



**Master Sciences et Techniques : Biotechnologie Microbienne
MEMOIRE DE FIN D'ETUDES**

Traitement des margines de la région du
Fès

Présenté par :

- ◆ Melle GHOMARI oumaïma

Encadré par :

- ◆ Pr. ELHARCHLI ELHASSAN

Soutenu Le 22 Juin 2015 devant le jury composé de:

- ◆ Pr.AMRANI Joutei Khalid
- ◆ Pr.KHALIL Fouad
- ◆ Pr.RACHIQ Saad
- ◆ Pr.ELHARCHLI ELhassan

Année Universitaire 2014 / 2015

Dédicaces

A mes très chers parents

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

Ce travail représente le fruit de votre soutien, vos sacrifices, et vos encouragements. Jamais il n'aurait vu le jour sans les conseils que vous avez consentis pour mon éducation.

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

A mes très chères sœurs et mes chers frères.

Pour leur soutien et leurs encouragements tout au long de la réalisation de ce travail.

A ma belle famille

A mes amies et collègues.

Remerciements

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été réalisés au sein du laboratoire de Biotechnologie Microbienne et de la Chimie Appliquée de la faculté de science et technique Fès.

En premier lieu, je remercie Allah le Tout Puissant de m'avoir donné la volonté, la santé et le courage pour réaliser ce travail.

Mes plus profonds remerciements et toutes mes reconnaissances vont à mon encadrant Mr. Hassan EL HARCHLI d'avoir assuré l'encadrement de ce travail. Sa disponibilité, son expérience, son savoir scientifique et ses qualités professionnelles ont été déterminants dans l'aboutissement de ce travail. Mes remerciements vont également à tous les professeurs membres du jury, d'avoir accepté d'examiner ce mémoire.

Je remercie mes collègues doctorants et étudiants au laboratoire de Biotechnologie Microbienne de leur contribution de près ou de loin pour une meilleure réalisation de mon stage, et aussi du plaisir que j'ai ressenti durant cette période au laboratoire Biotechnologie Microbienne et celui de la chimie appliquée. Une pensée particulière à Mme Chraïbi Marwa et Mr Barkai Hassan. Qu'ils trouvent dans ces mots mon expression de gratitude et de sentiments les plus sincères.

Je souhaite exprimer mes sincères remerciements à tous mes collègues avec lesquels j'ai partagé la vie de tous les jours mes cinq années d'étude à la FST de Fès, en particulier mes compagnons.

Remerciements

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été réalisés au sein du laboratoire de Biotechnologie Microbienne et de la Chimie Appliquée de la faculté de science et technique Fès.

En premier lieu, je remercie Allah le Tout Puissant de m'avoir donné la volonté, la santé et le courage pour réaliser ce travail.

Mes plus profonds remerciements et toutes mes reconnaissances vont à mon encadrant **Mr. Hassan EL HARCHLI** d'avoir assuré l'encadrement de ce travail. Sa disponibilité, son expérience, son savoir scientifique et ses qualités professionnelles ont été déterminants dans l'aboutissement de ce travail. Mes remerciements vont également à tous les professeurs membres du jury, d'avoir accepté d'examiner ce mémoire.

Je remercie mes collègues doctorants et étudiants au laboratoire de Biotechnologie Microbienne de leur contribution de près ou de loin pour une meilleure réalisation de mon stage, et aussi du plaisir que j'ai ressenti durant cette période au laboratoire Biotechnologie Microbienne et celui de la chimie appliquée. Une pensée particulière à **Mme Chraïbi Marwa** et **Mr Barkai Hassan**. Qu'ils trouvent dans ces mots mon expression de gratitude et de sentiments les plus sincères.

Je souhaite exprimer mes sincères remerciements à tous mes collègues avec lesquels j'ai partagé la vie de tous les jours mes cinq années d'étude à la FST de Fès, en particulier mes compagnons.

Liste des Tables

Tableau 1: la composition chimique des margines.....	Erreur ! Signet non défini.
Tableau 2: la composition minérale des margines.	Erreur ! Signet non défini.
Tableau 3: Caractérisation microbiologique des margines étudiées.....	Erreur ! Signet non défini.
Tableau 4 : Diamètres des zones d'inhibitions des margines en mm	28
Tableau 5: Conditions et résultats des essais au FeCl_3	Erreur ! Signet non défini.
Tableau 6: Conditions et résultats des essais au Sulfate d'Aluminium	31
Tableau 7: Turbidité et volume de boue de la margine traitée par les différents coagulants	Erreur ! Signet non défini.

Liste des Figures

- Figure 1 : Evolution de la superficie de culture de l'olivier au Maroc. **Erreur ! Signet non défini.**
- Figure 2 : Evolution de la production de l'huile d'olive au Maroc. **Erreur ! Signet non défini.**
- Figure 3 : Répartition de la production mondiale de l'huile d'olive (%) pendant les 5 dernières années (2003 2008). **Erreur ! Signet non défini.**
- Figure 4. Répartition et capacités de trituration des unités artisanales et industrielles au Maro. **Erreur ! Signet non défini.**
- Figure 5 : Schéma de l'industrie oléicole équipée d'un procédé triphasique avec le système de presse.....**Erreur ! Signet non défini.**
- Figure 6 : Appareillage de jar-test..... **Erreur ! Signet non défini.**
- Figure7 : Evolution de l'absorbance en fonction de la longueur d'onde..... **Erreur ! Signet non défini.**
- Figure 8 : Activité antibactérienne des margines vis-à-vis des bactéries testées.**Erreur ! Signet non défini.**
- Figure 9: Activité antibactérienne des composés phénoliques vis-à-vis les bactéries testées..... **Erreur ! Signet non défini.**
- Figure 10: Volume des boues décantées dans le traitement au FeCl_3 **Erreur ! Signet non défini.**
- Figure 11: Variation de la turbidité et du volume des boues en fonction de la dose de FeCl_3 **Erreur ! Signet non défini.**
- Figure 12: Variation de la turbidité et du volume des boues avec la dose de sulfate d'aluminium **Erreur ! Signet non défini.**
- Figure 13 : Echantillons de margine traitée par le sulfate d'aluminium et le chlorure ferrique.. **Erreur ! Signet non défini.**
- Figure 14: Absorbance de surnageant en fonction de la longueur d'onde ... **Erreur ! Signet non défini.**
- Figure15 : Evolution des composés phénoliques dans les différents types de margines**Erreur ! Signet non défini.**
- Figure 16: Le taux d'abattement des composés phénoliques (CP) pour les 3 souches testées...**Erreur ! Signet non défini.**

