteur à l'état stationnaire. Les performances de ce lit fluidisé pendant 4 semaines de fonctionnement sont reportées dans le tableau 27.

Tableau 27 : Composition de l'alimentation et de l'effluent du lit fluidisé.

| Caractéristiques | Filtrat des margines fermentées par <i>A. niger</i> | Effluent des boues activées |
|-----------------------|--|--------------------------------|
| DCOt (g/l) | 9.22 | 6.5 |
| DCOs (g/l) | 8.15 | 3.5 |
| MS (g/l) | 8.5 | 6.2 |
| MES (g/l) | 1.08 | 3.14 |
| pH | 7.4 | 8.3 |
| Bactéries / ml | 10 ⁴ | 10 ⁷ |
| Bactéries / g Support | - | 10 ⁵ |

Les résultats montrent que ce réacteur:

- produit une quantité importante de boues (cellules fixées et libres) ,
- entraîne une diminution importante de la DCO (57 %).

Le lessivage des boues qui intervient à la sortie du réacteur nous a conduits à adapter un décanteur pour leur recyclage.

La comparaison de ces deux voies de traitement des margines préfermentées par *A. niger* en lit fluidisé aérobie et en filtre anaérobie, montre que l'étape anaérobie est plus économique dans la mesure où

- * elle produit du méthane,
- * elle ne consomme pas d'air,
- * elle ne produit pas de boues.

En outre, l'étape aérobie peut être réalisée d'une façon indirecte en prolongeant la fermentation des margines par *A. niger* en colonne à bulles en présence de bactéries performantes. Cependant dans ce cas, nous défavoriserions la production de biogaz.

4.3. Traitement des margines préfermentées par filtre anaérobie et boues activées

Après avoir comparé ces deux voies, le traitement des margines a été réalisé en trois étapes successives (fig. 18):

- * Fermentation des margines par *A. niger* en colonne à bulles.
- * Méthanisation en filtre anaérobie des margines fermentées en colonne à bulles avec une charge de 2,12 g DCO/l.j.
- * Post-traitement par boues activées en lit fluidisé. L'effluent issu du filtre anaérobie a été traité par les boues activées décrites précédemment, avec une charge de 1,4 g DCO/ l.j. Le temps de séjour a été fixé comme précédemment à 7 j.

le résultat de la première étape est reporté dans le tableau 28 et confirme les performances rapportées dans le tableau 25.

Tableau 28 : Composition de l'alimentation et de l'effluent du filtre anaérobie

| Caractéristiques (g/l) | Filtrat des margines préfermentées par <i>A. niger</i> | Effluent du filtre anaérobie |
|------------------------|---|---------------------------------|
| DCOt | 14,9 | 5,9 |
| DCOs | 11,4 | 5,45 |
| MS | 12,7 | 5,7 |
| MES | 1,8 | 0,46 |
| pH | 7,2 | 7,85 |

L'analyse des margines à l'entrée et à la sortie du filtre anaérobie par chromatographie sur gel Séphadex G-50 (fig. 59) montre que le filtre anaérobie a modifié d'avantage les composés phénoliques du premier groupe que ceux du second groupe. Cela pourrait être essentiellement dû au temps de séjour relativement court qui ne permet pas la dégradation anaérobie de ces polymères proches de la lignine.

durant l'utilisation de ce filtre anaérobie, nous n'avons pas constaté de formation de chemins préférentiels dans le réacteur, ni de colmatage du support. La biomasse a surtout été retenue par le piégeage de la boue dans les interstices formés entre les fragments de gaine électrique. A la fin de ces expériences, le filtre anaérobie a été ouvert par le bas et des échantillons de boues et de supports ont été prélevés.

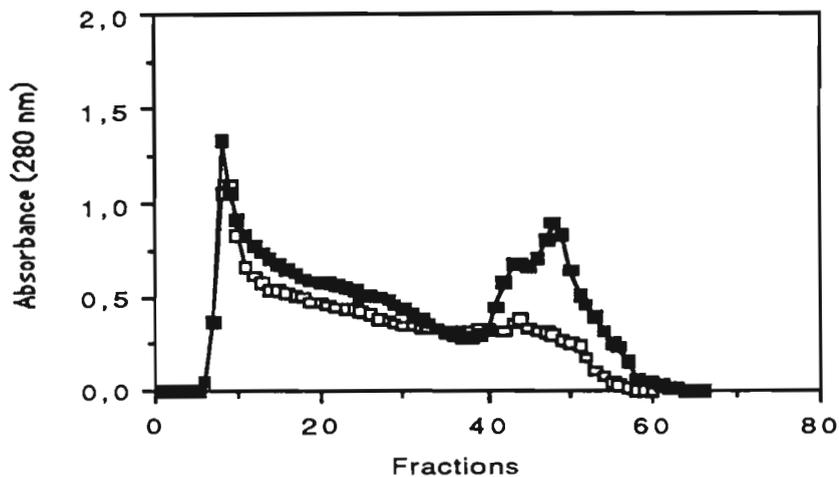


Figure 59: Profil d'élution sur Séphadex G 50 des margines avant (■) et après fermentation en filtre anaérobie (□).

La détermination de la concentration des MVS a montré qu'environ 20 % de la biomasse a été fixée, le reste étant piégé dans les interstices du support. La majorité de la biomasse a été retenue dans la moitié inférieure du filtre et la concentration des MVS totales était de 13,8 g/l.

L'analyse par microscopie en épifluorescence de la boue anaérobie acclimatée pour la méthanisation des margines préfermentées, a montré qu'elle renferme plusieurs espèces de bactéries méthanogènes appartenant aux genres *Methanobacterium*, *Methanococcus*, *Methanospirillum*, *Methanogenium* et *Methanosarcina*. Ces bactéries sont libres, ou bien sous forme de petits granules ou micro-agrégats comme le montre les photos de microscopie optique et à balayage (Planche 8).

Les performances obtenues lors de la deuxième étape sont reportées dans le tableau 29; elles sont inférieures à celles obtenues avec les margines préfermentées par *A. niger* (tableau 27).

Tableau 29 : Composition de l'alimentation et de l'effluent du lit fluidisé à boues activées.

| Caractéristiques (g/l) | Alimentation boues activées issue du filtre anaérobie | Effluent boues activées |
|------------------------|--|-------------------------|
| DCOt | 9,83 | 6,58 |
| DCOs | 9,48 | 5,27 |
| MS | 10,12 | 7,3 |
| MES | 0,5 | 1,87 |
| Nombre de bactéries | - | 10^6-10^7 |

L'abattement de la DCO, avant l'élimination de la biomasse bactérienne par décantation, n'est que de 30 %. A la sortie du décanteur, l'abattement de la DCO dépasse 50 %. Ce traitement aérobie augmente la concentration des MES par la bioconversion de polluants en biomasse bactérienne (10^7) facilement décantable en décanteur.

Le profil d'éluion sur G-50 de l'effluent du réacteur à boues activées (fig. 60) montre que la fraction responsable de la coloration noire a été plus ou moins concentrée par une sorte de polymérisation. Cette polymérisation peut résulter d'une oxydation chimique favorisée par le pH basique et l'aération ou (et) des activités des peroxydases bactériennes qui, en présence de radicaux libres et dans des conditions particulières, polymérisent les composés phénoliques. Le dosage de la lignine dans la fraction noire par la méthode de Klason (1880) a montré qu'elle semblerait contenir plus que 40 % de sa matière sèche de lignine.

Les observations microscopiques réalisées tout au long du fonctionnement de ce réacteur, ont montré que la boue évoluait et qu'il y avait apparition de nouvelles espèces bactériennes ainsi que des paramécies (planche 9). L'observation en microscopie à balayage des grains de support prélevés du lit fluidisé à boues activées traitant les margines méthanisées durant plus d'une année, a montré que ce support s'est montré efficace pour fixer les bactéries (tableau 27 - planche 10). Les photos des coques débarrassées de leurs bactéries par sonication, ont montré que leur surface a été légèrement modifiée par les activités lignocellulosiques des bactéries (planche 11).

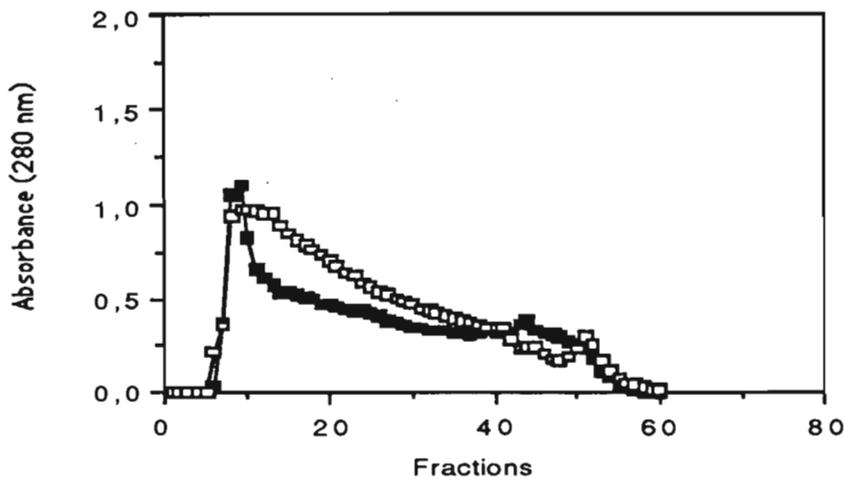


Figure 60: Profil d'élution sur Séphadex G 50 des margines avant (■) et après fermentation par boues activées (□).

4.4. Conclusions

Les traitements successifs des margines par les différents réacteurs ont permis de diminuer la charge en DCO de 93 %, avec production d'une biomasse sèche à 30 % de protéines et de biogaz à 80 % de méthane. Cependant, la coloration de la margine persiste et les composés à haut poids moléculaire, responsables de la couleur noire et qui sont en partie formés par la lignine, ont été peu modifiés. Ceci confirme que ces composés sont très difficilement biodégradables et non toxiques, par comparaison avec les composés dont le poids moléculaire est inférieur à 20000. Puisque ces margines traitées sont peu chargées en DCO et non toxiques par rapport aux margines brutes, elles peuvent être envisagées pour l'irrigation des terrains agricoles. En outre, la richesse de ces margines traitées en lignine de nature non élucidée, pourrait être un avantage si ce polymère pouvait amorcer le processus d'humification dans les sols irrigués par cet effluent.

5. Décoloration des margines traitées

Bien que la décoloration des margines ne nous semble pas nécessaire à cause de l'intérêt que peut présenter cette fraction noire riche en lignine, dans le processus d'humification des terrains irrigués par cet effluent, nous avons cependant étudié les possibilités de décoloration par voie physico-chimique et biologique.

5.1. Précipitation chimique des pigments noirs

Au pH basique qui correspond à celui des boues activées, les composés phénoliques responsables de la coloration noire des margines sont sous forme de phénates solubles. La précipitation de ces composés a donc été obtenue par l'addition de donneurs de protons comme l'acide sulfurique ou l'acide phosphorique, pour transformer ces phénates en acides phénoliques apolaires et provoquer ainsi leur précipitation.

Cette précipitation est en liaison directe avec le pH et peut s'expliquer par les constantes d'affinité (pK) de ces composés flocculés qui devraient se situer aux alentours de 3. L'élimination quasi-totale de la fraction noire est réalisée à des pH compris entre 1,5 et 3 comme le montre la fig. 61.

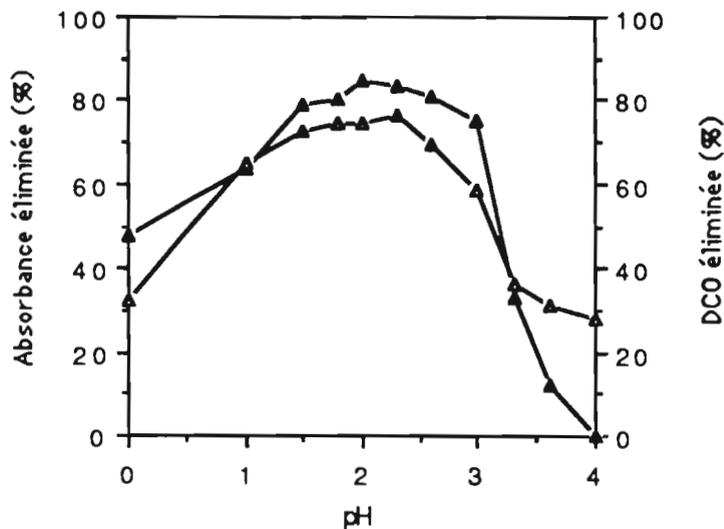


Figure 61: Effet du pH sur la précipitation des composés phénoliques à haut poids moléculaire (UV à 280 nm) (Δ) et sur la réduction de la DCO (▲).

La précipitation de ces composés à haut poids moléculaire se traduit par une décoloration entraînant une diminution de l'absorbance à 280 nm et une réduction de la DCO de 70 % (fig. 61 - tableau 30).

Tableau 30 : Composition de l'alimentation et de l'effluent de l'étape de précipitation

| Caractéristiques (g/l) | Effluent issu des boues activées | Effluent acidifié et centrifugé |
|------------------------|----------------------------------|---------------------------------|
| DCO | 6,58 | 1,54 |
| MS | 7,3 | 1,43 |
| MES | 1,8 | — |
| pH | 8,3 | 2,45 |

Selon que le donneur de protons soit l'acide sulfurique concentré ou l'acide phosphorique concentré, la concentration d'acide provoquant la précipitation est légèrement différente. En effet, La concentration d'acide sulfurique n'est que de l'ordre de 0,2 % (v/v), tandis que celle de l'acide phosphorique est d'environ 0,5 à 1 % (v/v) (fig. 62).

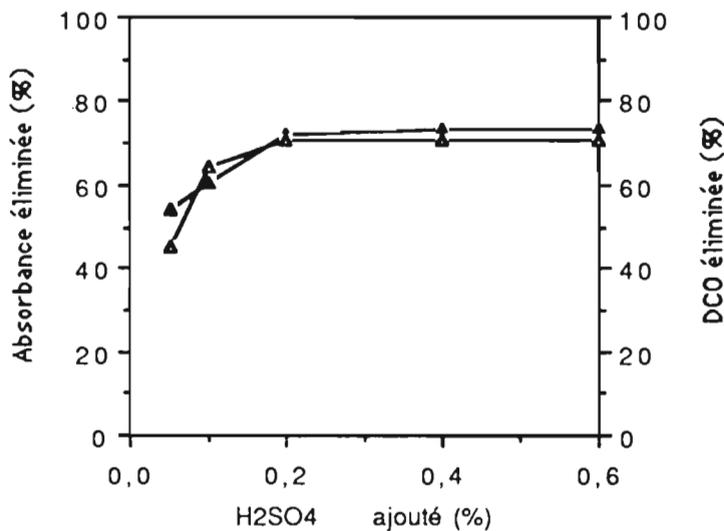


Figure 62: Effet de la concentration en acide sulfurique sur la précipitation des composés phénoliques à haut poids moléculaire (UV à 280 nm) (Δ) et sur la réduction de la DCO (▲).

Cette précipitation à des pH d'environ 2 est la même que celle obtenue avec les acides humiques dont le poids moléculaire dépasse les 100000 (Paul et Clark, 1989). Ceci nous laisse à penser que cette fraction noire est essentiellement formée de composés très proches des acides humiques. Ces derniers ont un grand intérêt agronomique pour la formation de complexes argilo-humiques dans les sols.

5.2. Dégradation des pigments noirs par *P. chrysosporium*

La décoloration biologique a été tentée par culture du champignon de la pourriture blanche, *P. chrysosporium*, qui s'est révélé capable de décolorer les margines (Perez *et al.*, 1987). Ce champignon est connu par son complexe enzymatique (peroxydases et oxydases) capable de dégrader la lignine (Buswell et Odier, 1987).

La décoloration des margines issues des trois étapes biologiques successives précédentes a été obtenue en cultivant *P. chrysosporium* pendant 4 j sur ces margines diluées de moitié par le milieu de culture optimisé par Sayadi (1990), en conditions stériles et statiques, et sous atmosphère d'oxygène pur. La croissance de ce champignon engendre une biomasse jaunâtre qui est éliminée par filtration: la réduction de la DCO est de l'ordre de 40 %. La couleur du filtrat est pratiquement la même que celle du surnageant obtenu après précipitation des pigments noirs par l'addition d'acide (Planche 3).

5.3. Comparaison des deux techniques de décoloration

L'élimination de la matière sèche et de la DCO a été plus importante dans le cas de la précipitation chimique, alors que la variation de coloration du noir au jaune a été la même pour les deux techniques. L'analyse par chromatographie sur gel de séphadex G-50 des margines issues des boues activées et traitées par l'addition d'acide phosphorique, a montré que les composés phénoliques du second groupe ont été en majorité éliminés (fig. 63). En ce qui concerne *P. chrysosporium*, il a également éliminé les polymères à haut poids moléculaire mais avec une efficacité moindre que la précipitation chimique.

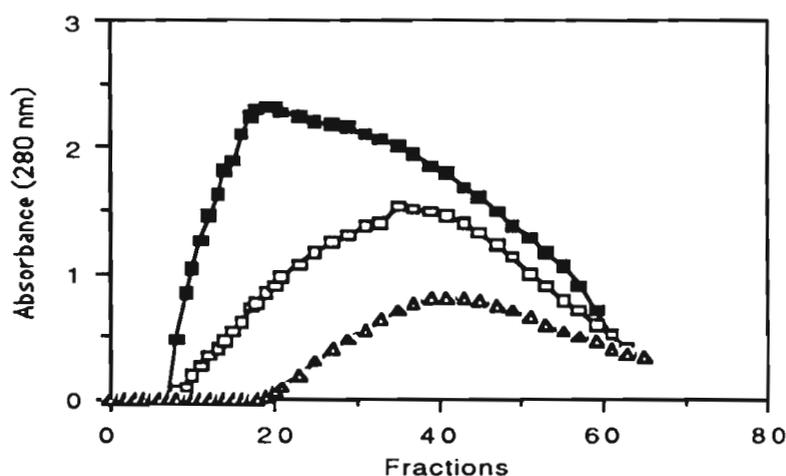


Figure 63: Profil d'élution sur Séphadex G-50 des margines issues des trois étapes biologiques (■), après précipitation (Δ) et après culture de *P. chrysosporium* (□).