Figure 17 : L'activité antibactérienne après le traitement par coagulation- floculation **Erreur ! Signet non défini.**

Figure 18 : L'activité antibactérienne après le traitement biologique.....**Erreur ! Signet non défini.**

Table des matières

Introduction.....	1
I. Le Secteur oléicole au Maroc.....	Erreur ! Signet non défini.
I.1. L'olivier	Erreur ! Signet non défini.
I.2. L'huile d'olive.....	Erreur ! Signet non défini.
I.3. Les unités de trituration d'olives au Maroc.....	Erreur ! Signet non défini.
I.4. Sous produits de l'oléiculture.....	Erreur ! Signet non défini.
I.5. caractéristiques chimiques et microbiologiques des margines.....	Erreur ! Signet non défini.
I.5.1.Composition chimique des margines	Erreur ! Signet non défini.
I.5.2. Caractéristiques microbiologiques	Erreur ! Signet non défini.
I.6. Problématique environnementale générée par les margines	10
I.6.1.Pollution de l'air.....	Erreur ! Signet non défini.
I.6.2.Pollution des eaux	Erreur ! Signet non défini.
I.6.3.Pollution du sol	11
I.7. Les traitements des margines	Erreur ! Signet non défini.
I.7.1. Procédés thermiques.....	Erreur ! Signet non défini.
I.7.2. Procédés physiques	Erreur ! Signet non défini.
I.7.3. Procédés chimiques.....	Erreur ! Signet non défini.
I.7.4. Traitements biologiques	Erreur ! Signet non défini.
I.7.5. Procédés combinés	Erreur ! Signet non défini.
I.8. Valorisation des margines	Erreur ! Signet non défini.
II. Matériels et méthodes	Erreur ! Signet non défini.

II.1. Echantillonnage	Erreur ! Signet non défini.
II.2. Etude physico-chimique des margines	Erreur ! Signet non défini.
II.3. Etude microbiologique des margines.....	Erreur ! Signet non défini.
II.3.1. Dénombrement	Erreur ! Signet non défini.
II.4. L'activité antibactérienne des margines.....	Erreur ! Signet non défini.
II.4.1. Préparation des margines:	Erreur ! Signet non défini.
II.4.2. Les souches testées:	Erreur ! Signet non défini.
II.4.3. Les dilutions réalisées des margines visqueuses :.....	Erreur ! Signet non défini.
II.4.4. Activité antimicrobienne par la méthode de diffusion sur disque	Erreur ! Signet non défini.
II.5. Préparation des extraits phénoliques.....	Erreur ! Signet non défini.
II.5.1. Méthode d'extraction des polyphénols à partir des margines brute.....	Erreur ! Signet non défini.
II.5.2. Extraction des composés phénoliques à l'acétate d'éthyle	Erreur ! Signet non défini.
II.5.2.1. Délipidation des margine	Erreur ! Signet non défini.
II.5.2.2. Extraction à l'acétate d'éthyle	Erreur ! Signet non défini.
II.6. Traitement physico-chimique	Erreur ! Signet non défini.
II.6.1. La méthode coagulation-floculation	Erreur ! Signet non défini.
II.6.2. Techniques expérimentales.....	Erreur ! Signet non défini.
II.7. La Biotraitement	Erreur ! Signet non défini.
II.7.1. Mode opératoire.....	Erreur ! Signet non défini.
II.7.2. Dosage des composés phénolique par colorimétrie	Erreur ! Signet non défini.
II.8. Test d'activité antibactérienne après le traitement par coagulation-floculation ..	Erreur ! Signet non défini.
II.8. Test d'activité antibactérienne après le traitement biologique.....	25
III. Résultats et discussion.....	Erreur ! Signet non défini.
III.1. Les caractéristiques physico-chimique des margines.....	Erreur ! Signet non défini.
III.2. Caractérisation microbiologique	Erreur ! Signet non défini.
III.2.1. Dénombrement des micro-organismes	Erreur ! Signet non défini.
III.3. L'activité antibactérienne	Erreur ! Signet non défini.
III.4. L'activité antibactérienne des composés phénoliques extraits des margines	Erreur ! Signet non défini.
III.5. Traitement physicochimique des margines	Erreur ! Signet non défini.
III.6. Taux d'abattement des composés phénoliques par traitement physico-chimique.....	Erreur ! Signet non défini.

III.7. Le taux d'abattement des composés phénoliques après le traitement biologique	Erreur ! Signet non défini.
III.8. L'activité antibactérienne après le traitement par coagulation- floculation. .	Erreur ! Signet non défini.
III.9. L'activité antibactérienne après le traitement biologique.....	Erreur ! Signet non défini.
Conclusion et perspectives	Erreur ! Signet non défini.

Introduction

Le Maroc est parmi les pays méditerranéens producteurs d'huile d'olive. Cette industrie bénéfique pour l'économie nationale engendre deux résidus : l'un solide : les grignons et l'autre liquide : les margines. Les grignons sont réutilisés en agriculture et en industries, alors que les margines sont rejetées directement dans les égouts. Les critères de pollution des margines se limitent à trois facteurs principaux :

- ✓ L'acidité,
- ✓ La conductivité élevée due à l'ajout du sel lors du stockage des olives avant leur trituration,
- ✓ La concentration élevée en matière organique représentée essentiellement par les composés phénoliques qui sont responsables de la toxicité et de la coloration brune-rougeâtre à noire des margines.

De ce fait, le rejet de ces effluents dans les rivières et les égouts sans aucun traitement préalable présente un impact négatif sur l'environnement car les margines contiennent des composés phénoliques toxiques qui provoquent la pollution des eaux superficielles et souterraines, et qui ont des effets antimicrobiens vis-à-vis des communautés microbiennes du sol et aussi des pouvoirs phytotoxiques [1,2]. Les margines culminent aussi des composés azotés, des sucres, des acides organiques, et des pectines ce qui augmentent leur charge organique. Ainsi, la variabilité des caractéristiques physico-chimiques des margines est fonction des conditions climatiques, des cultures d'olives, du degré de maturation des fruits, de la durée de stockage et enfin du procédé d'extraction [3].