Tampon: NaOH 0,1 N et LiCl 0,05 N.

L'analyse par chromatographie en phase gazeuse de l'effluent issu des boues activées, ne révèle pas la présence de monomères phénoliques à l'exception d'un composé dont le temps de rétention est de 7,6 min (fig. 64). L'analyse des margines obtenues après élimination de la coloration noire par précipitation, a montré une légère diminution de ce même composé. Par contre, dans le cas de l'élimination de ces pigments noirs par *P. chrysosporium*, ce composé a augmenté sans détection d'autres composés aromatiques, ce qui montre l'efficacité de ce champignon pour la minéralisation des monomères issus de ces pigments noirs.

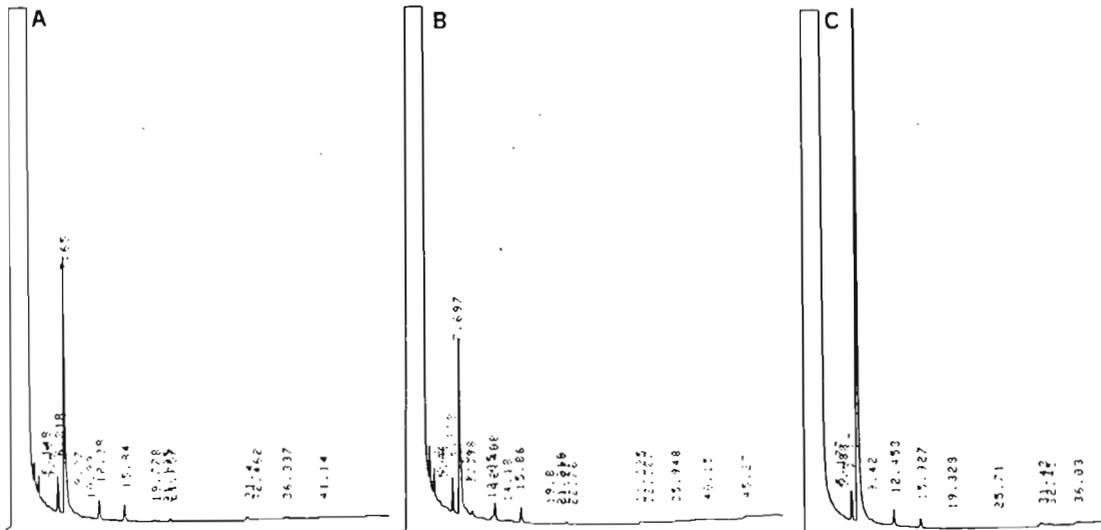


Figure 64: Chromatogramme en phase gazeuse des margines issues des trois étapes biologiques (A), après précipitation acide (B) et après culture de *P. chrysosporium* (C).

5.4. Conclusion

L'élimination des pigments proches des acides humiques et responsables de la coloration noire, par précipitation chimique s'est révélée plus efficace, plus rapide et plus facile à mettre en oeuvre que par la culture *P. chrysosporium*. Cependant cette opération nécessite l'addition d'acide, produit des quantités non négligeables de boues et engendre un effluent à pH acide. La décoloration de l'effluent issu des différentes étapes du procédé par *P. chrysosporium* semble être une voie prometteuse si nous arrivons à résoudre le problème de l'addition des sels et de la technologie de fermentation.

**6. Exploitation des résultats obtenus à
l'échelle du laboratoire pour la mise au point
d'un procédé de traitement biologique des
margines**

6.1. Analyse et discussion des résultats obtenus à l'échelle laboratoire

La discussion des performances et des contraintes de chaque étape du procédé mis au point au laboratoire, est indispensable pour prévoir les améliorations nécessaires afin de garantir le bon fonctionnement du procédé à plus grande échelle. Le tableau 31 résume les conditions opératoires et les performances des étapes biologiques étudiées.

Tableau 31: Conditions opératoires et performances des différents réacteurs utilisés.

| | Colonne à bulles | Filtre anaérobie | Boues activées |
|-------------------------------|------------------|------------------|----------------|
| <u>Conditions opératoires</u> | | | |
| Volume des réacteurs | 2 | 4,5 | 0,5 |
| TRH (j) | 3 | 7 | 7 |
| Température (°C) | 35 | 35 | 35 |
| pH | 5,5 | 7,8 | 8,2 |
| Aération (VVM) | 10 | - | 0,6 - 0,8 |
| Cv (g/l.j.) | - | 2,12 | 1,4 |
| <u>Performances</u> | | | |
| Δ DCO (%) | 58 | 60 | 50 |
| Δ MES (%) | 78,5 | 75 | - |
| Biomasse humide (g/l) | 103,5 | - | - |
| Biomasse sèche (g/l) | 20,4 | - | - |
| Biogaz (l/j) | - | 1,7 | - |
| Méthane (%) | - | 80 | - |

6.1.1. Fermentation en colonne à bulles

La fermentation en colonnes à bulles des margines par *A. niger* en culture discontinue a été facile à mettre en oeuvre. Cependant, des essais préliminaires de culture continue ont montré que la culture d'*A. niger* se transformait progressivement en culture bactérienne et qu'au fur et à mesure de l'arrivée de margines fraîches, ces bactéries étaient inhibées puis lessivées. La technique du feed-batch qui n'a pas été étudiée dans ce cas, pourrait être plus efficace que le système continu. Cette fermentation nécessite en moyenne 2,5 Kg/m³ de sulfate d'ammonium et 5 Kg/m³ de nitrate d'ammonium. Ces quantités ne sont pas

6.1. Analyse et discussion des résultats obtenus à l'échelle laboratoire

La discussion des performances et des contraintes de chaque étape du procédé mis au point au laboratoire, est indispensable pour prévoir les améliorations nécessaires afin de garantir le bon fonctionnement du procédé à plus grande échelle. Le tableau 31 résume les conditions opératoires et les performances des étapes biologiques étudiées.

Tableau 31: Conditions opératoires et performances des différents réacteurs utilisés.

| | Colonne à bulles | Filtre anaérobie | Boues activées |
|-------------------------------|------------------|------------------|----------------|
| <u>Conditions opératoires</u> | | | |
| V _R (l) | 2 | 4,5 | 0,5 |
| TRH (j) | 3 | 7 | 7 |
| Température (°C) | 35 | 35 | 35 |
| pH | 5,5 | 7,8 | 8,2 |
| Aération (VVM) | 10 | - | 0,6 - 0,8 |
| Cv (g/l.j.) | - | 2,12 | 1,4 |
| <u>Performances</u> | | | |
| ΔDCO (%) | 58 | 60 | 45 |
| ΔMES (%) | 78,5 | 75 | - |
| Biomasse humide (g/l) | 103,5 | - | - |
| Biomasse sèche (g/l) | 20,4 | - | - |
| Biogaz (l/j) | - | 1,7 | - |
| Méthane (%) | - | 80 | - |

6.1.1. Fermentation en colonne à bulles

La fermentation en colonnes à bulles des margines par *A. niger* en culture discontinue a été facile à mettre en oeuvre. Cependant, des essais préliminaires de culture continue ont montré que la culture d'*A. niger* se transformait progressivement en culture bactérienne et qu'au fur et à mesure de l'arrivée de margines fraîches, ces bactéries étaient inhibées puis lessivées. La technique du feed-batch qui n'a pas été étudiée dans ce cas, pourrait être plus efficace que le système continu. Cette fermentation nécessite en moyenne 2,5 Kg/m³ de sulfate d'ammonium et 5 Kg/m³ de nitrate d'ammonium. Ces quantités ne sont pas

négligeables et cet apport ne peut être envisageable que lorsque le produit de cette fermentation sera susceptible d'être valorisé. Des essais d'apport de ces sels par des effluents riches en azote comme les fientes de volailles, n'ont pas abouti. L'inoculum le plus efficace pour la culture du champignon a été la suspension de spores. Une aération de 10 VVM s'est révélée nécessaire pour ne pas limiter la croissance d'*A. niger*. Cependant, l'étude de l'aération à une plus grande échelle devra être complétée pour modéliser l'arrivée de l'air en fonction de la valeur de pO_2 .

6.1.2. Récupération de la biomasse fongique

La meilleure technique de récupération est sans aucun doute la filtration, à cause des concentrations élevées en biomasse humide obtenues qui peuvent atteindre les 200 g/l en fin de fermentation, et les propriétés rhéologiques des margines préfermentées; le filtre rotatif à tambour semble être le procédé le plus convenable. Une opération de séchage sera plus ou moins nécessaire selon la destination de cette biomasse. Le débouché le plus réaliste est son utilisation comme additif alimentaire pour le bétail. La biomasse d'*A. niger* cultivée sur margines a été testée en alimentation du bétail et a donné des résultats encourageants sans aucun risque d'intoxication (Vaccharino *et al.*, 1986). D'ailleurs Nefzaoui *et al.* (1982) ont montré que les pulpes d'olives qui forment les MES des margines, peuvent servir d'aliment sans risque d'intoxication car les composés phénoliques solubles sont récupérés dans la phase liquide.

6.1.3. Méthanisation des margines préfermentées

Malgré les résultats qui ont montré que les margines fermentées par *A. niger* pouvaient être méthanisées sans risque d'inhibition, notre filtre anaérobie a toujours fonctionné à faible charge à cause des problèmes de récupération du biogaz et d'approvisionnement par le même substrat. Ce filtre anaérobie pourra fonctionner à forte charge et avec des margines non diluées car il a pu être alimenté avec des margines fermentées à 30 g/l de DCO (diluées deux fois) sans détection d'AGV dans l'effluent (fig. 55). En outre, en se basant sur les charges massiques applicables à un tel réacteur (Henze et Harremoes, 1983; Verrier, 1984), les MVS accumulées sont de l'ordre de 13,8 g/l et peuvent permettre des charges volumiques de l'ordre de 10 g/l.j. En ce qui concerne la technologie, ce filtre anaérobie pourrait être remplacé à une plus grande échelle, par un réacteur à chicanes qui associe les avantages apportés par le lit de boues (UASB) et la fixation de la biomasse bactérienne (filtre anaérobie), surtout que la quasi-totalité des MVS retenues dans le filtre anaérobie étudié a été assurée par simple piégeage dans les interstices du support.

6.1.4. Post-traitement aérobie en lit fluidisé

Bien que le substrat soit essentiellement formé de composés très difficilement biodégradables, l'abattement de la DCO a été satisfaisant (50 %) et plusieurs améliorations peuvent être apportées:

- * La technologie actuelle ne peut pas être extrapolée à de grands volumes et surtout à des temps de séjour très longs. Ce réacteur pourrait être remplacé par une série de bassins de façon à atténuer les phénomènes de toxicité et permettre la sélection des différentes populations bactériennes performantes.

- * L'aération peut être réalisée par insufflation d'air au fond des bassins ou par montage d'un biodisque. Le choix de l'une ou l'autre de ces techniques devra s'effectuer après un calcul économique (coût des installations, amortissement et maintenance).

- * L'apport des margines fermentées par *A. niger* dans ces bassins devra s'échelonner pour améliorer les capacités dégradatives des bactéries en développant les phénomènes de co-métabolisme.

- * Il faudra implanter des champignons performants dans ces bassins pour améliorer la dégradation des composés responsables de la coloration noire.

L'élimination des composés phénoliques responsables de la coloration noire et qui ne semblent pas avoir un effet toxique sur les microorganismes, deviendrait obligatoire si les essais d'irrigation des sols par ces eaux noires se montraient néfastes. Si par contre, il s'avérait que ces eaux avaient un effet positif sur le processus d'humification, le procédé se limiterait aux trois étapes décrites.

6.2. Critères d'extrapolation de l'installation de laboratoire à une installation pilote

Après avoir démontré la faisabilité technologique de cette nouvelle conception de dépollution biologique des margines, la réalisation de ces expériences à une échelle pilote est indispensable pour perfectionner ce procédé. La réalisation de cette extrapolation doit tenir compte des spécificités de chaque opération à chaque échelle. En effet, il est plus facile d'extrapoler les digesteurs que les fermenteurs aérobies car ces derniers se heurtent aux problèmes de transfert d'oxygène et d'évacuation de chaleur. L'extrapolation de la colonne à bulles peut se faire avec $K_L a$ (Vg) et géométrie constante (Aiba *et al.*, 1973). En effet, Smith et Greenshields (1974) ont montré que le transfert d'oxygène et l'homogénéisation du contenu de la colonne à bulles peuvent être assurés par la simple aération jusqu'à des diamètres

importants, à condition de maintenir le rapport hauteur de la colonne sur diamètre égal à 10. En ce qui concerne l'évacuation de la chaleur de fermentation, Far (1967) et Mashelkar (1970) (cités par Smith et Greenshields, 1974) ont montré que lorsque les conditions d'homogénéisation sont bonnes, la chaleur de fermentation produite jusqu'à des vitesses très élevées (28 Kcal/l.h) peut être éliminée par la seule utilisation d'une double enveloppe jusqu'à des volumes de fermenteur de 45 m³. Au delà de cette taille, l'addition de tubes verticaux ou de serpentins devient indispensable.

Les performances des digesteurs sont rarement limitées par le transfert de matière car les bactéries anaérobies impliquées ont des taux de croissance relativement faibles (Henze et Harremoes, 1983). En outre, dans certains cas, le maintien des bactéries fermentatives à des taux de croissance très faibles, est nécessaire pour assurer la stabilité du processus global de méthanisation. En ce qui concerne les fermenteurs à lit fixé où il n'y a pas d'agitation, la production de quantités importantes de biogaz provoque une bonne homogénéisation, proche de celle des fermenteurs infiniment mélangés (Hall, 1982). En ce qui concerne les vitesses ascensionnelles du liquide dans les régimes d'alimentation ascendants, elles dépendent de la nature de la boue retenue dans le réacteur et de ses propriétés de décantabilité dans le cas des lits de boues (Lettinga *et al.*, 1980), ainsi que de la porosité du support dans le cas du filtre anaérobie pour éviter les chemins préférentiels (Young et Dahab, 1983). Le problème majeur des grandes installations de biométhanisation réside dans la distribution du liquide à l'entrée du digesteur. Par exemple pour le procédé UASB, les points d'alimentation qui sont dispersés au fond du digesteur à raison de 0,5 à 5 buses par m², dépendent de la densité de la boue dans les réacteurs, de son état granulaire ou flocculant et des charges volumiques appliquées (Lettinga et Hulshoff, 1990).

Moyennant ces considérations, l'extrapolation des réacteurs de laboratoire en réacteurs pilotes a été réalisée en maintenant la géométrie presque constante tout en tenant compte de certains rapports de dimension cités dans la littérature; la taille a été multipliée par un facteur de 100 pour la colonne à bulles et de 350 pour le filtre anaérobie. En ce qui concerne les boues activées, elles seront réalisées dans une série de bassins aérés dont le volume total sera 2 à 3 fois plus grand que celui du digesteur de manière à assurer un traitement en continu sans recours à des bassins tampons.

6.3. Description de l'installation pilote de dépollution biologique des margines proposée

Le schéma de l'installation est donné sur la fig. 65.

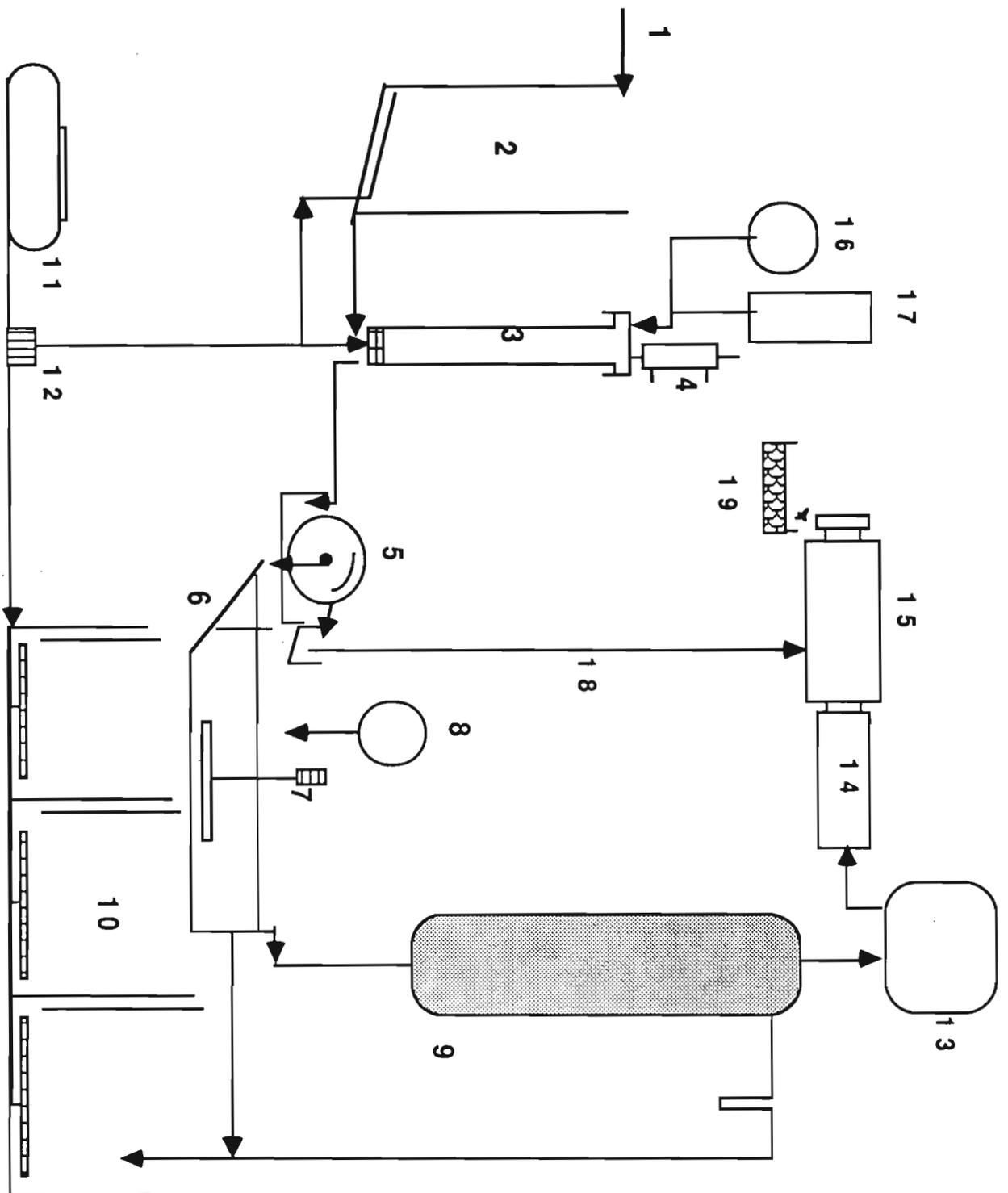


Figure 65: Schéma de l'installation pilote de dépollution biologique des margines proposée.
 1: Arrivée des margines, 2: Bac d'alimentation, 3: Colonne à bulles, 4: condenseur, 5: Filtre rotatif, 6: Bac de correction de pH, 7: Agitateur, 8: Réservoir à chaud, 9: Filtre anaérobie, 10: Bassins à boues activées, 11: Compresseur, 12: Distribution d'air, 13: Stockage des gaz, 14: Brûleur, 15: Séchoir à tambour, 16: Sels, 17: Inoculum, 18: Biomasse humide, 19: Biomasse sèche.

Cette installation pilote pourrait être testée soit au sein d'une huilerie appartenant à un organisme public soit sur la station d'épuration des eaux usées de Sfax où les margines de la ville sont collectées. Cependant, la deuxième alternative semble la plus raisonnable car ce projet va concerner tous les industriels de la région et la tradition de ramener les margines à la station est déjà bien établie.

6.2.1. Bac de standardisation des margines

Ce bac de 1 m³ de volume permettra de collecter des margines de tous les camions-citernes arrivant à la station pour préparer des margines représentatives de celles qui sont rejetées dans les bassins d'évaporation. Ces bassins ne peuvent pas servir de bac d'alimentation car il y a évolution et concentration des margines lors des processus physiques d'évaporation et d'infiltration des margines, des processus biologiques d'altération et des réactions physico-chimiques d'oxydation et de polymérisation des polyphénols. Ce bac devra être aéré pour éviter la formation d'odeurs indésirables et la chute du potentiel rédox.

6.2.2. Préparation de l'inoculum

La culture d'*A. niger* sur margines gélosées a montré qu'il faut en moyenne récolter les spores obtenues sur 10 cm² de culture pour inoculer 1 l de margines (1 m²/m³). Cette production de spores ne pose pas de problèmes dans la mesure où cette culture en surface peut se faire avec des margines additionnées de sulfate et de nitrate d'ammonium, non stériles et non gélosées mais simplement étalées sur 0,5 cm de hauteur.

6.2.3. Fermentation en colonne à bulles

Le volume de la colonne à bulles est de 250 l, avec une hauteur de 2,5 m et un diamètre interne de 0,37 m. Après avoir rempli la colonne à bulles avec les margines, les sels et la suspension de spores sont ajoutés, et l'aération est mise en route. Au cours de cette fermentation, le pH n'est pas contrôlé et la température est maintenue à 35 °C. La chaleur de fermentation est utilisée pour le chauffage des autres réacteurs dont les réactions sont peu exergoniques.

En fin de fermentation, la vanne de vidange est ouverte et les margines fermentées sont pompées vers le système de filtration.

6.2.4. Filtration et séchage de la biomasse

La filtration ne fonctionne qu'au moment de la vidange du fermenteur. La taille du filtre rotatif à tambour sous vide devrait permettre d'obtenir un temps de filtration le plus court possible et avoir également un temps de vidange très court. Cette filtration engendre une biomasse humide à 20 % de matière sèche. Le séchage de la biomasse nécessitera une chaleur qui sera produite par la combustion du biogaz issu de l'étape de méthanisation. L'évaporation d'1 Kg d'eau nécessite un apport de chaleur égal à 540 Kcal, ce qui correspond à la combustion de l'ordre de 100 l de biogaz.

6.2.5. Méthanisation en HAUSBUFF

Le volume total du digesteur est fixé aux alentours de 2 m³. Pour éviter que ce digesteur soit trop haut et pour maintenir la propriété de piston du filtre anaérobie, il sera conçu en trois compartiments cubiques qui communiquent de façon gravitaire. Les margines fermentées et filtrées sont collectées dans un bac agité avec correction de pH par de la chaux. Des recyclages d'effluent du HAUSBUFF ou des boues activées pourront être effectués dans ce bac de correction de pH pour remonter le pH ou diluer le substrat en cas de manque de margines. Le mode d'alimentation retenu est ascendant et séquentiel. Les capacités calorifiques du biogaz sont situées entre 5000 et 8000 Kcal/m³ suivant le pourcentage de méthane. Le méthane produit peut être transformé en énergie électrique qui pourrait servir à faire fonctionner le filtre rotatif ou les systèmes d'agitation, sachant que 1 m³ de biogaz peut produire 2 à 3 KWh.

6.2.6. Post-traitement des margines méthanisées en boues activées

Les margines issues de la méthanisation sont directement introduites dans le bassin des boues activées. Le temps de séjour sera fixé de façon à épuiser au maximum les composés phénoliques des margines et ainsi limiter leur effet polluant pour l'environnement. Ce bassin est formé de trois compartiments; l'aération sera fixée selon les activités bactériennes de chaque compartiment. Pour rapprocher ce post-traitement d'un réacteur piston, chaque compartiment sera muni d'un système de décantation interne afin de sélectionner des bactéries performantes et résistantes aux composés phénoliques.

6.4. Conclusions

Les essais de traitement des margines au stade du laboratoire avec une étape de prétraitement par *A. niger*, une étape de biométhanisation et une étape de post-traitement en boues activées, ont montré l'efficacité et la faisabilité technique de ce procédé. Pour confirmer ces performances obtenues et démontrer la faisabilité technologique de chaque étape sur une plus grande échelle, l'expérimentation à une échelle pilote devient une nécessité de premier ordre. Les résultats obtenus avec une telle installation pilote constitueront également une base de données très utile pour l'évaluation économique du futur procédé industriel.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les margines comprennent deux fractions, l'une insoluble est essentiellement constituée de pulpes d'olives, l'autre soluble et contient les sucres, les lipides, les acides organiques et les composés phénoliques. L'élimination des matières en suspension est difficile par filtration car le gâteau formé par les pulpes d'olive n'est pas perméable.

Les composés phénoliques présents dans les margines sont de deux types et déterminent leur couleur. Les premiers de poids moléculaire inférieur à 20000 donnent la coloration rouge et correspondent aux tanins, anthocyanes, oligomères et monomères phénoliques. Les seconds responsables de la coloration noire ont un poids moléculaire supérieur à 20000.

Des études de toxicité et de biodégradabilité de ces margines ont montré que la toxicité est due à la fraction soluble et que les composés phénoliques de type tanins, anthocyanes et monomères aromatiques sont très toxiques mais biodégradables. Par contre, les composés phénoliques responsables de la coloration noire sont peu toxiques et très difficilement biodégradables.

L'amélioration de la biodégradabilité des margines a été réalisée par l'emploi d'*A. niger* qui est facilement cultivable et capable de métaboliser une bonne partie des composés phénoliques. La croissance d'*A. niger* sur les margines additionnées de sulfate et d'azote s'effectue essentiellement au dépens des sucres; elle s'accompagne de la biodégradation des pectines qui libère du méthanol dans le milieu, et des monomères et polymères phénoliques de type tanins et anthocyanes pour libérer certains monomères phénoliques comme l'acide gallique. La colonne à bulles convient parfaitement pour la croissance de ce champignon sur margines. Les margines fermentées par *A. niger* sont très facilement filtrables comparées aux margines brutes, à cause du piégeage des pulpes d'olives par le mycélium et de la bioconversion de certains composés comme les pectines et les mucilages. Après élimination de la biomasse par filtration, l'abattement de la DCO se situe entre 50 et 60 % suivant la fraîcheur des margines et leur contenu en MES. La biomasse récupérée est enrichie de près de 30 % en protéines.

La méthanisation en batch a montré que ces margines préfermentées sont moins toxiques et plus biodégradables que les margines brutes, grâce à l'élimination de certains produits toxiques pour les bactéries méthanogènes et la bioconversion de plusieurs composés en d'autres plus facilement fermentescibles. En outre, le méthanol produit par *A. niger* stimule l'activité des bactéries méthanogènes acétoclastes. La méthanisation en digesteurs de ces margines préfermentées a montré que le filtre anaérobie garni de fragments de gaine électrique comme support bactérien, s'est révélé le plus performant; les margines peuvent être méthanisées sans problèmes de toxicité. Ce digesteur a démontré une bonne stabilité et une vitesse de démarrage rapide. Les rendements en méthane / g de DCO dégradé ont été proches des valeurs théoriques et les réductions de DCO se sont situées entre 60 et 80 % selon le contenu

du substrat en MES. La détermination des MVS au sein du filtre anaérobie a montré que plus de 80 % des boues ont été retenus par simple piégeage dans le support bactérien et que leur concentration dans la moitié inférieure du filtre anaérobie a été de l'ordre de 13 g/l.

L'effluent issu du filtre anaérobie est directement traité par les boues activées en lit fluidisé. Les coques d'olives utilisées comme support bactérien ont démontré une surface spécifique très élevée, une bonne fixation bactérienne et aucune détérioration de leur structure. L'abattement de la DCO lors de cette étape a été de l'ordre de 50 %.

Les traitements successifs des margines par les trois voies biologiques du procédé conçu, ont réduit la DCO de plus de 90 %; cependant, la coloration noire des margines a persisté à cause de la faible biodégradabilité des composés responsables de cette coloration et de leur richesse en lignine (40 %).

Cette coloration noire a pu être éliminée par la biodégradation de ces composés phénoliques soit en cultivant *P. chryso sporium*, soit par précipitation chimique en abaissant le pH aux alentours de 2 par addition de 2 % (v/v) d'acide sulfurique concentré. Chacune de ces techniques de décoloration a ses avantages et ses inconvénients et le choix dépendra de l'utilité de chacun des produits de ces opérations.

Cette coloration noire due à une forme particulière de lignine, proche des acides humiques, ne nous semble pas néfaste pour l'environnement et peut par contre, servir comme amorce du processus d'humification si on utilise ces margines traitées pour l'irrigation. Cependant, des études complémentaires devront être effectuées pour confirmer ou rejeter ces hypothèses.

Une installation pilote de dépollution biologique des margines a été proposée pour confirmer les résultats obtenus, tester la faisabilité de ce processus biologique à une échelle plus grande et servir de modèle pour le calcul économique d'une installation industrielle. Quand ce procédé aura démontré sa fiabilité, la réalisation d'une installation industrielle pourra alors résoudre le problème de la pollution des margines rencontré dans la ville de Sfax tout en produisant annuellement environ 6000 t de biomasse enrichie de 30 % de protéines. Le méthane produit par l'étape de méthanisation, moyennant le contrôle de certains paramètres comme les températures de fermentation et le temps de séjour dans le filtre anaérobie, pourra rendre le procédé autonome sur le plan énergétique.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aiba S., Humphrey A.E., Millis N.F. (1973) *Biochemical engineering*. Second edition. Academic Press Inc. NewYork, London. 443 p.
- Albagnac G., Touzel J.P., Morfaux J.N. (1981) Epuration par fermentation méthanique des effluents de conserverie de légumes. *Trib. Cebedeau*. 455, 11 - 420.
- Amoretti M.C., Comet G. (1985). *Le livre de l'olivier*. EDISUD.
- Anderson J.G., Blain J.A., Marchetti P., Todd J.R. (1981) Processing of model dilute carbohydrate wastes using *Aspergillus niger* in disc fermenters. *Biotechnol. Lett.*, 8, 451 - 454.
- Anderson J.J., Dagley S. (1980) Catabolism of aromatic acids in *Trichosporon cutaneum*. *J. Bacteriol.*, 141, 534 - 543.
- Anderson G., Donnelly T., Rippon G. M. (1977) Digestion anaerobia de aguas residuales industriales. *Actas I. Congreso Nacional de Quimica*, Vigo. 549 - 565.
- Andreoni V., Ferrari A., Ranali G., Sorlini C. (1986) The influence of some phenolic acids present in oil mill waters on microbial groups for the methanogenesis. *Simposio Internacional sobre Valorizacion de los subproductos del olivar: alpechin y orujo*. 5-6-7 Marzo, Sevilla-Espana, 11 - 12,
- Antonacci R., Brunetti A., Rozzi A., Santori M. (1981) Trattamento anaerobico di acque di vegetazione di frantoio. I. Risultati preliminari. *Ingegneria Sanitaria*, 6, 257-62.
- Aunstrup K. (1979) Microorganisms as producers of industrial enzymes. *APRIA*, 3, 77 - 96.
- Balba M.T., Evans W.C. (1979) The methanogenic fermentation of phenylalkane carboxylic acids. *Biochem. Soc. Trans.* 7, 403 - 405.
- Balch W.E., Fox G.E., Magrum L.G., Woese C.R., Wolfe R.S. (1979) Methanogens, reevaluation of a unique biological group. *Microbiol. Rev.* 43, 260 - 296.
- Balice V., Boari G., Cera O., Abbaticchio P. (1982) Indagine analitica sulle acque di vegetazione. Nota 1. *Inquinamento* 7, 49 - 53
- Balice V., Carrieri C., Cera O., Rindone B. (1988) The fate of tannin-like compounds from olive mill effluents in biological treatments. In: Hall ER and Hobson PN (eds) *Proceedings of the Fifth International Symposium on Anaerobic Digestion*, Bologna, Italy, 275 - 280
- Balice V., Cera O. (1984) Acidic phenolic fraction of the juice of olives determined by gas chromatographic method. *Grasas y Aceites*. 25, 178 - 180
- Batista U., Giorgio D. (1988) Trattamento delle Acque reflue di frantoio. In *Acque reflue dei frantoio oleari*. Academic nazionale delle'Oleari, Spoleto, 29 Aprile, 4 - 63.
- Belaich J.P. (1981) Aspects fondamentaux de la fermentation de la cellulose. In 2ème colloque international de Technologie de l'AUPELF : valorisation énergétique des végétaux et des sous-produits animaux dans les zones rurales africaines. *LOME*, 14 - 20 Janvier 1981.
- Benjamin, M.M., Woods S.L. and Ferguson J.F. (1984) Anaerobic toxicity and biodegradability of pulp mill waste constituents. *Water Res.* 18, 601 - 607.
- Betts W.B., Dart R.K. (1988) The degradation of lignin-related compounds by *Aspergillus*

flavus. J. Gen. Microbiol., 134, 2413 - 2420.

- Bloom H, Thomassen MS (1985) Kinetic studies on strawberry anthocyanin hydrolysis by a thermostable anthocyanin- β -glucosidase from *Aspergillus niger*. Food Chem 17, 157 - 168
- Boari G., Brunetti A., Passino R., Rozzi A. (1984) Anaerobic digestion of olive oil mill wastewaters. Agric. wastes 10, 161 - 175.
- Bonastre N., Paris J.M. (1988) Survey of laboratory, pilot, and industrial anaerobic filter installations. Process Biochem., february, 15 - 20.
- Boone D.R., Bryant M.P. (1980) Propionate-degrading bacterium, *Syntrophobacter wolinii* sp. nov. gen. nov., from methanogenic ecosystems. Appl. Env. Microbiol. 40, 626 - 632.
- Brauman A. (1989) Etude du métabolisme bactérien de termites supérieures à régimes alimentaires différenciés. Thèse de l'Université de Pharmacie, Aix-Marseille II.
- Braun R., Huss S. (1982) Anaerobic digestion of distillery effluents. Process Biochem. July / august, 25 - 27.
- Brown G.J., Lin K.C., Landine R.C., Cocci A.A., Viraraghavan T. (1980) Lime use in anaerobic filters. J. Env. Eng. Div. 106, 837 - 840.
- Bryant M.P., Campbell L.L., Reddy C.A., Crabill M.R. (1977) Growth of *Desulfovibrio* in lactate or ethanol media low in sulfate in association with H_2 utilising methanogenic bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 33, 1162 - 1169.
- Bryant M. P., Wolin E. A., Wolin M. J., Wolfe R. S. (1967) *Methanobacillus omelianskii* a syntrophic association of two species of bacteria. Arch. Microbiol., 59, 20 - 31.
- Buswell J, Odier E. (1987) Lignin biodegradation. CRC. Crit. Rev. Biotechnol. 1 - 60.
- Cabello L., Fiestas Ros de Ursinos, J.A. (1981) Différentes utilisations des margines. In Proc. of Séminaire international sur la valorisation des sous-produits de l'olivier . FAO. Tunisie. Décembre.
- Cheesman P., Toms-Wood A., Wolfe R.S. (1972) Isolation and properties of a fluorescent compound, factor 420, from *Methanobacterium* strain MoH, J. Bacteriol. 112, 527 - 531.
- Chou W.L., Speece R.H., Siddiqi R.H., Mckeon K. (1978) The effect of petrochemical structure on methane fermentation toxicity. Prog. Wat. Tech. 10, 545 - 558.
- Cichelli A., Solinas M. (1984) I composti fenolici delle olive e dell'olio di oliva. Riv. Merceol. 23:55-69.
- Clark F.M., Fina L.R. (1952) The anaerobic decomposition of benzoic acid during methane fermentation. Arch. Biochem. Biophys. 36, 26 - 32.
- Cohen A. (1983). Two-phase digestion of liquid and solid wastes. Proc. 3rd Int. Symposium on Anaerobic Digestion, Boston (USA), 123-138.
- Colberg P.J., Young L.Y. (1982). Biodegradation of lignin-derived molecules under anaerobic conditions. Can. J. Microbiol., 28, 886 - 889.