Ces considérations ont conduit plusieurs chercheurs à opter pour la voie adéquate du traitement et de valorisation des margines pour limiter leur pollution [4,5]. Mais jusqu'à présent les différents types de traitement des margines étudiés ne résolvent qu'en partie le problème et la plupart des procédés proposés restent insuffisants et incomplets voire même limités.

- Le traitement physique ne permet qu'une simple séparation de l'eau des matières en suspension. Ce qui engendre l'apparition de boues en fin de traitement dont la gestion n'est pas tout à fait rationnelle.
- Le traitement chimique des margines demande de grandes quantités de réactifs, en raison de la richesse en matières organiques et minérales.
- Le traitement biologique classique aérobie nécessite de fortes dilutions pour que le processus ne soit pas inhibé par les composés phénoliques toxiques. De plus, ce système aérobie demande une énergie très importante pour l'aération et le brassage du milieu.
- Le traitement biologique anaérobie est limité par des problèmes d'acidification, de toxicité et de biodégradabilité.

Les margines ne peuvent donc être traitées par un simple procédé biologique, physique ou chimique. Une série de traitements s'avère nécessaire pour réduire la forte concentration en composés phénolique.

C'est dans cette vision de combinaison des traitements des margines que s'inscrit notre étude. Nous avons alors mené deux procédés combinés de traitement des margines de la

région de Fès. Le premier traitement physico-chimique consiste à des coagulations-floculations des margines alors que le second traitement biologique fait intervenir les potentialités épuratoires des champignons du genre *Aspergillus et Candida* ce qui a permis une nette réduction des taux de composés phénoliques des margines. Nous avons en parallèle mis au point une caractérisation physico-chimique et microbiologique de ces margines et nous avons testés les effets antibactériens que manifestent leur composés phénoliques.

I. Le Secteur oléicole au Maroc

I.1. L'olivier

L'olivier constitue la principale espèce fruitière plantée au Maroc, il occupe une surface de 650 000 ha [6] soit plus de 58% de la superficie arboricole totale (Figure1).

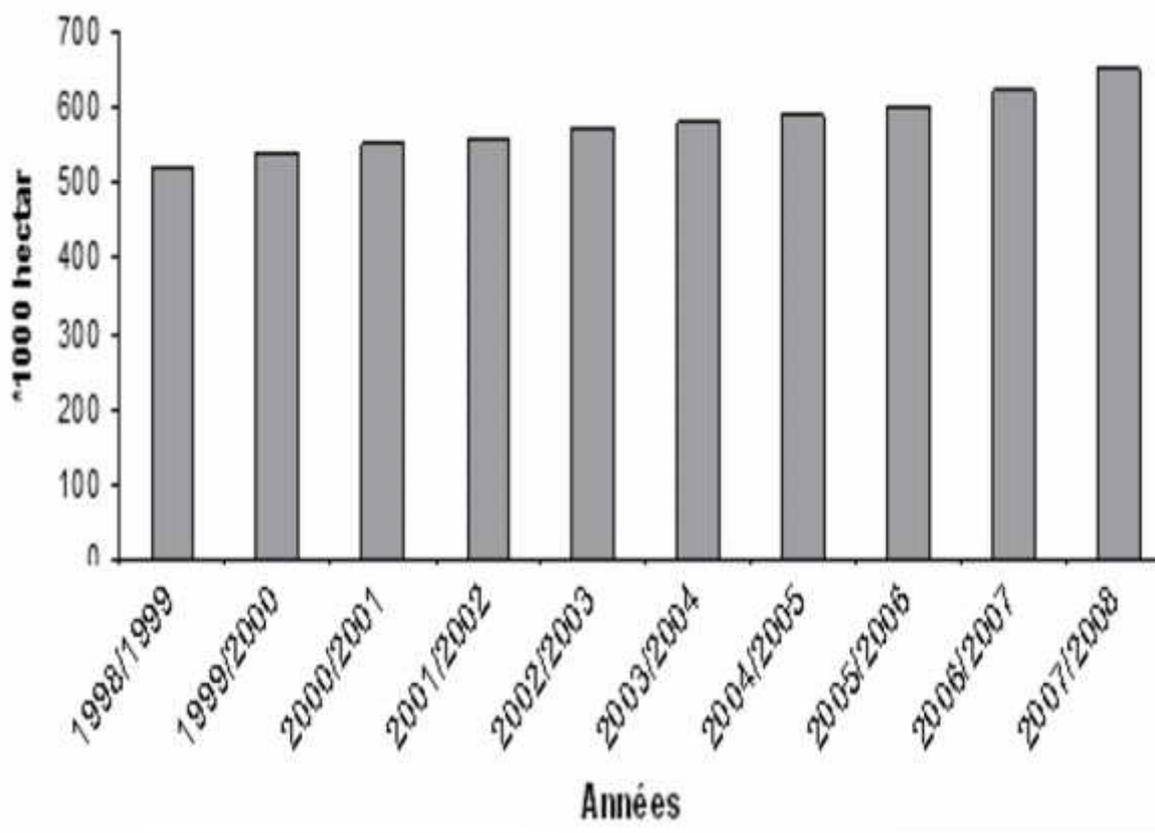


Figure 1 : Evolution de la superficie de culture de l'olivier au Maroc [6].

I.2. L'huile d'olive

La production d'olives enregistrée en 2007/2008 est de l'ordre de 750.000 tonnes [6]. La variété Picholine marocaine représente 95% des variétés cultivées au Maroc, pour produire à la fois, les olives de table (4ème place mondiale) et l'huile d'olive (HO). Malgré le caractère fluctuant de la production d'HO, son évolution depuis 2002 montre une tendance à la hausse qui est due essentiellement à une extension des superficies plutôt qu'à une amélioration des rendements (oscillant entre 0,7 et 1,7 T.Ha⁻¹[7] lesquels rendements restent faibles comparativement aux autres pays oléicoles (Grèce : 1,7 T.Ha⁻¹, Espagne : 1,6 T.Ha⁻¹) [8]. La production en 2003-2004 a connu une exception, avec une production d'huile d'olive de 112 000 tonnes (Figure 2). Le Maroc occupe ainsi le sixième rang mondial parmi les producteurs du pourtour méditerranéen, qui génère près de 95% de la production mondiale en huile d'olive (Figure 3).