- Cooper C.M., Fernstrom G.A., Miller S.A. (1944) Gaz-liquid contractors. *Ind. Engin. Chem.*, 36, 504 - 509.
- Cord-Ruwisch R. (1987) Contribution à l'étude du métabolisme de l'hydrogène par les bactéries anaérobies. Thèse de doctorat, Université de Provence, Aix-Marseille I.
- Couplet P., Albagnac G. (1978) La digestion anaérobie-application aux industries agro-alimentaires. *Ann. Technol. Agri.*, 27, 533 - 564.
- Crawford D.L., Pometto A.L., Crawford R.L. (1983) Lignin degradation by *Streptomyces viridisporus*: Isolation and characterisation of a new polymeric degradation intermediate. *Appl. Environ. Microbiol.*, 45, 898 - 904.
- Dagley S. (1983) Microbial degradation of aromatic compounds. In proc. of the fortieth general meeting of the society for industrial microbiology, August 14-19. Florida, USA.
- Dagot C. (1988) Modélisation de la digestion anaérobie de substrats solubles: application à la méthanisation du lactose. Thèse INPL, Nancy.
- De Meo M., Laget M., Phan-Tan-Luu R., Mathieu D., Dumenil G. (1985) Application des plans d'expériences à l'optimisation des milieux et des conditions de culture de fermentation. *Biosciences*, 4, 99 - 102.
- Demeyer D.I., Henderickx H.K. (1967) The effect of C₁₈ unsaturated fatty acids on methane production *in vitro* by mixed rumen bacteria. *Biochim. Biophys. Acta.*, 137, 484 - 497.
- Dolfing J. (1985) Kinetics of methane formation by granular sludge at low substrates concentrations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 22, 77-81.
- Dubourguier H.C., Touzel J.P., Albagnac G. (1982) Progrès récents en méthanogenèse. 6ème Réunion des Microbiologistes de l'INRA, document INRA. 33-58.
- Dwyer D.F., Krumme M.L., Boyd S.A., Tiedje J.M. (1986) Kinetics of phenol biodegradation by an immobilized methanogenic consortium. *Appl. Environ. Microbiol.*, 47, 850 - 857.
- Ercoli E., Ertola R. (1983) SCP production from olive black water. *Biotechnol. Lett.*, 7, 457 - 462.
- Euzen J.P. (1980) Performances de fermenteurs gazosiphon. Colloque Soc. Fr. Microbiol., Toulouse, 71 - 94.
- Fernandez Diaz M.J. (1983) Olives. In Rehm HJ, Reed G (eds) *Biotechnology*, vol. 5. Verlag Chemie, Weinheim, pp 379 - 397.
- Ferry J.G., Wolfe R.S. (1976) Anaerobic degradation of benzoate to methane by a microbial consortium. *Arch. Microbiol.* 107 : 33-40.
- Field J.A., Lettinga G. (1987) The methanogenic toxicity and anaerobic degradability of a hydrolysable tannin. *Wat. Res.* 20, 367 - 374.
- Fiestas Ros de Ursinos, J.A. (1981) Différentes utilisations des margines. In Proc. of Séminaire international sur la valorisation des sous produits de l'olivier . FAO. Tunisie. Décembre.
- Fiestas Ros de Ursinos J.A., Navarro Gamero R., Leon Gabello R., Garcia Buendia A.J.,

- Maestrojuan Saez de Jauragui G.M. (1982 a) Depuracion anaerobia del alpechin como fuente de energia. *Grasas y Aceites.*, 33, 265 - 270.
- Fiestas Ros de Ursinos J.A., Garcia A.J., Leon R., Maestrojuan G. (1982 b) Energy production in the olive oil industry from biomethanisation of its effluents. *Food Ind. Environ.*, 9, 163 - 172.
- Fiestas Ros de Ursinos J.A. (1986) Posibilidades de utilizacion del alpechin como fertilisante. Simposio Internacional sobre Valorizacion de los subproductos del olivar: alpechin y orujo. 5-6-7 Marzo, Sevilla-Espana,48,
- Fleeming H.P., Etchells J.C. (1967) Occurrence of an inhibitor of lactic acid bacteria in green olives. *Appl. Microbiol.*, 15, 1187 - 1192.
- Ghosh S. (1972) Anaerobic processes. Literature Review. *WPCF*, 44, 948 - 958.
- Gibriel A.Y., Mahmoud R.M., Goma M. and Abou-Zeid M. (1981) Production of single cell protein from cereal by-products. *Agricultural Wastes*, 3, 229 - 240.
- Giulietti A.M., Ercoli E., Ertola R. (1984) Purification and utilization of olive black water and distillery slops by microbial treatment. *Acta Cient Venez* 35, 76 - 86.
- Grbic-Galic, D., Young L.Y. (1985) Methane fermentation of ferulate and benzoate : anaerobic degradation pathways. *Appl. Environ. Microbiol.*, 50, 292 - 297.
- Hackett W.F., Connors W.J., Kirk T.K., Zeikus J.G. (1977) Microbial decomposition of synthetic ¹⁴C-labeled lignins in nature. *Appl. Environ. Microbiol.*, 33, 43 - 51.
- Hall E.R. (1982) Biomass retention and mixing characteristics in fixed-film and suspended growth anaerobic reactors. In : *IAWPR-Specialized seminar on anaerobic treatment*, Copenhagen, Denmark.
- Hanaki K., Nagase M. (1981) Mechanism of inhibition caused by long-chain fatty acids in anaerobic digestion process. *Biotechnol. Bioeng.*, 23, 1591-610.
- Hanson N.G., Molin N. (1981) End product inhibition in methane fermentations: effect of carbon dioxide on fermentation and acetogenic bacteria. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 13, 242 - 247.
- Healy J.B., Young L.Y. (1978) Anaerobic biodegradation of eleven aromatic compounds to methane. *Appl. Environ. Microbiol.*, 38, 84 - 89.
- Henderson C. (1971) A study of the lipase produced by *Anaerovibrio lipolytica*, a rumen bacterium. *J. Gen. Microbiol.* 65, 81 - 89.
- Henze M., Harremoes P. (1983) Anaerobic treatment of wastewater in fixed film reactors. A literature review. *Wat. Sci. Tech.* 15, 8/9, 1-101.
- Hobson P.N., Bousfield S., Summers R. (1981) The microbiology and biochemistry of anaerobic digestion. In *Methane production from agricultural and domestic wastes*. Applied Science Publishers. 10 - 51.
- Hobson P.N., Mann S.O. (1961) The isolation of glycerol fermenting and lipolytic bacteria from the rumen of the sheep. *J. Gen. Microbiol.* 25, 227 - 240.

- Hobson P.N., Shaw B.G. (1971) The role of strict anaerobes in the digestion of organic material. *Microbial Aspect of Pollution*. Acad. Press. London, 103 - 121.
- Hungate R.E. (1969) A roll-tube method for cultivation of strict anaerobes. In: *Methods in Microbiology*. Vol., 3B, R. Norris and D.W. Ribbons (Eds). Academic press Inc. (Pub.) London, New-York, 117 - 132.
- Ikeda Y., Takahashi E., Yokogama K., Yoshimora Y. (1972) Screening for microorganisms producing gallic acid from chinese and tara tannins. *J. Ferment. Technol.* 50, 361 - 370.
- Joung J.J., Blaskovitz R.J., (1984) Role of ammonium nitrate in morphological differentiation of *Aspergillus niger* in a submerged culture. In *Proc. of the Forty-First General Meeting of the Society for Industrial Microbiology*, August 12 - 17, Fort Collins, Colorado.
- Kaiser J.P., Hanselmann K.W. (1982) Fermentative metabolism of substituted monoaromatic compounds by a bacterial community from anaerobic sediments. *Arch. Microbiol.*, 133, 185 - 194.
- Keith C.L., Bridges R.L., Fina L.R., Iverson K.L., Cloran J.A. (1978) The anaerobic decomposition of benzoic acid during methane fermentation. *Arch. Microbiol.* 118, 173 - 176.
- Khan K.A., Suidan, M.T., Cross, W.H. (1981) Anaerobic activated carbon filter for the treatment of phenol bearing wastewaters. *WPCF.* 53, 1519 - 1532.
- Kieslich K. (1976) *Microbial transformations of non-steroid cyclic compounds*. John Wiley and Sons Georg Thieme publishers, 1262 pp.
- Kirk T.K. (1984) Degradation of lignin. In Gibson D.T. (ed). *Microbial degradation of organic compounds*. Marcel Dekker, New york.
- Kim J.H., Lebault J.M. (1980) Comportement rhéologique des cultures de champignons. *Colloque Soc. Fr. Microbiol.*, Toulouse, 119 - 134.
- Klason (1880) Bericht der vereins der papier und zellstoffchemiker, 52 - 53. Cité dans la "chimie du bois" par Hawley et Wise (1931); traduit par Barry ED. Dunod, Paris, 174 - 185.
- Knechtel R.J. (1978) A more economical method for the determination of chemical oxygen demand. *Water Pollut Control* May/June, 25 - 29.
- Koster I.W., Cramer A. (1980) Inhibition of methanogenesis from acetate in granular sludge by long-chain fatty acids. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 403 - 409.
- Kroeker E.J., Schulte D.D., Sparling A.B., Lapp H.M. (1979) Anaerobic treatment process stability. *J. Water Pollut. Control Fed.* 51, 718 - 727.
- Labit C. (1981) Etude d'un bioréacteur où la mise en contact avec l'oxygène est assuré au sein d'un venturi; applications aux fermenteurs et au traitement des eaux. Thèse III cycle, UTC Compiègne, France.
- Lovan C.R., Foree E.G. (1972) The anaerobic filter for the treatment of brewery press liquor waste. *Brewers Digest.* 47, 66 - 73.

- Le Ruyet P., Dubourguier H.C., Albagnac G. (1984) Thermophilic fermentation of cellulose and Xylan by Methanogenic Enrichment Cultures: Preliminary Characterization of Main Species. Syst. Appl. Microbiol. 5, 247 - 253.
- Lettinga, G., Van Velson, A. F. M., Iobma, S. W., de Zeeuw, W. & Klapwijk A. (1980) Use of the upflow sludge blanket (USB) reactor concept for biological wastewater treatment, especially for anaerobic treatment. Biotech. Bioeng. 222, 699 - 734.
- Lettinga G., Hulshoff P.L.W. (1990) Design and operational experiences with the UASB-Process. Serie de conferencias sobre tratamiento anaerobio de aguas residuales en america latina. 8 y 9 de noviembre, 47 - 65.
- Macris B.J., Kekos D., Galioutou P.M. (1987) Updegrading of toxic phenolic carbon sources to biotechnological products with *Calvatia gigantea*. Abstract of Proc 4th European Congress on Biotechnol., Vol. 2. Neijssel O.M., Van Der Meer R.R., Luyben K.Ch.A.M. (Eds). Elsevier Science Publishers. Amsterdam.
- Makasinova S.Y., Martakov A.A. (1982) Assimilation of phenolic compounds by fungi of the genus *Aspergillus*. Tr In-Ta Mikrobiol Ivirusol AN Kazssr 27, 30 - 36.
- Mangel G., Villermaux J., Prost C. (1980) Methane production under Pressure by fermentation of waste material. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 9, 79 - 81.
- Marchand A. (1983) Contribution à l'étude de la digestion anaérobie. Utilisation de souches méthanogènes dans la fermentation méthanique de déchets d'élevage Thèse INPL, Nancy.
- Marshall K.C., Alexander M. (1960) Growth characteristics of fungi and actinomycetes. J. Bacteriol., 60, 221 - 223.
- Matelas R.I. (1971) Calculation of oxygen required for cell production. Biotechnol. Bioeng. , 13, 581 - 582.
- Mavituna F., Sinclair C.G. (1985) A graphical method for the determination of critical biomass concentration for non-oxygen-limited growth. Biotechnol. Lett., 7, 69 - 74.
- Mc Inerney M.J., Bryant M.P., Pfennig N. (1979) Anaerobic Bacterium that Degrades Fatty Acids in Syntrophic Association with Methanogens. Arch. Microbiol. 122, 129-135.
- Mc Inerney M.J., Bryant M.P., Hespell R.B., Costerton J.W. (1981 a) *Syntrophomonas wolfei* gen. nov. sp. nov., an anaerobic syntrophic, fatty acid-oxidizing bacterium. Appl. Environ. Microbiol. 41, 1029 - 1039.
- Mc Inerney M.J., Mackie R.I., Bryant M.P. (1981 b) Syntrophic association of a butyrate degrading bacterium and *Methanosarcina* enriched from bovin rumen fluid. Appl. Environ. Microbiol. 41, 826 - 828.
- Monties B. (1980) Les polymères végétaux. Gautier-Villars (eds)
- Moo-Young M., Blanch H.W. (1981) Design of biochemical reactors. Mass transfer criteria for sample and complex systems. In Advances in Biochemical Engineering. Vol. 19. A. Fiechter (Ed). Springer Verlag, Berlin.
- Mosey F.E. (1983) Mathematical modelling of the anaerobic digestion process: Regulatory mechanisms for the formation of short chain volatile fatty acids from glucose. Wat. Sci. Tech., 15, 209 - 232.

- Mountfort D.O., Bryant M.P. (1982) Isolation and characterization of an Anaerobic syntrophic benzoate-degrading bacterium from Sewage Sludge. *Arch. Microbiol.* 133, 249 - 256.
- Murray W.D., Van Den Berg L. (1981) Effect of support material on the development of microbial fixed films converting acetic acid to methane. *J. Appl. Bacteriol.* 51, 257 - 265.
- Nefzaoui A., Marchand S., Vanbelle M. (1982) Valorisation de la pulpe d'olive dans l'alimentation des ruminants. In tropical animal production for the benefit of Man International Colloquium. Antwerp. Belgium, décembre. 309 - 314.
- Nefzaoui A. (1987) Contribution à la rentabilité de l'oléiculture par la valorisation optimale des sous-produits. Séminaire sur l'économie de l'olivier. Tunis, 20-22 janvier.
- Ninnekar H.Z., Vaidyanathan C.S. (1981) Catéchol 1,2-dioxygenase from *Aspergillus niger*: purification and properties. *J. Indian Inst. Sci.* 63, 131 - 136.
- Nyns E.J. (1987) Influence of environmental factors on the process rate of biomethanisation of organic matter in digesters. Séminaire Processus et procédés conduisant à la méthanisation. GRUTTE- MEZE.
- Odier E., Janin G., Monties B. (1978) Bacterial attack of lignin. Abstract of 27th IUPAC congress., 27-31 August, Helsinki, Larenkari J and Oskarsen J. (Eds), 443.
- Parkin G.F., Speece R.E. (1983). Attached versus suspended growth anaerobic reactors : response to toxic substances. *Wat. Sci. Tech.* 15, 8/9, 261 - 289.
- Pasivk-Bronikowska W., Rudzinski K.J. (1980) Mathematical model of bubble gas desorption from liquids. *Chem. Engin. Sci.* 35, 512 - 518.
- Paul E.A., Clark F.E. (1989) Soil Microbiology and biochemistry. Academic Press, Inc. p 273.
- Perez J., Hernandez M.T., Ramos C.A., Martinez J. (1987). Caracterizacion de fenoles del pigmento del alpechin y transformacion por *Phanerochaete chrysosporium*. *Grassas y Aceites*, 38, 367 - 371.
- Petruccioli M., Servili M., Montedoro F., Federici F. (1988) Development of recycle procedure for the utilization of vegetation waters in the olive-oil extraction process. *Biotechnol. Lett.*, 10, 55 - 60.
- Pirt S.J. (1966) A theory of the mode of growth of fungi in the form of pellets in submerged culture. *Proceed. Royal Soc. B.* 166, 369 - 373.
- Raimbault M., Alazard D. (1980) Culture method to study fungal growth in solid fermentation. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 9, 199 - 209.
- Renzo C., Amirante P. (1988) Trattamento di osmosi inversa ed ultrafiltrazione. In Proc. of Inter. Symp. on olive mill wastewaters treatment. COI-FAO-APROL, Lecce, Italy 16-17, November.
- Richards J.W. (1961) Studies in aeration and agitation. *Progr. Indus. Microbiol.* 3.
- Rigoni-Stern S., Rismondo R., Szpyrkowicz L., Zilio grandi, F. (1988) Anaerobic digestion of vegetation water from olive oil mills on a fixed biological bed with a biogas production. In: Proc. of Fifth Int. Symp. on Anaerobic Digestion, Bologna, Italy, 22-26 May, Tilche, A. and Rozzi, A., (eds) pp. 561 - 565.