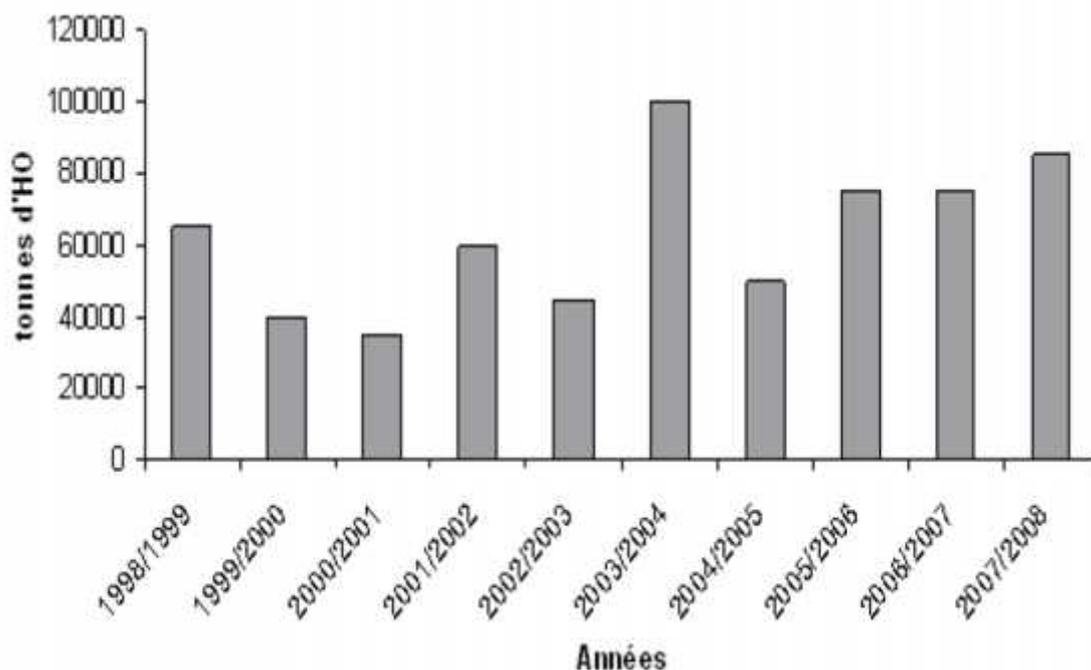


Figure 2 : Evolution de la production de l'huile d'olive au Maroc [6].

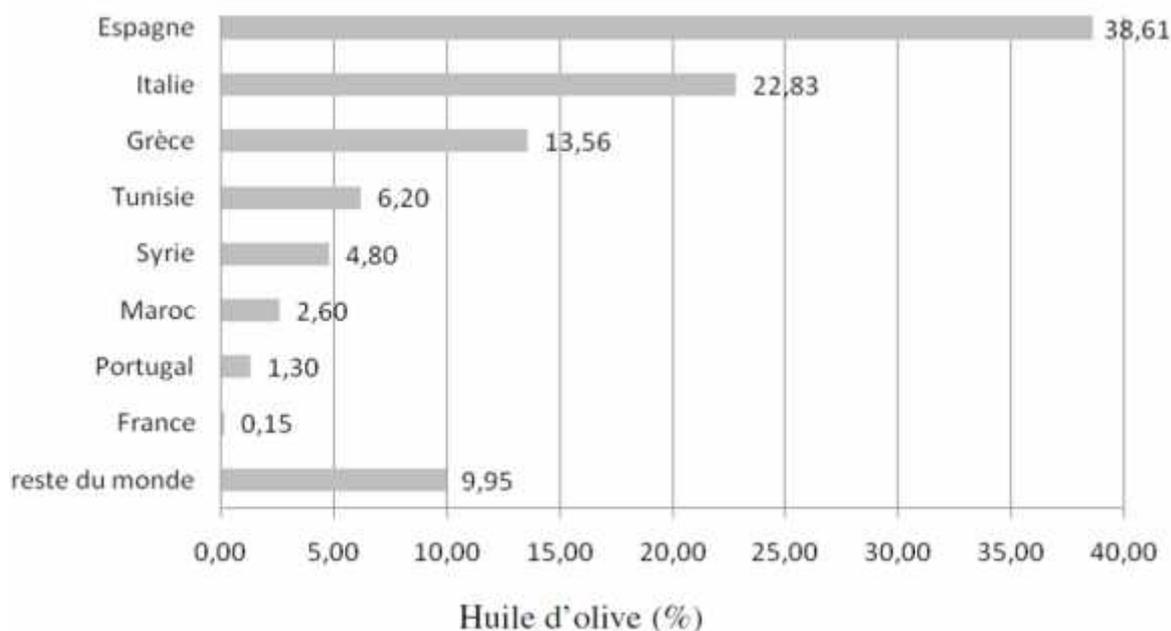


Figure 3 : Répartition de la production mondiale de l'huile d'olive (%) pendant les 5 dernières années (2003-2008) [8].

I.3. Les unités de trituration d'olives au Maroc

Au Maroc, le secteur de trituration d'olive est caractérisé par la coexistence de moulins traditionnels (*maâsras*) et d'unités semi-industrielles et industrielles. Concernant le secteur traditionnel, on note l'existence de plus de 15 600 *maâsras* avec une capacité annuelle de trituration qui couvre près de 50% de la production nationale, alors que le secteur moderne et

semi-moderne est représenté par 334 unités ayant une capacité minimale de trituration d'environ 10 tonnes/jour et susceptible d'être augmentée de façon substantielle (Figure 4).

Les maâsras fonctionnent majoritairement avec le procédé triphasique par le système de presse ou de centrifugation; et ce procédé génère deux types d'effluents solides (grignons d'olive) et liquide (margines d'olive). En plus le Maroc a introduit le procédé à deux phases qui génère des grignons humides (50 et 60 %), et une faible production de margines.

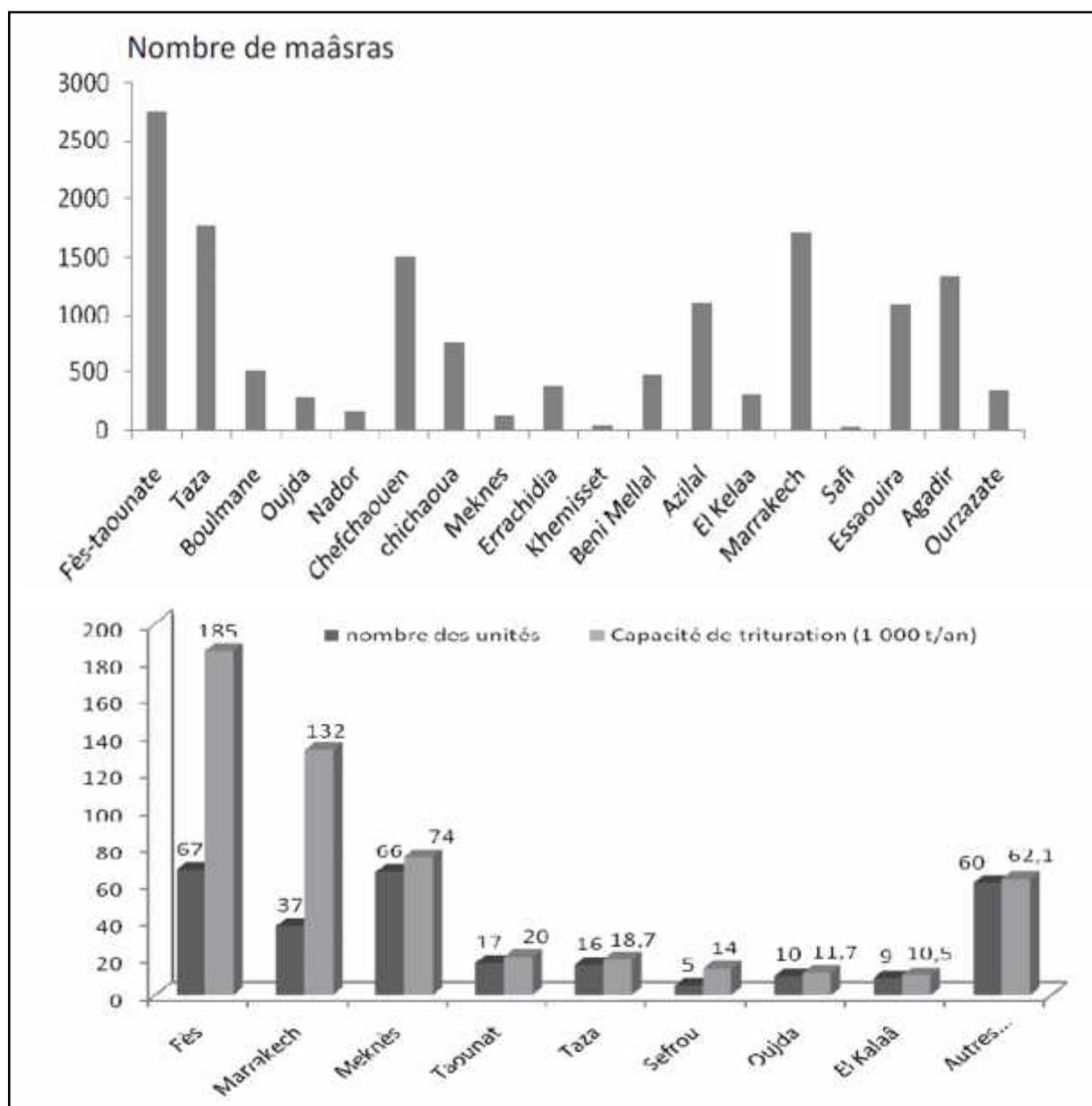


Figure 4. Répartition et capacités de trituration des unités artisanales et industrielles au Maroc [6].

Dans les maâsras fonctionnant avec le système de presse, les olives sont broyées et malaxées à l'aide de broyeurs comportant une ou deux meules qui tournent avec une énergie

électrique. La pâte d'olive obtenue est répartie manuellement dans des sacs qui sont ensuite empilés sous des presses hydrauliques. Il en résulte, après pression, un résidu solide appelé grignon brut et un moût huileux constitué de l'eau de végétation (les margines) et de l'huile d'olive. La récupération de l'huile est obtenue après décantation accompagnée d'une séparation par une centrifugation (Figure 5).