- Rodriguez J.A., Ecchevarria J., Rodriguez F.J., Sierra N., Daniel A., Martinez O. (1985) Solid state fermentation of dried citrus pell by *Aspergillus niger*. *Biotechnol. Lett.*, 7, 577 - 580.
- Rombouts F.M., Pilnik W. (1978) Enzymes in fruit and vegetable juice technology. *Process Biochem.*, August, 9-13.
- Roques H. (1981) Fondements théoriques du traitement biologique des eaux 2. Chap 3-6 Traitement anaerobie, 1476 - 1532.
- Roy F., Albagnac G., Samain E. (1985) Influence of calcium addition on growth of highly purified syntrophic cultures degrading long chain fatty acids. *Appl. Environ. Microbiol.* 49 , 702-705.
- Rozzi A., Passino R., Limoni M. (1989) Anaerobic treatment of olive mill effuents in polyurethane foam bed reactors. *Process Biochem.* April, 68 - 74.
- Saiz J.C., Gomez A.G. (1986) Vegetation water treatment by aerobic fermentation with fungi. Simposio Internacional sobre Valorizacion de los subproductos del olivar: alpechin y orujo. 5-6-7. Marzo, Sevilla-Espana,10,
- Salvemini F. (1985) Composizione chimica e valutazione biologica di un mangime ottenuto essicando tercamente le acque di vegetazione delle olive. *Riv. Delle Sostanze grasse*, 112, 559 - 564.
- Samain E. (1982). Métabolisme des composés intermédiaires de la fermentation méthanique. Thèse de III cycle, Université des sciences et techniques de Lille.
- Sayadi S. (1990) Communication personnelle.
- Schink B., Stieb M. (1983). Fermentative degradation of polyethylene glycol by a strictly anaerobic, gram-negative, nonsporeforming bacterium, *Pelobacter venetianus* sp. nov. *Appl. Environ. Microbiol.* 45, 1905 - 1913.
- ✓ Seng JM (1988) Chitine, chitosane et dérivés: De nouvelles perspectives pour l'industrie. *Biofutur* 71, 40 - 44.
- Sethi R.P., Grainger J.M. (1980 a) Conversion of banana into animal feed by *Aspergillus niger* using solid substrate fermentation. *Advances in Biotechnology*. Vol. 2. Moo-Young M and C.W. Robinson (eds). 71 - 79.
- Sethi R.P., Grainger J.M. (1980 b) Conversion of mangostone into SCP for animal feed by *Aspergillus niger* using solid substrate fermentation. *Advances in Biotechnology*. Vol. 2. Moo-Young M and C.W. Robinson (eds). 319 - 325.
- Shailubhai K., Rao N.N., Modi V.V. (1982) Degradation of benzoate and salicylate by *Aspergillus niger*. *Indian J. Exp. Biol.*, 20, 166 - 168.
- Sharaa G., Jewell W.J. (1984) High-rate conversions of soluble organics with a thermophilic anaerobic attached film expanded bed. *WPCF*. 56, 226 - 232.
- Smith E.I., Greenshields R.N. (1974) Tower fermentation systems and their applications to aerobic process. *Chem. Engin.* 28 - 34.
- Shlomi E.R., Lankhorst A., Prins R.A. (1978) Methanogenic fermentation of benzoate in an

- enrichement culture. *Microbiol. Ecol.* 4, 249 - 261.
- Somogyi M (1945) Determination of blood sugar. *J Biol Chem*, 160, 61 - 68
- Speece R.E. (1983) Anaerobic biotechnology for industrial wastewater treatment. *Env. Sci. Techn.* 17, 413-427.
- Standard methods for the examination of water and wastewater (1975) American Public Health Association, 14th ed., 550 - 554.
- Suntherland J.B., Crawford L., Pometto A.L. (1983) Metabolism of cinnamic, p-coumaric, and ferrulic acids by *Streptomyces setonii*. *Can. J. Microbiol.* 29, 1254-1257.
- Switzenbaum M.S. (1983) A comparison of the anaerobic filter and the anaerobic expanded/fluidized bed processes. *Wat. Sci. Tech.* 15, 345 - 358.
- Tanchev S., Joncheva N., Genov N. and Codounis M. (1980) Identification of anthocyanins contained in olives. *Georgike Ereuna* 4, 5-13.
- Tarvin D., Buswell A.M. (1934) The methane fermentation of organic acids and carbohydrates. *J. Ann. Chem. Soc.* 56., 1751 - 1755.
- Taylor G.T. (1982) The methanogenic bacteria. *Prog. Ind. Microbiol.* 16, 231 - 329.
- Thiel P.G., Hattingh W.H.J. (1967) Determination of hydrolytic enzyme activities in anaerobic digesting sludge. *Water Res.* 1, 191 - 197.
- Tschocke C. (1989) Préparation enzymatique à la séparation de phases des margines. In Proc. of Inter. Symp. on olive mill wastewaters treatment. COI-FAO-APROL, Lecce, Italy,
- Tsonis S.P., Grigoropoulos S.G. (1988) High rate anaerobic treatment of olive oil mill wastewater. Fifth Intern. Symp. on Anaerobic Digestion, Bologna. Hall E.R. and Hobson P.N. (Eds), pp.115 - 124.
- Tsubouchi H., Yamamoto K., Hisada K., Sakabe Y. (1983) Degradation of aflatoxins by *A. niger* and aflatoxin nonproducing *Aspergillus flavus*. *Shok. Eise. Zas.*, 24, 113 - 119.
- Vaccarino C., Lo Curto R., Tripodo M.M., Lagana G. Patene R., Munao F. (1986) Vegetation water treatment by aerobic fermentation with fungi. Simposio Internacional sobre Valorizacion de los subproductos del olivar: alpechin y orujo. 5-6-7 Marzo, Sevilla-Espana,23.
- Van Den Berg L., Lentz C. P., Armstrong D. W. (1980) Methane production rates of anaerobic fixed film fermentors as compared to those of anaerobic contact and fully mixed continuous fermentors. In Proc. of the Sixth International fermentation Symposium held in London, Canada, July 20-25, Advances in Biotechnology, Pergamon Press.
- Van Den Berg L., Kenedy K.J. (1982) Performance characteristics of anaerobic down-flow stationary fixed film reactors. NCRCC n° 20071, First International Symposium on fixed Film Processes, Kings Island.
- Vazquez R.A., Maestro D.R., Graciani C.E. (1974) Compentes fenolicos de la aceituna. II. polifenoles del alpechin. *Grasas y Aceites*, 25, 341-345
- Verrier D. (1984) Méthanisation d'effluents agro-alimentaires en récteurs à cellules fixées.

Thèse de docteur-ingénieur, ENSIAA.

- Voragen A.G.J., Rombouts F.M. and Searle-Van M.J.F. (1987) Conversion of arabinans by the arabinanases of *Aspergillus niger*. In proc. Int. Conf. on biomass for energy and industry, Orléans, France, 11-15 mai, 737 - 744.
- Wagner H., Bladf S., Zgainski E.M. (1984) Plant drug analysis. Translated by Scott Th.A. Springer-Verlag.
- Wang D.I.C., Conney C.L., Demain A.L., Dunnill P., Humphrey A.E., Lilly M.D. (1979) Fermentation and enzymes technology. John Wiley (Ed), NewYork.
- Weiland P., Wulfert K. (1987) Effect of flow direction process behaviour of anaerobic fixed bed reactors. Results of a pilot scale study. Dechema. Biotechnol. Conf. 395 - 402.
- Werner W., Rey H.G., Wielinger R.H. (1977) Über die eigenschaften eines neuen chromogens für die Blutzucker nach der GOD/POD methode. Z Anal Biochem 252, 224 - 228
- Widdel F, Pfennig N. (1982) Dissimilatory sulfate - or sulfur - reducing bacteria. In Bergey's Manual of determinative bacteriology. Krieg, N.R., Holt J.G. (Eds), Williams and Wilkins (Pubs), Baltimore (U.S.A.). Vol. 2, 663 - 679.
- Wilkie A., Faherty G., Colleran E. (1982) The effect of varying the support matrix on the anaerobic digestion of pig slurry in the upflow anaerobic digestion folter design. Proc. 2nd E.C. Conference Energy from Biomass. 531 - 535.
- Wood P.J., Siddiqui I.R. (1971) Determination of methanol and its application to measurements of pectin ester contents and pectine methyl esterase activity. Anal Biochem. 39, 418 - 428
- Young J.C., Mc Carty P.L. (1969) The anaerobic filter for waste treatment. WPCF. 41, 160 - 173.
- Young J.C., Dahab M.F. (1983). Effect of media design on the performance of fixed-bed anaerobic reactors. Wat. Sci. Technol., 15, 369 - 383.
- Yokotsuka T., Sasaki M. (1980) Risks of mycotoxins in fermented foods. Advances in Biotechnology. Vol. 2. Moo-Young M and C.W. Robinson (eds), 461 - 466.
- Zehnder A.J.B., Ingvorsen K., Marti T. (1982) Microbiology of methane bacteria. Proc. Anaerobic digestion 1981. Huges, Stafford, weathly, Baader, Lettinga, Nyns, Verstraete and Wentworth (Eds), 45 - 68.
- Zeikus J.G. (1977) The biology of methanogenic bacteria. Bacteriol. Rev. 41, 514 - 541.
- Zeikus J.G., Wellstein A.L., Kirk T.K. (1982) Molecular basis for the biodegradative recalcitrance of lignin in anaerobic environments. FEMS. Microbiol. Lett., 15, 193 - 197.
- Zlokarnik M. (1978) Sorption characteristic for gas-liquid contacting in mixing vessels. Adv. Biochem. Eng., 8, 133 - 149.

PLANCHES PHOTOGRAPHIQUES

LEGENDE DES PLANCHES

Planche n° 1: Fermenteurs de laboratoire

Photographie n° 1: Colonne à bulles

Photographie n° 2: Filtres anaérobies garnis de fragments de gaine électrique

Photographie n° 3: Lit fluidisé à boues activées couplé à un décanteur

Photographie n° 4: Installation de laboratoire pour la dépollution des margines

Planche n° 2: Photographies n° 5 et n° 6: Microscopie à balayage de la matière en suspension des margines (pulpes d'olives)

Planche n° 3: Pigments des margines

Photographie n° 7: Filtration sur gel de Séphadex G-50 des margines brutes

Photographie n° 8: Couleur noire des margines traitées

Photographie n° 9: Couleur rouge des margines acidifiées

Photographie n° 10: Couleur jaune des margines traitées et acidifiées

Planche n° 4: Croissance d'*A. niger* sur margines

Photographie n° 11: Spores d'*A. niger*

Photographie n° 12: Mycélium d'*A. niger*

Photographie n° 13: Maille du tissu de Tergal utilisé pour la filtration des margines

Photographie n° 14: Biomasse sèche d'*A. niger* obtenue sur margines

Planche n° 5: Photographies n° 15 et n° 16: Microscopie optique du mycélium d'*A. niger* piégeant les particules de pulpes d'olives

Planche n° 6: Photographies n° 17 et n° 18: Microscopie à balayage du gâteau obtenu par filtration des margines fermentées par *A. niger*

Planche n° 7: Photographies n° 19 et n° 20: Structure poreuse du support bactérien utilisé dans le lit fluidisé (coques d'olives)

Planche n° 8: Photographies n° 21 et n° 22: Boues anaérobies issues du filtre anaérobie

Planche N° 9: Photographies n° 23 et n° 24: Bactéries et paramécies présentes dans les boues activées du lit fluidisé

Planche n° 10: Photographies n° 25 et n° 26: coques d'olives fixant les bactéries

Planche n° 11: Photographies n° 27 et n° 28: Coques d'olives après leur utilisation comme support

Planche n° 1:

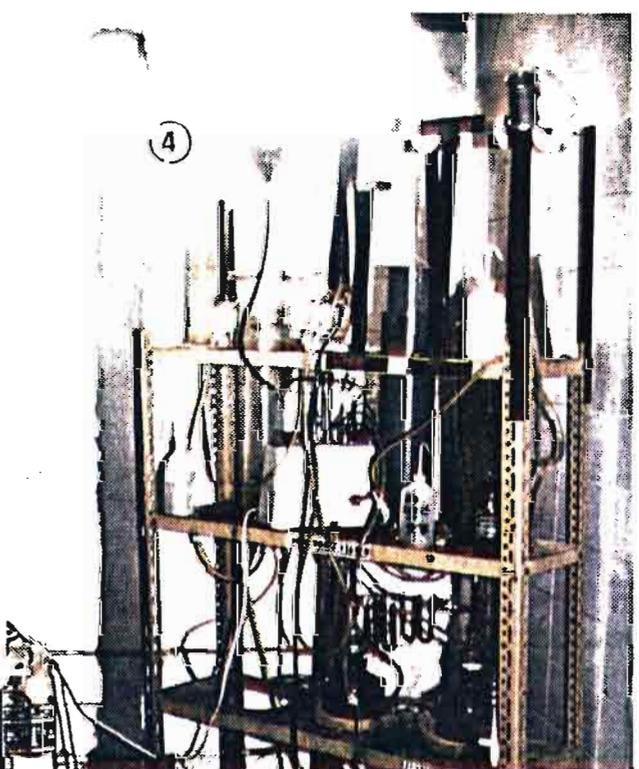
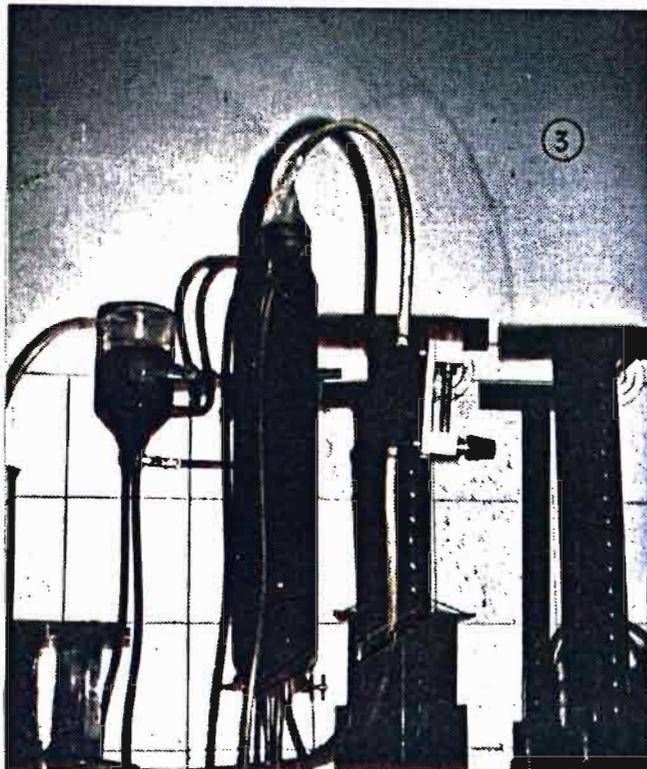
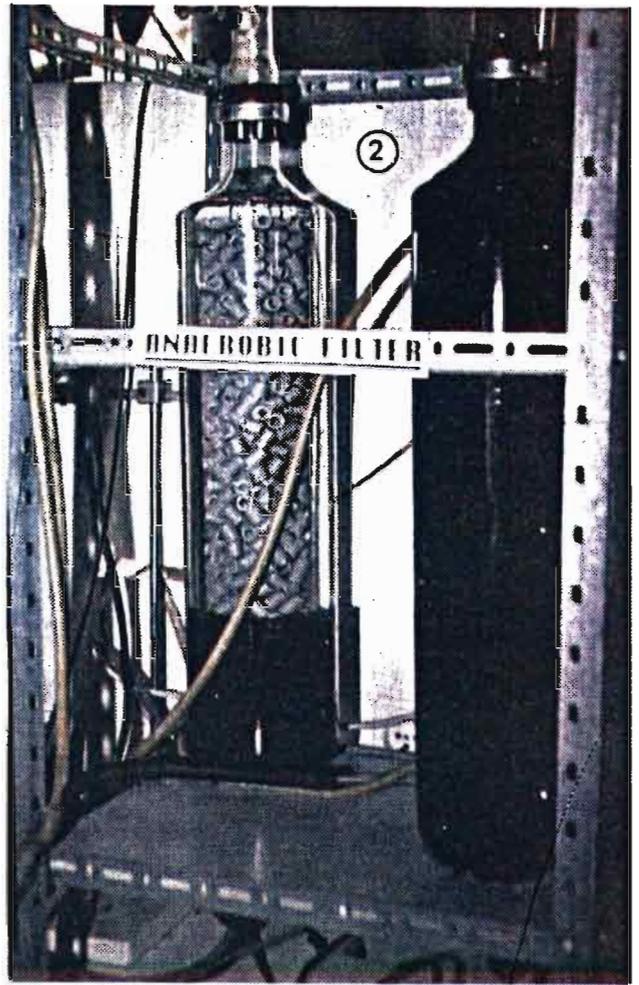
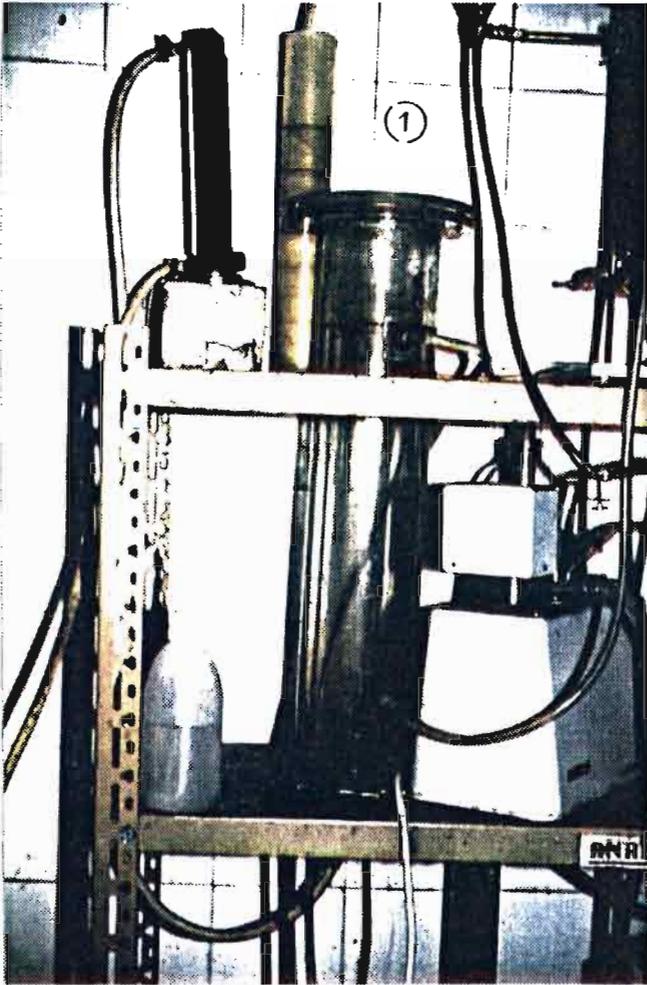


Planche n° 2:

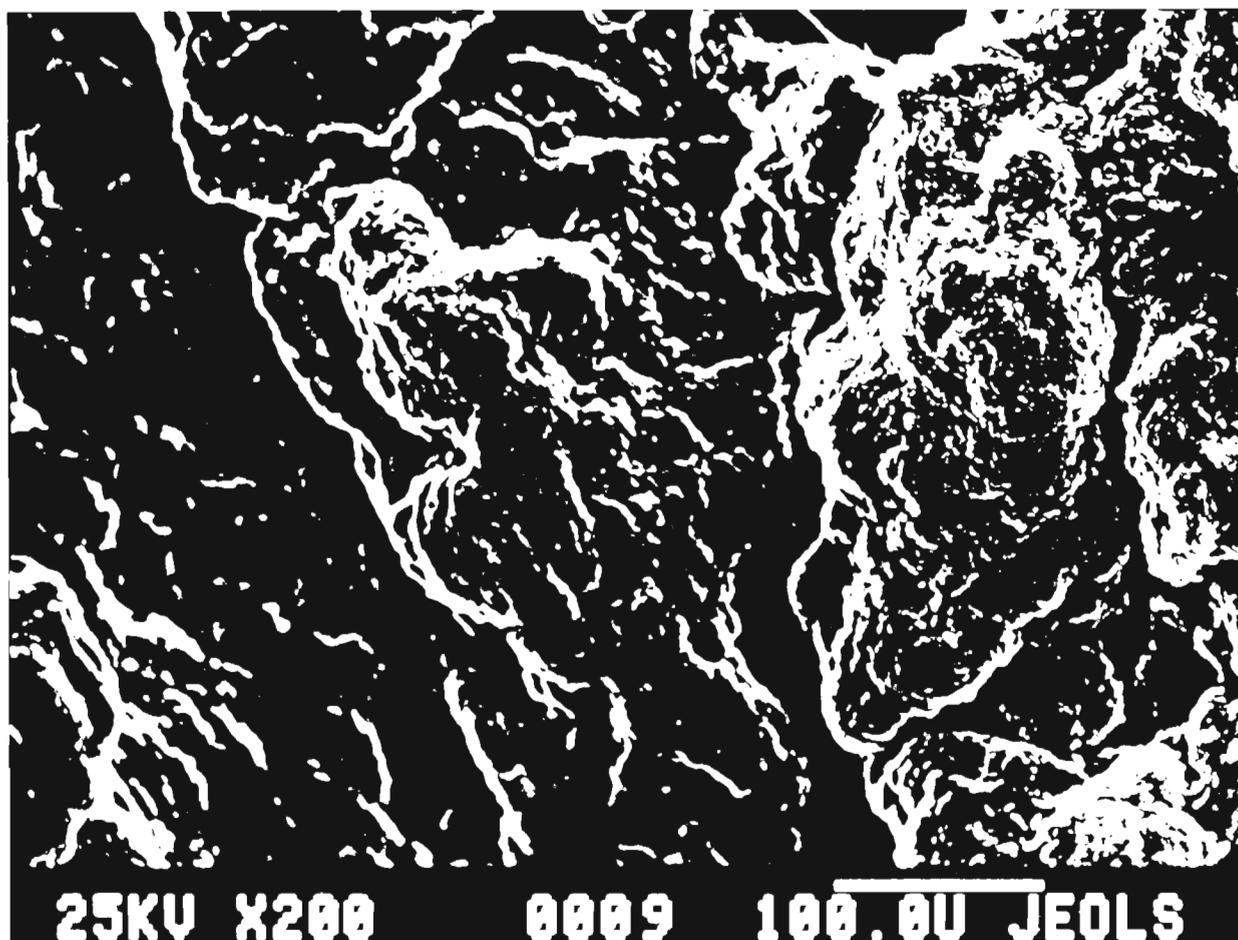


Planche n° 3:

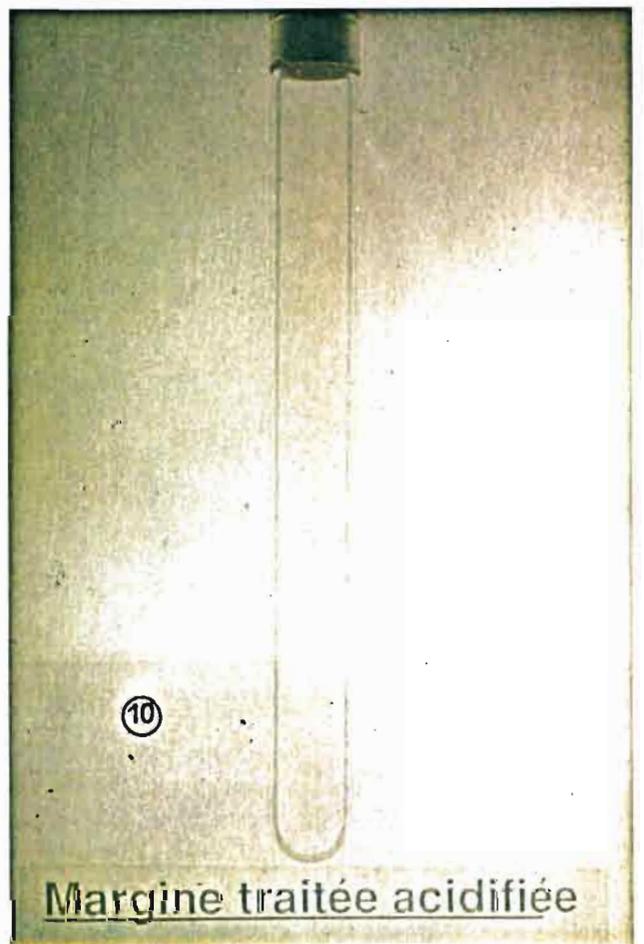
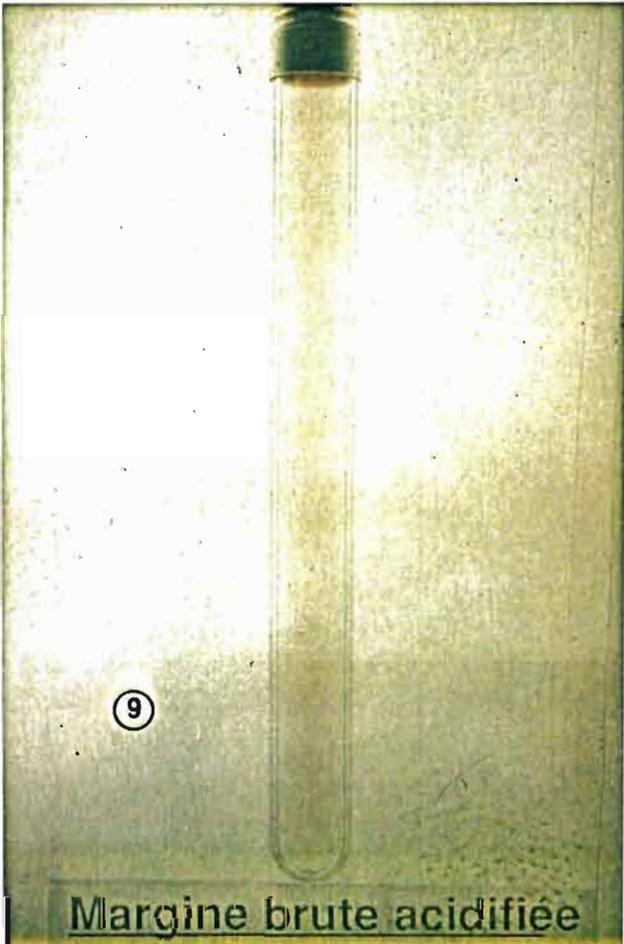
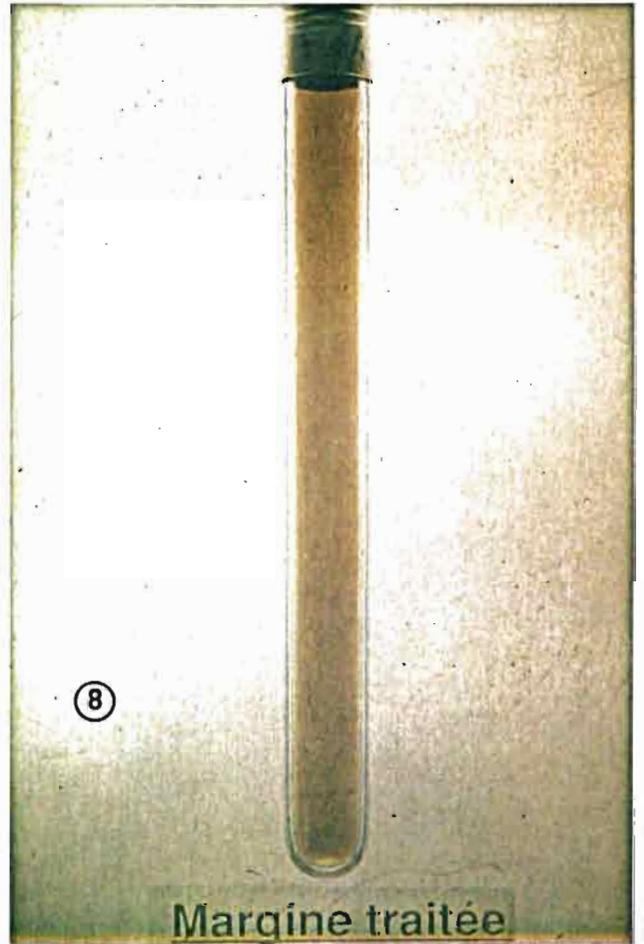
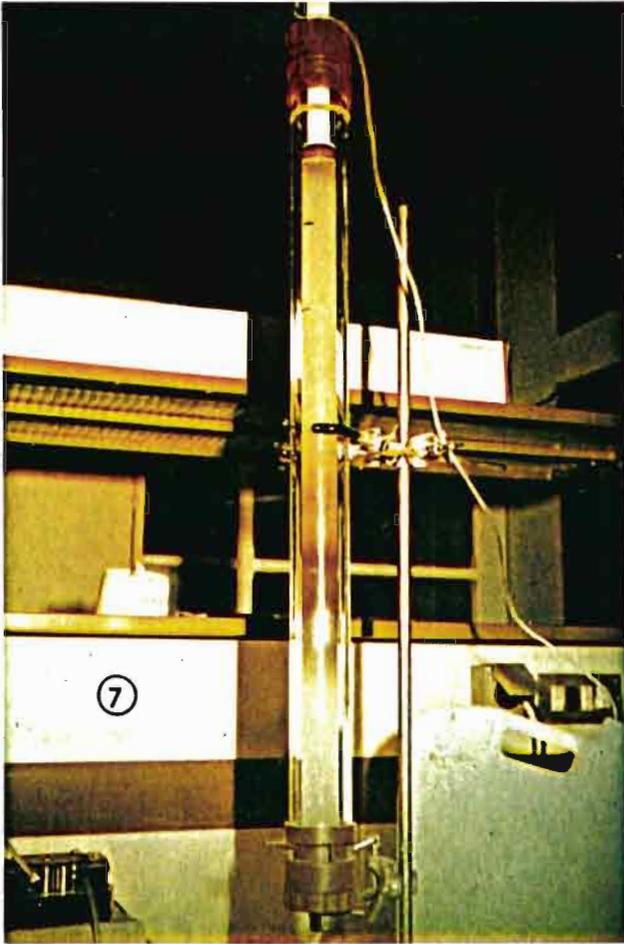
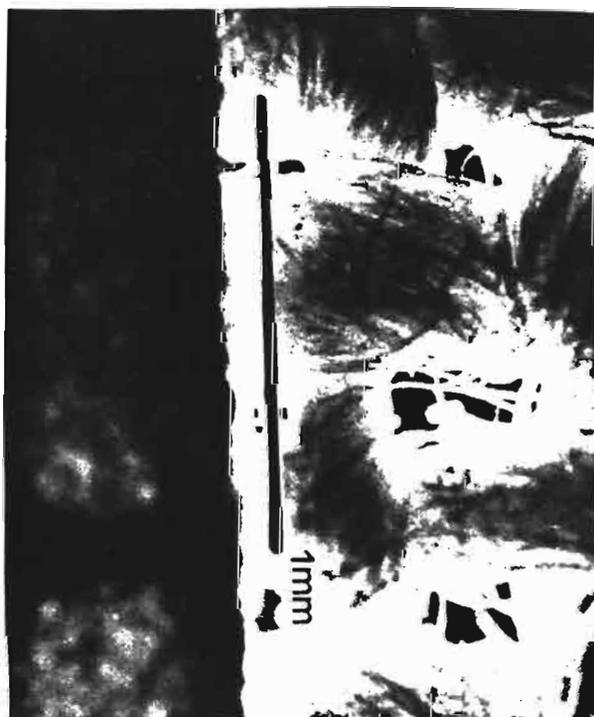


Planche n° 4:

11



12



13



14

Planche n° 5:

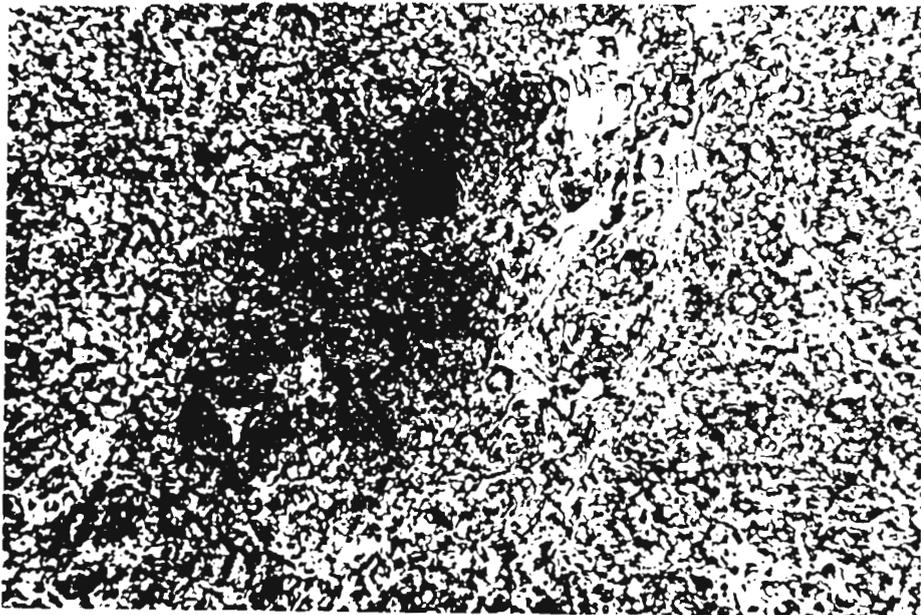
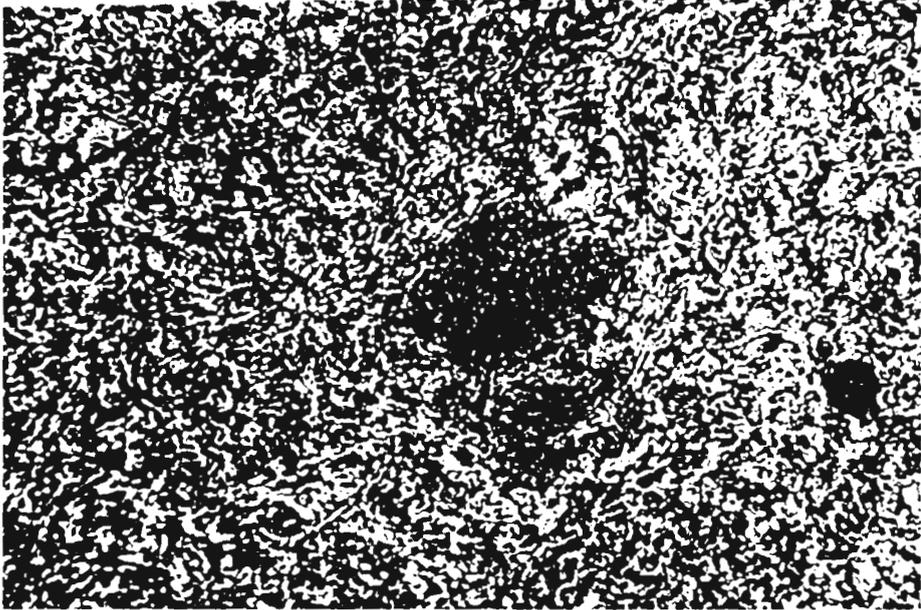


Planche n° 6:

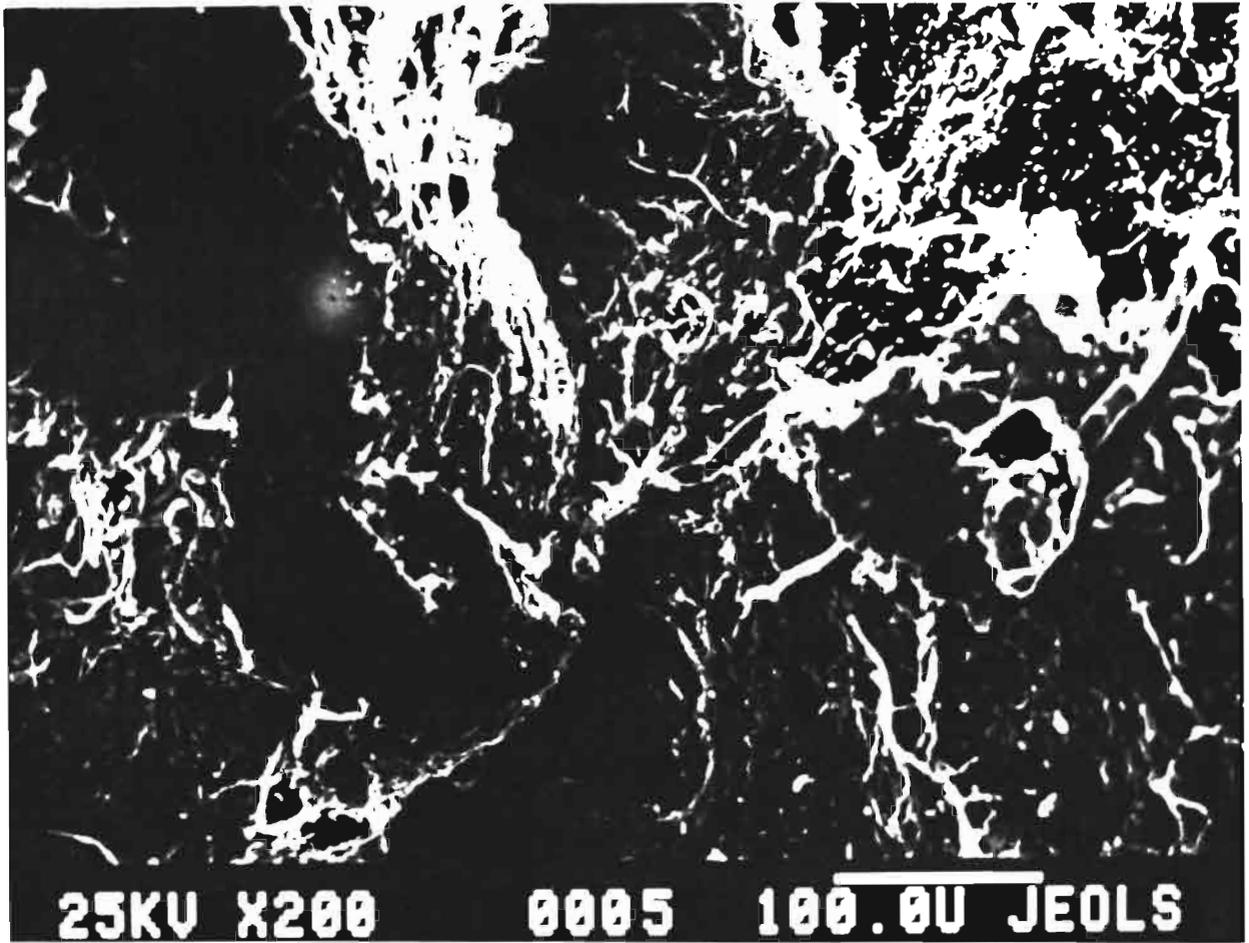


Planche n° 7:

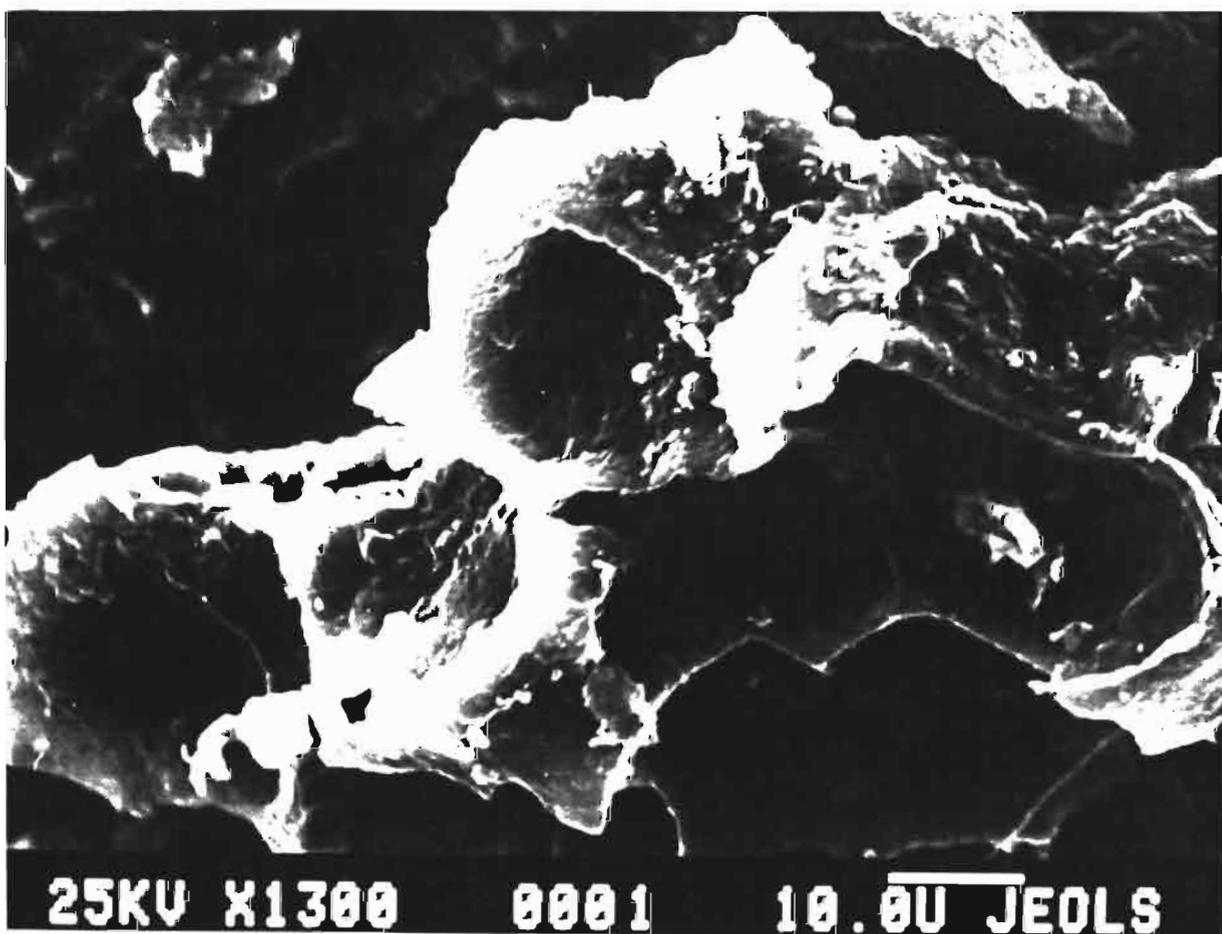
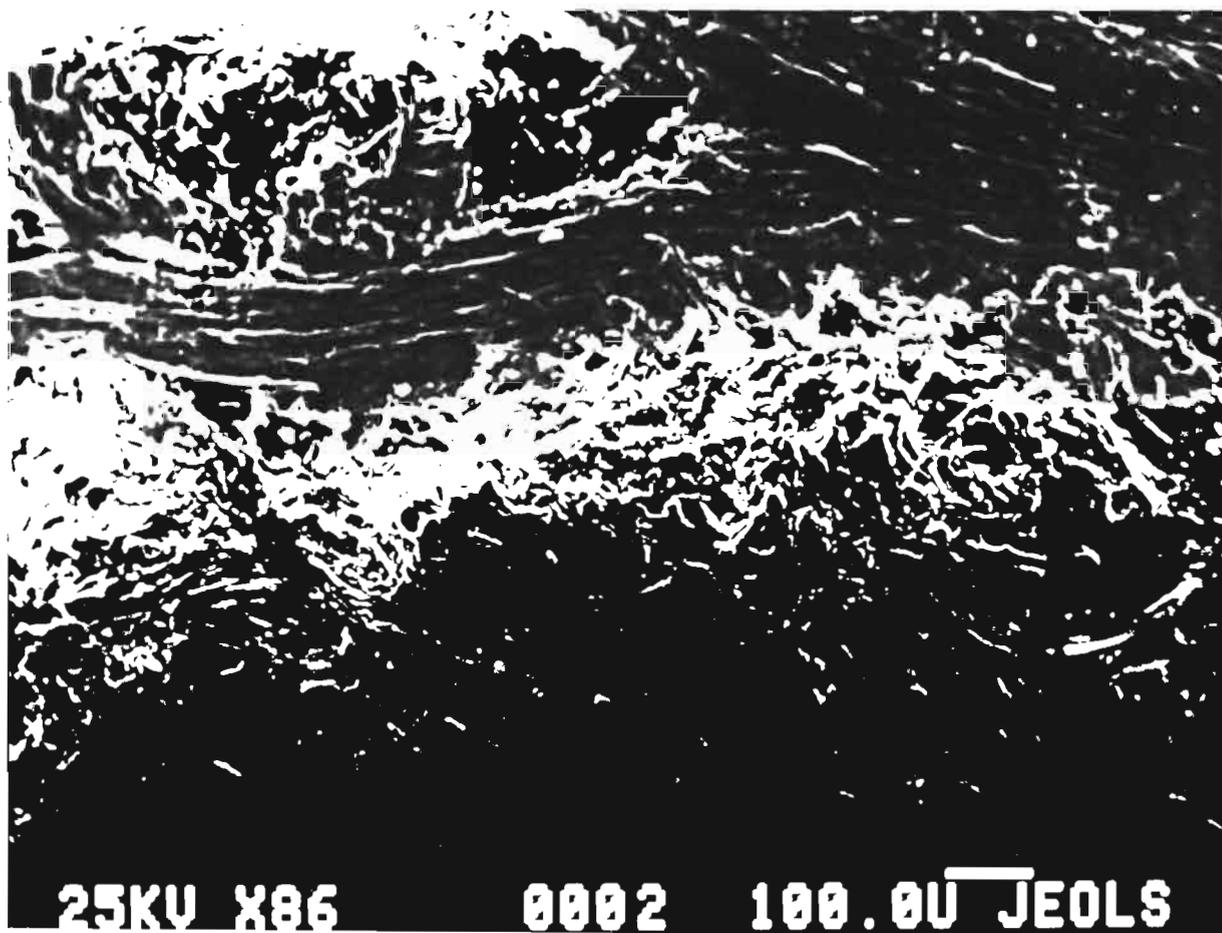


Planche n° 8:

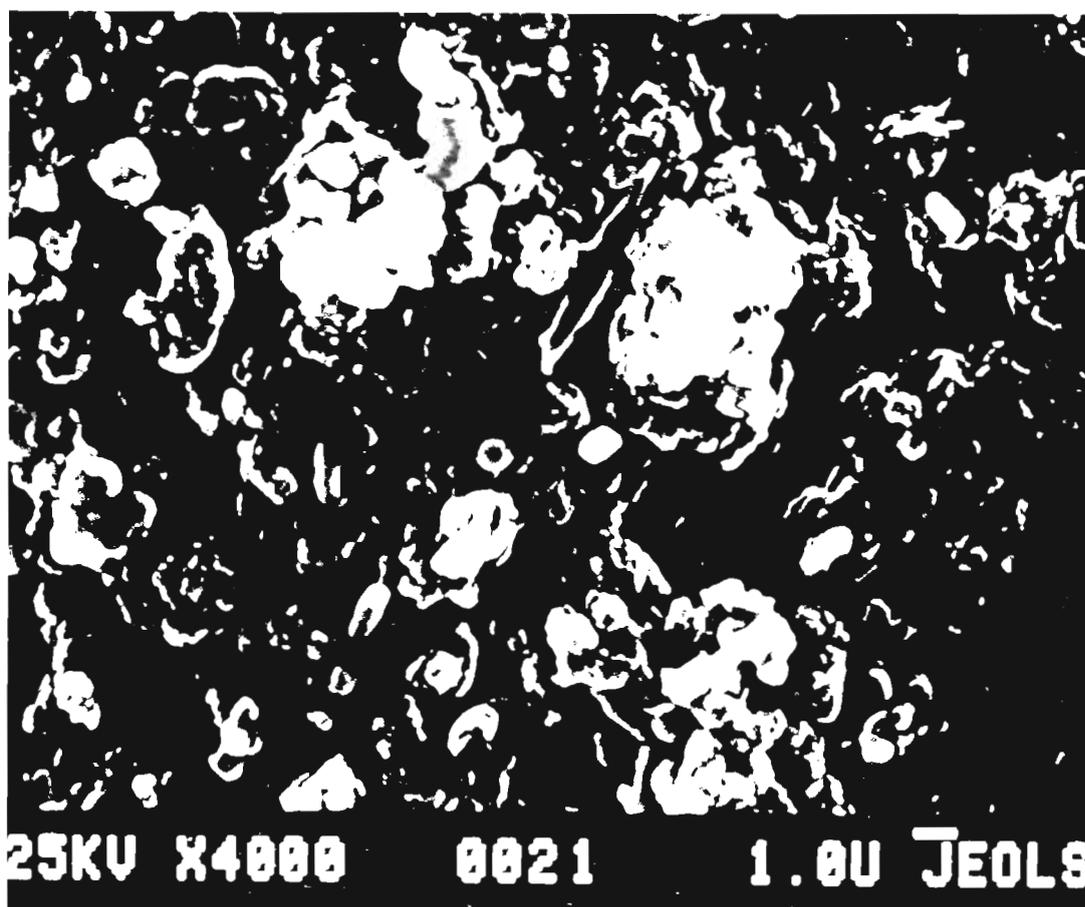
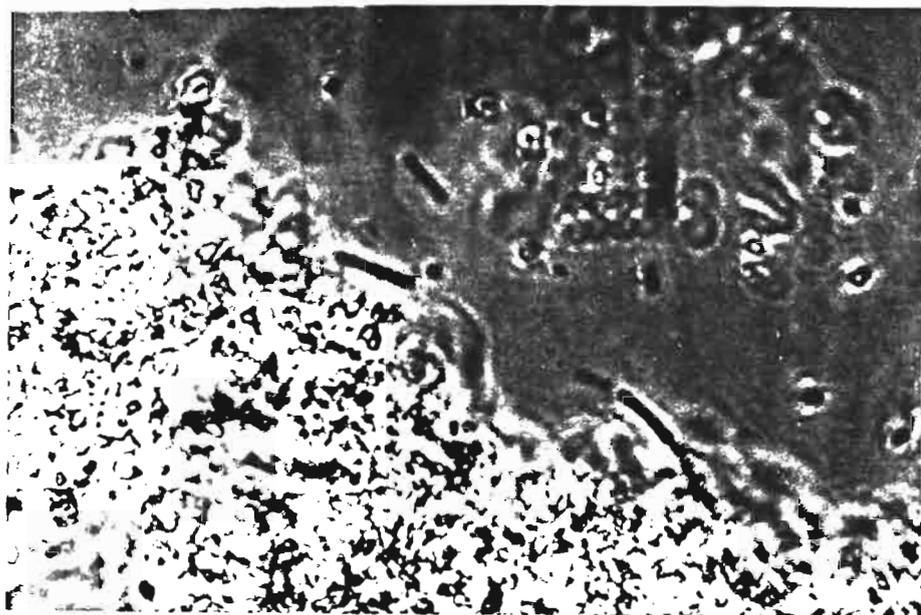


Planche n° 9:

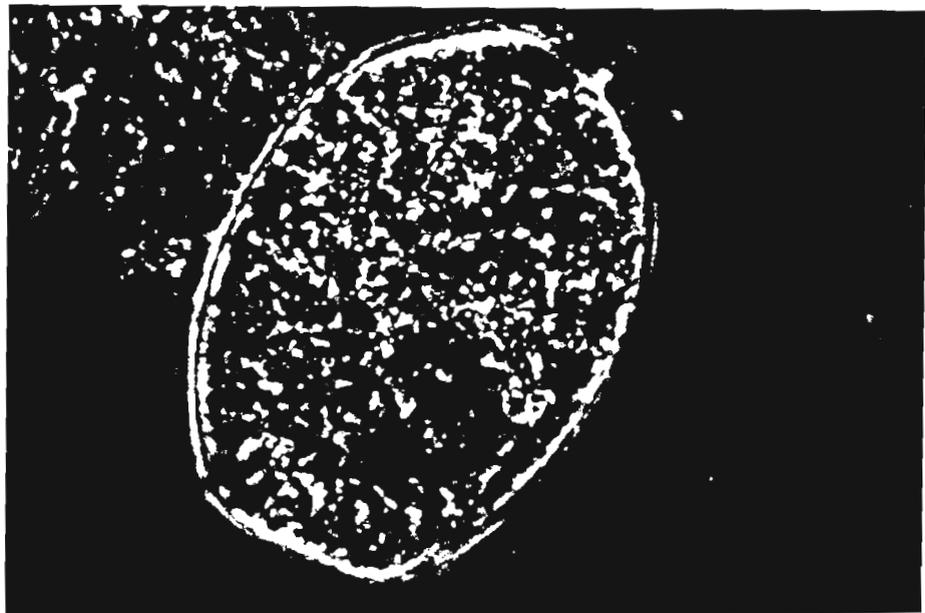
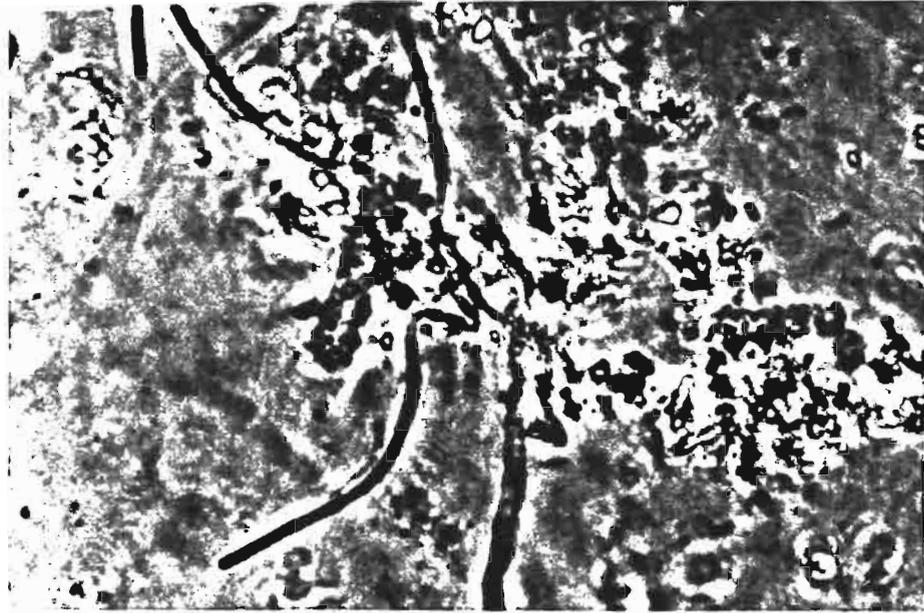


Planche n° 10:

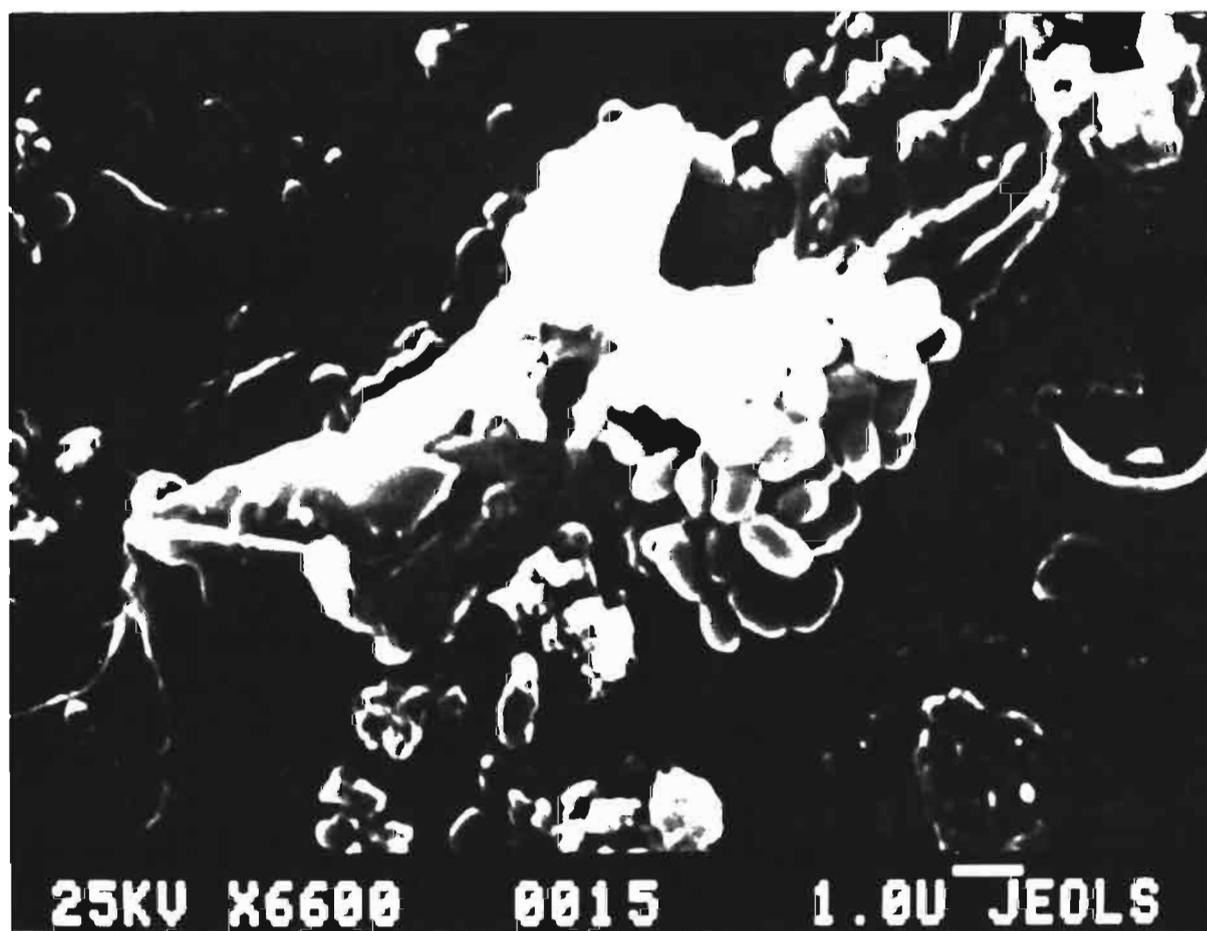
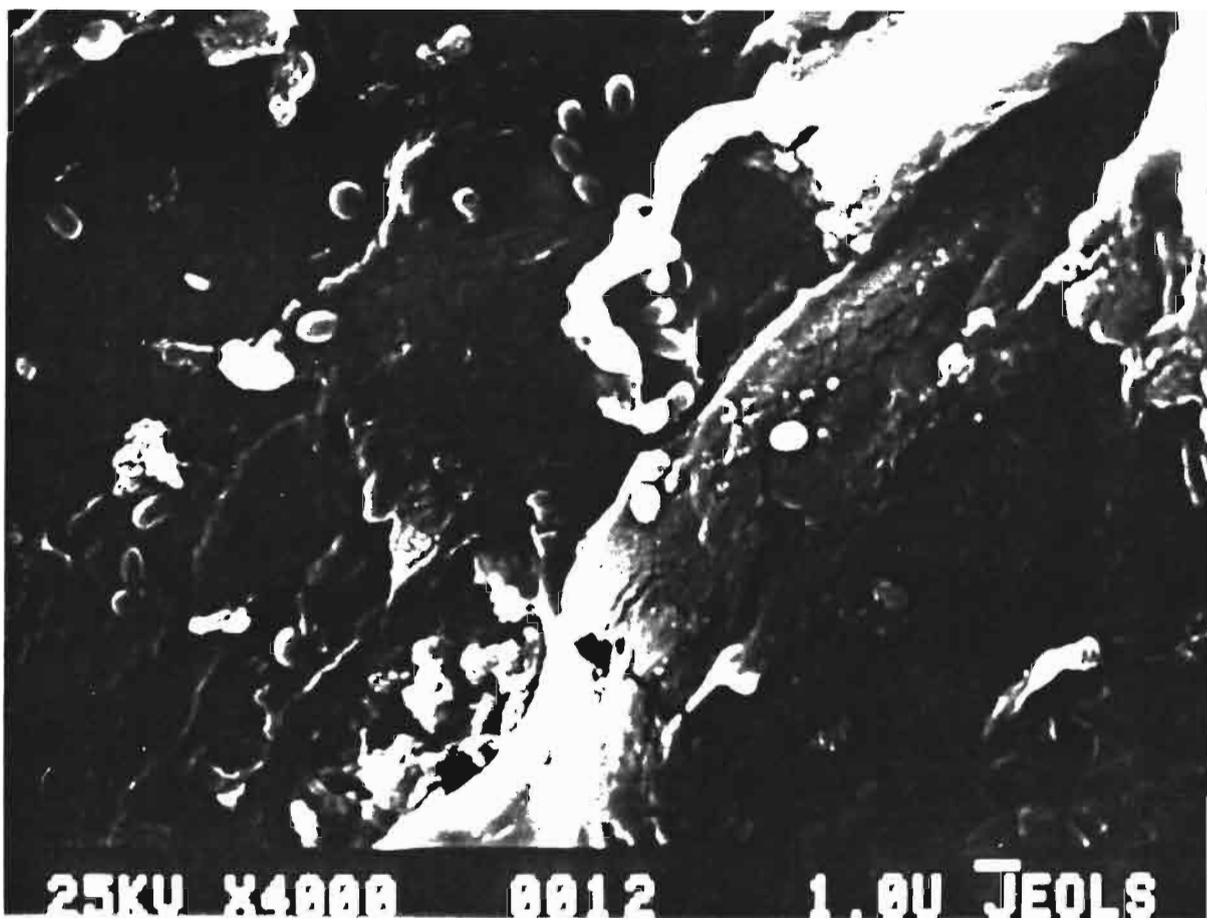
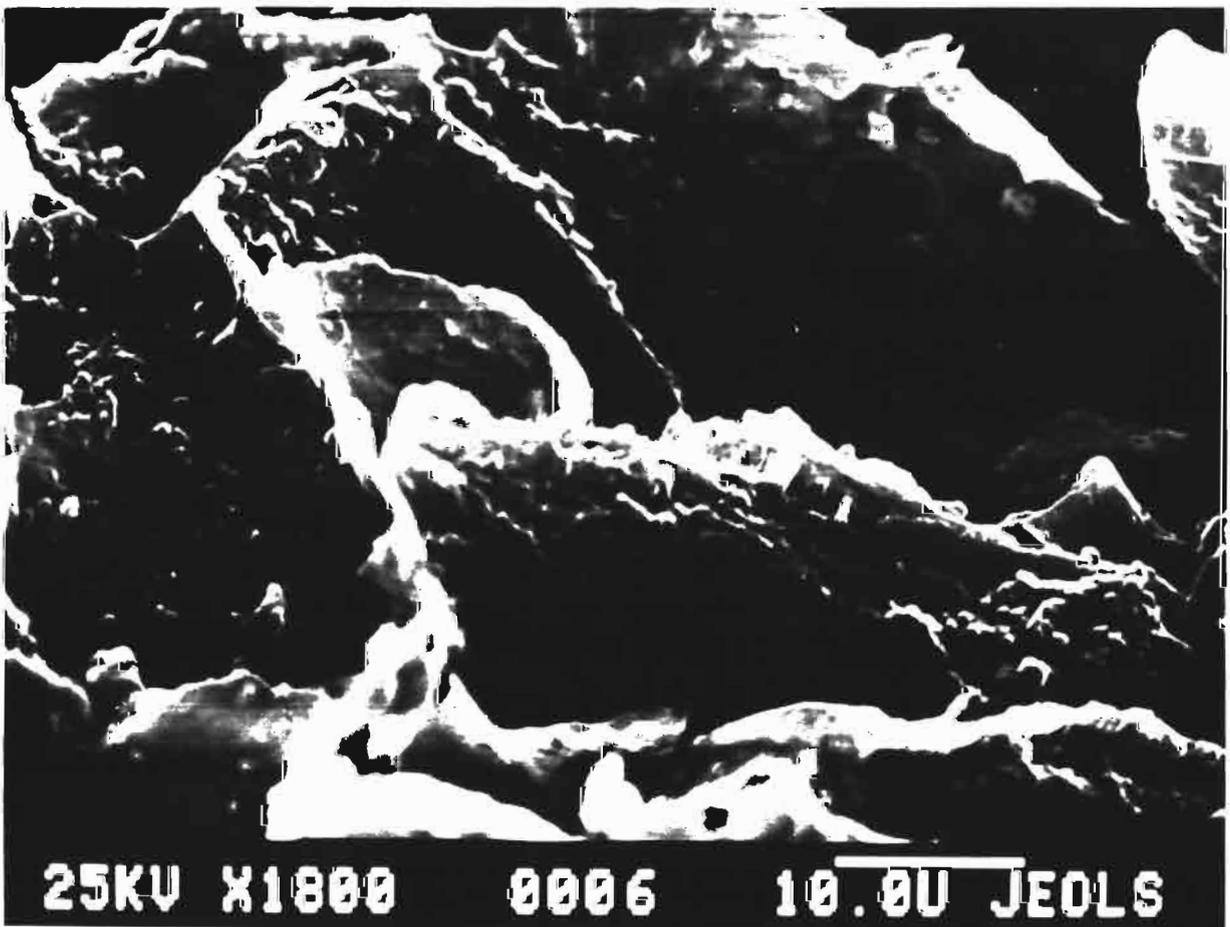
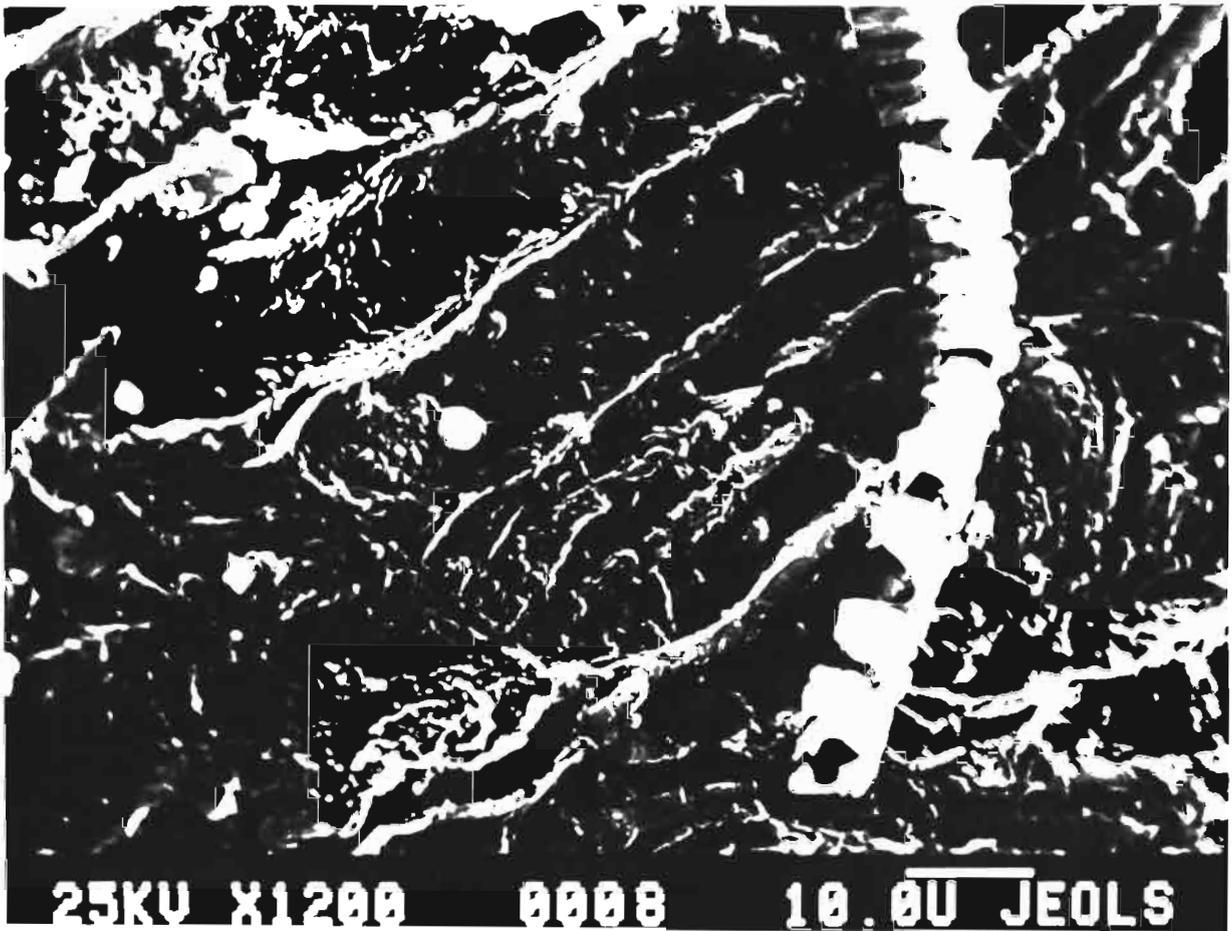


Planche n° 11:



ABSTRACT

Olive mill wastewaters (OMW) cause important pollution problems due to their high organic and polyphenols contents. Toxicity and biodegradability studies showed that polyphenolic compounds similar to humic acids and responsible of wastewater black colour, present little toxicity and are not easily biodegradable. On the contrary, tannins are highly toxic but biodegradable. The biological treatment process for OMW studied is based on an aerobic detoxification step followed by an anaerobic step and aerobic post-treatment.

* The first aerobic detoxification step of OMW supplemented with sulfate and ammonium was carried out by the growth of *Aspergillus niger* in a bubble column. This step decreased OMW toxicity and increased its biodegradability because of phenolic compounds degradation. Growth of *A. niger* resulted in 55 % COD removal, with production of biomass containing 30 % proteins (w/w). Filtration of OMW was enhanced by this fermentation because the suspended solids were trapped in the mycelium.

* The filtrate liquid was then methanized using an anaerobic filter packed with plastic sheath. This reactor showed a shorter start up and a better stability as compared to the anaerobic contact process. COD removal was around 70 % and the methane yield (l CH₄/ g COD removed) was closed to the theoretical yield.

* The anaerobic filter effluent was treated in an activated sludge fluidized reactor containing olive husk as a packing material. Husks were maintained in fluidization state by the aeration. Bacterial fixation on this fluidized support was observed. COD removal was 45 %.

The entire process allowed a global COD reduction up to 90 %; however, the black colour due to humic compounds persisted. This coloration could be removed via precipitation at pH 2 or by culture of *Phanerochaete chrysosporium*.

On the basis of these laboratory results, a biological OMW treatment system at pilot scale is proposed.

Keywords: Olive mill wastewater, phenolic compounds, inhibition, *Aspergillus niger*, bubble column, methane, anaerobic filter, activated sludge fluidized bed, decoloration.

RESUME

Les margines, effluent d'extraction de l'huile d'olive, posent de sérieux problèmes de pollution par leurs concentrations élevées en matière organique et en polyphénols.

Des études de toxicité et de biodégradabilité ont montré que les composés phénoliques qui sont de nature humique et responsables de la coloration noire, sont très peu toxiques et très difficilement biodégradables. Par contre, les composés taniques sont très toxiques mais biodégradables.

La conception du procédé de dépollution biologique des margines proposé dans cette étude, est basée sur la réalisation d'une étape de détoxification et de deux étapes de traitement anaérobie et aérobie:

- * La première étape de détoxification aérobie des margines additionnées de sulfate et d'ammonium, est réalisée par croissance d'*Aspergillus niger* en colonne à bulles. Ce prétraitement réduit la toxicité et facilite la biodégradabilité en dégradant les composés phénoliques. Il produit une biomasse à 30 % de protéines et réduit la DCO à 55 %. Le piégeage des matières en suspension des margines par le mycélium au cours de la fermentation améliore la filtration de cet effluent.

- * Le filtrat issu de ce prétraitement est méthanisé en filtre anaérobie garni de fragments de gaines électriques. Ce réacteur a démontré un temps de démarrage plus court et une meilleure stabilité que le procédé du contact anaérobie. L'abattement de la DCO est d'environ 70 % et les rendements en méthane sont proches des rendements théoriques.

- * L'effluent du filtre anaérobie est ensuite traité en lit fluidisé à boues activées, contenant des particules de coques d'olives comme support bactérien. Ces coques sont mises en suspension par l'aération, et la fixation bactérienne a été satisfaisante. Ce traitement aérobie a réduit la DCO à 45 % de sa teneur initiale.

En fin de procédé, la réduction globale de la DCO est supérieure à 90 % et la couleur noire due aux composés humiques des margines persiste. Cette coloration noire a pu être éliminée par précipitation à pH 2 ou par culture de *Phanerochaete chrysosporium*.

Sur la base des résultats obtenus en fermenteurs de laboratoire, un procédé de dépollution biologique des margines à l'échelle pilote est proposé.

Mots clés: Margines, composés phénoliques, inhibition, *Aspergillus niger*, colonne à bulles, Méthanisation, filtre anaérobie, lit fluidisé à boues activées, décoloration.