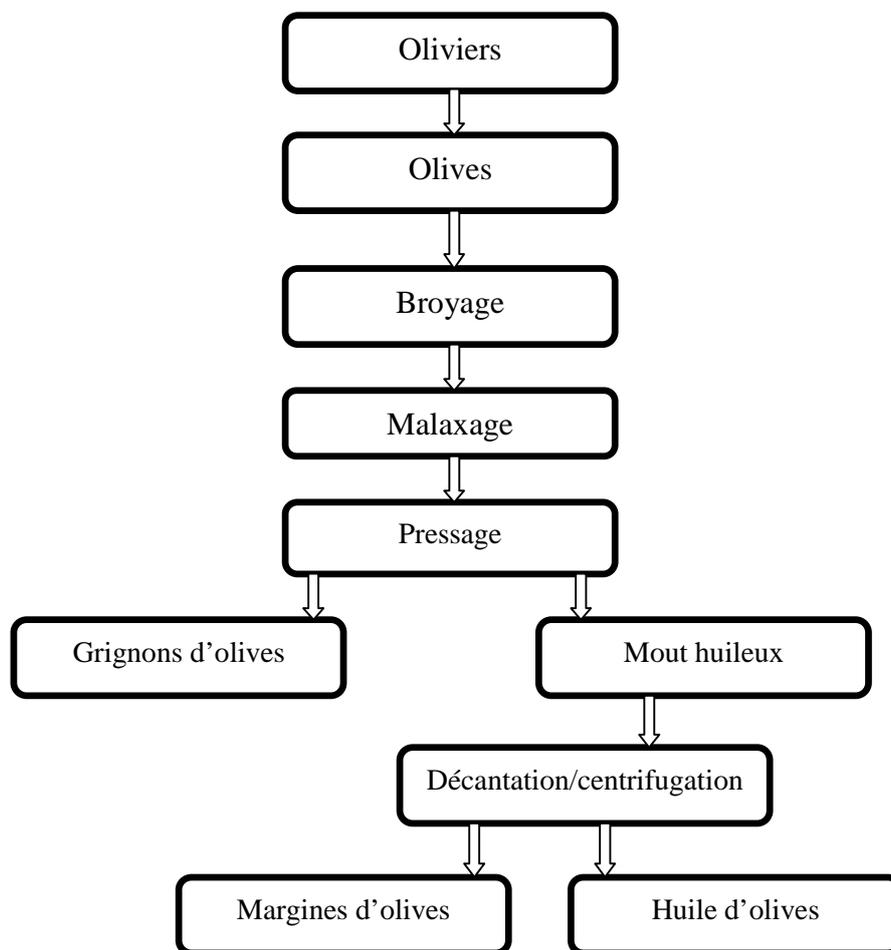


Figure 5 : Schéma de l'industrie oléicole équipée d'un procédé triphasique avec le système de presse [9].

I.4. Sous produits de l'oléiculture

L'industrie oléicole, en plus de sa production principale qui est l'huile (l'huile d'olive vierge et l'huile de grignon), engendre la production de deux résidus : un liquide et l'autre solide

- Grignons ou tourteaux d'olive : sont des résidus solides issus de la première pression ou centrifugation, ils sont formés des pulpes et des noyaux d'olives.

- Margine ou eau de végétation : un liquide légèrement acide (pH = 4,5 à 5), de couleur violet foncé intense qui vire vers le noir; d'odeur forte de l'huile d'olive, de goût amer, de degré élevé de pollution organique (protéines, lipides, glucides et polyphénols).

I.5. caractéristiques chimiques et microbiologiques des margines

I.5.1. Composition chimique des margines

De nombreuses études sur la composition des margines ont montré qu'elles comportent approximativement 83 à 94 % d'eau, 4 à 16 % de matières organiques et 0,4 à 2,5 % de substances minérales [10-15].

Tableau 1: la composition chimique des margines [22]

composants	Massique %
Matière sèche	1,4 -17
Matière minérales	10-15
Sucres divers	30-50
Graisses et huiles diverses	12-35
Composés phénolique	5-25
Azote organique	10

Les caractéristiques et le composition complexe et hétérogène des margines dépend de plusieurs facteurs : le stage de maturation des olives, les conditions climatiques, la variété des oliviers, le système de culture, la situation géographique, le temps de stockage des olives avant la trituration, les techniques et le lieu de stockage, la nature de conservation des olives et le procédé d'extraction d'huile d'olive [16-22].

a. Fraction minérale

Les margines comportent des quantités significatives de sels minéraux (tableau). Une proportion de 80% de ces sels sont solubles (phosphate, sulfates et chlorures) et 20% sont insolubles (carbonates et silicates) [23].

Tableau 2: la composition minérale des margines [23].

Espèces	Concentration (mg .l)
Orthophosphate	800,6
Chlorures	270,2
Sulfate	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	41,7
Zinc	10,0

b. Fraction organique

Les margines comportent deux fractions organique : la fraction insoluble qui représente les matières en suspension et colloïdales et fraction soluble qui représente les sucres, les lipides, les acides organiques, et les composés phénoliques [24].

b. 1. Sucres

La teneur en glucides varie entre 2 et 8% du poids de la pulpe d'olive fraîche. Les glucides rencontrés contiennent principalement des composés ligno-cellulosique et des pectines qui représentent respectivement 3% et 0,6%.d'autres sucre simple comme le glucose, le saccharose, le mannose, l'arabinose, le raffinose et le xylose sont aussi présent [25- 26].

b.2. Composés azotés

Les protéines représentent la fraction azotée avec une concentration qui varie de 1,2 à 2.4%.dans les margines presque tous les acides aminés sont présents.les plus abondants sont l'acide aspartique, l'acide glutamique, la proline et la glycine [27].

b.3. Vitamine

Les plus fréquentes sont les vitamines du groupe et la vitamine PP avec une concentration de 124 mg.kg⁻¹ de teneur qui peut être exploitée à l'échelle industrielle [23].

b.4. Acides organique

Les principaux acides organiques rencontrés dans les margines sont les acides : fumarique, glycérique, lactique, malique et malonique. Leur proportion varie entre 0,5 et 1,5% [23].

b. 5. Huile

La concentration des acides gras contenue dans les margines dépend du procédé d'extraction utilisé, elle varie entre 0,02 et 1%. l'acide oléique est le plus abondant, il représente 65% de la totalité d'huile [23].

b.6. Composés phénoliques

Les composés phénoliques des margines sont très divers et leur structure est très variable. Ils proviennent de l'hydrolyse enzymatique des glucides et des esters de la pulpe d'olive au cours du processus d'extraction.

b. 6.1. Les monomères phénoliques

Plusieurs monomères aromatiques ont été identifiés dans les margines par des techniques de chromatographie (HPLC ou CPG). Ils sont représentés essentiellement par des acides et des alcools phénoliques.

i. Acides phénoliques

Les acides phénoliques sont les monomères les plus abondants dans les margines, ce qui explique leur acidité. Plusieurs acides phénoliques ont été identifiés dans différents types de margines :

- Acide caféique [28, 29]
- Acide p-coumarique [28 ,29]
- Acide protocatéchuique [28,29]
- Acide vanillique [28,29]
- Acide 4-hydroxyphénylacétique [29]
- Acide syringique [29]
- Acide p-hydroxybenzoïque [29]
- Acide vétratrique [30]

ii. Alcools phénoliques

Parmi les alcools phénoliques les plus rencontrés dans les margines, nous citons :

- 4-Hydroxyphényléthanol [28].
- 3,4-dihydroxyphényléthanol [28] appelé aussi hydroxytyrosol.
- 4-hydroxyphényléthanol (tyrosol) [29].
- Syringaldéhyde [29].

Ces alcools peuvent être parfois liés à des glucosides comme le 4-diglucoside (3,4 dihydroxyphényl) éthanol.

b.6.2. Les polymères phénoliques

Les polyphénols identifiés dans les margines sont essentiellement :

- Les anthocyanes.
- Les tannins : leur structure est très complexe, leur concentration peut atteindre 12 g.l^{-1} [31-33]. Ils sont classés conventionnellement en tanins hydrolysables et tanins condensés.

b.6.3. Autres composés phénoliques : [34]

D'autres composés phénoliques monomères ont été identifiés :

- Oleuropéine
- L-caféyl- glucose
- Apéguine
- Lutéoline

I.5.2. Caractéristiques microbiologiques

Dans les margines d'olive, seuls quelques microorganismes arrivent à se développer. Ce sont essentiellement des levures et des moisissures. Dans la plupart des cas, il y a absence de microorganismes pathogènes et ils ne posent alors aucun problème de point de vue sanitaire. Le pouvoir antimicrobien des margines [35] est lié essentiellement à l'action exercée par les composés phénolique et les pigments bruns ou catéchol-mélaninique [36]. Ces effluents agissent sur les bactéries en dénaturant les protéines cellulaires et en altérant les membranes [37]. Ils peuvent inhiber également l'activité des bactéries symbiotiques fixatrices d'azote dans le tube digestif des ruminants en inhibant leur activité enzymatique [38].

I.6. Problématique environnementale générée par les margines

Les grignons ne posent pas de problèmes particuliers pour l'environnement et connaissent à l'heure actuelle diverses voies d'utilisation et de valorisation telles que : la production de charbon de bois et la possibilité éventuelle d'exploitation des éclats de bois pour la fabrication de la pâte à papier. En revanche, les margines constituent une source d'inquiétude au Maroc. Elles créent d'importantes nuisances et perturbations du milieu récepteur. Ces effluents sont

acides et extrêmement chargés en matières organiques qui contiennent essentiellement des composés phénoliques provenant de la pulpe d'olive. D'où la forte activité polluante des margines sur les eaux de surface. Le rejet des margines des industries productrices d'huile d'olives est un problème majeur surtout pour les pays du bassin méditerranéen du fait qu'elles renferment une fraction organique importante et provoquent plusieurs type de pollution.

I.6.1.Pollution de l'air

Les mauvaises odeurs posent des problèmes de pollution de l'air par le taux élevé d'ammoniaque et d'autres gaz produits lors du traitement des ces effluents.

I.6.2.Pollution des eaux

Les résidus métalliques et organiques, la demande biologique et chimique en oxygène constituent une source de pollution de l'eau qui se transmet vers les eaux souterraines et superficielles du globe terrestre .Puisque les margines sont le plus souvent rejetés dans les récepteurs naturels des cours d'eau, sans aucun traitement préalable, ce qui empêche ces eaux de s'autoépurer. En effet les margines contiennent des concentrations élevées en phosphores et en tannins, en plus, une large quantité de nutriments:

- Les phosphores accélèrent le développement des algues et augmentent la probabilité d'une eutrophisation entraînant un déséquilibre écologique dans les eaux naturelles.
- La présence des tannins, provenant de l'olive et se trouvant dans les margines, provoque une décoloration de ces eaux.
- Alors que, les nutriments entraînent une augmentation des microorganismes qui infectent les eaux et les rendent dangereuses pour la vie aquatique.

De plus, la marge contient des quantités élevées de sucres et de lipides. Les sucres provoquent une augmentation de la population microbienne, par conséquent une augmentation de la consommation d'oxygène dissout, donc une réduction de sa disponibilité pour d'autres organismes vivants. Les lipides forment un film imperméable, ce qui empêche la pénétration des rayons lumineux et de l'oxygène.

I.6.3.Pollution du sol

Les composés phénoliques, les acides organiques, et la haute salinité (conductivité élevée) peuvent causer des effets phytotoxiques sur les oliviers [39]. Ils provoquent une diminution de la matière sèche en diminuant la disponibilité de l'azote, en plus de leur toxicité pour certains micro- organismes [40]. Les acides, les éléments minéraux et les substances organiques

aboutissent à une destruction de la capacité d'échange cationique du sol (CEC), par suite, une réduction de la fertilité du sol.

La grande variété des composantes trouvées dans les margines nécessitent des technologies différentes de traitement pour éliminer les agents polluants ayant des effets nocifs sur l'environnement.

I.7. Les traitements des margines

Jusqu'à nos jours, le traitement des margines constitue un problème complexe vue la qualité et la quantité des substances chimiques qu'elles renferment. En effet, l'application d'un traitement simple s'avère insuffisant et incomplet [41]. Dans cette partie, on va exposer seulement les principales technologies disponibles pour le Traitement et / ou l'épuration des déchets générés dans la production de l'huile d'olive. Toutefois, les procédés de traitement envisageables pour l'élimination de la charge polluante des margines peuvent être classés selon quatre catégories, et peuvent être utilisés seuls ou combinés :

- Procédés thermique,
- Procédés physique,
- Procédés chimique,
- procédés biologiques.

Le choix du système de traitement approprié est lié à plusieurs facteurs locaux, à savoir le système utilisé pour l'extraction d'huile, la possibilité de stockage et le rapport entre la charge produite par les huileries et la population locale [42].

I.7.1. Procédés thermiques

➤ Evaporation naturelle

L'évaporation dépend étroitement de la vitesse du vent, du degré d'ensoleillement et de l'humidité de l'air. Ce procédé consiste à stocker les margines dans des bassins de faibles profondeur (0,7 à 1,5 m). Elles sont ensuite séchées pendant plusieurs semaines, voire plusieurs mois selon les conditions climatiques. Cette méthode simple permet d'éviter le rejet des margines dans les égouts et dans les rivières. Mais ce système présente aussi plusieurs inconvénients, tels que :

- problèmes d'esthétiques et odeurs nauséabondes,
- faible biodégradation,

- formation d'une pellicule lipidique étanche à la surface qui entrave la pénétration de la lumière et limite l'évaporation naturelle,
- **Evaporation forcée**

Pour pallier les problèmes de l'évaporation naturelle, des panneaux évaporateurs dans les bassins de stockage des margines ont introduit. Ainsi, elles sont pompées puis projetées par des asperseurs sur les panneaux juxtaposés, ayant une importante surface d'échange d'air. Cette installation permet de faciliter l'évaporation de la phase aqueuse des margines de 100 à 300 m²/m³ du bassin. Parmi les inconvénients de cette méthode; le dégagement de mauvaises odeurs et l'importance du coût d'énergie dépensée.

I.7.2. Procédés physiques

- **Procédé des membranes**

Les procédés à membranes comme l'ultrafiltration et l'osmose inverse, s'emploient souvent dans le traitement de certains courants liquides résiduaux, ceci permettant d'éliminer les polluants de l'eau en générant un courant liquide et un courant concentré;

- **Procédé de bio-filtration**

Ces procédés s'emploient fréquemment pour éliminer les solides des eaux résiduaux. Les solides contenus dans l'eau sont retenus en formant un tourteau qui augmente la résistance au passage du déchet, augmentant en même temps l'efficacité de la filtration et aussi le coût opérationnel. Dans les filtres conventionnels, les composés dissous passent avec le déchet aqueux et restent à l'état brut. Cependant, les procédés de bio-filtration sont une exception, dans ce cas le filtre, le filtre sert en plus de nutriment pour les bactéries, donnant lieu à un procédé de dégradation biologique des substances organiques dissoutes. Les installations de bio-filtration éliminent 100% les solides et entre 70-80% des composés organiques dissous.

Avantages.

- rétention des solides
- élimination d'une grande partie des composés organiques dissous.
- Inconvénients:
- engorgement du filtre et le pouvoir polluant élevé du concentrât (tourteau) résultant.
- coût d'investissement trop élevé.

Une variation ou alternative à la bio-filtration est l'adsorption.

- **L'adsorption**

L'adsorption consiste la concentration du polluant organique dans un support solide avec une grande superficie spécifique, généralement du charbon actif (500—1500 m²/g). Dans le traitement des margines, le principal objectif de l'adsorption est celui de biodégrader les composés organiques ayant des effets bactéricides, inhibiteurs ou colorants (tanins -phénols).

I.7.3. Procédés chimiques

➤ **Oxydation humide**

On procède à l'oxydation des substances organiques en phase liquide, en se servant de l'oxygène ou d'un autre oxydant chimique tel que (ozone ou peroxyde d'oxygène). Le procédé se fait à hautes pressions (10à220 Bars) et à des températures relativement élevées (120-330°C), le procédé d'oxydation fournit du CO₂ et H₂O; mais ce procédé nécessite aussi un traitement aérobie. Malgré son efficacité, ce traitement n'a pu être réalisé à l'échelle industrielle son coût d'investissement reste trop élevé.

➤ **coagulation – floculation**

Le principe de la technique de la coagulation-floculation est basé sur la déstabilisation des particules en suspension par l'injection et la dispersion rapide de produits chimiques afin de favoriser leur agglomération et de permettre leur décantation. Les particules en suspension les plus difficiles à éliminer dans les eaux à traiter sont celles qui possèdent une très petite taille (particules colloïdales causant la turbidité) et celles qui sont dissoutes (matières organiques causant la coloration). Ces colloïdes portent habituellement une charge électrique négative qui empêche les particules de s'agglomérer les unes aux autres pour former des particules plus volumineuses (flocs) et faciliter leur élimination par sédimentation et filtration.

Le but de la coagulation est de neutraliser les charges de ces particules afin de favoriser la formation d'un agglomérat. Pour ce faire, on introduit habituellement dans l'eau à traiter un produit chimique nommé « coagulant », le plus souvent des sels d'aluminium ou de fer.

I.7.4. Traitements biologiques

Ils sont basés sur la croissance des microorganismes aux dépens des matières organique (matières en suspension et matières dissoutes), biodégradables, qui constituent, pour eux, des Aliments. La dégradation biologique à l'opposé des autres procédés est considérée comme une méthode plus saine, efficace et moins coûteuse pour la réduction des polluants.

➤ **Traitement aérobie des margines**

Plusieurs études ont été réalisées sur le traitement aérobie des margines, par des cultures pures de micro-organismes tels que *Aspergillus niger*, *Azotobacter chroococcum*, *Azotobacter vinelandii*, *Aspergillus terreus*, *Phanerochaete chrysosporium* et *Pleurotus ostreatus* [43]. D'autres travaux ont prouvé l'efficacité du traitement aérobie par des cultures mixtes. Une dégradation considérable de deux composés phénoliques les plus représentatifs dans les margines (tyrosol et l'acide caféique) a été obtenue en utilisant les micro-organismes isolés des margines [44].

Ainsi d'autres chercheurs ont étudié le prétraitement des margines par *Aspergillus niger* afin de réduire leur effet inhibiteur vis-à-vis des bactéries méthanogènes. Des taux d'abattement de 60% et de 58% pour la DCO et les composés phénoliques ont été enregistrés respectivement. Les margines prétraitées ont subi ensuite une digestion anaérobie [45-46]. Alors que des souches de *Penicillium sp.* isolé à partir des margines capables de dégrader les polyphénols et de produire la biomasse à partir des margines brutes (DCO : 120 g d'O₂.l⁻¹). Les résultats enregistrent un taux de réduction de la DCO qui se situe entre 61,82% et 74,75%.

Au Maroc, le traitement aérobie des margines à pH neutre par les micro-organismes du sol a permis d'éliminer 70% des composés phénoliques et de réduire 63% de la DCO initiale [47]. D'autres travaux ont prouvé l'efficacité du traitement aérobie des margines par *Phanerochaete chrysosporium*. Les résultats de cette étude ont révélé des taux d'abattement de la DCO et des polyphénols de l'ordre de 73% et 83% respectivement après 12 jours d'incubation pour une DCO initiale de 50 g d'O₂.l⁻¹. Une élimination de la DCO de l'ordre de 55%, 52,5% et 62,8% a été obtenue avec des margines traitées en aérobiose par *Geothricum sp.*, *Aspergillus sp.* et *Candida tropicalis* respectivement [48].

L'inconvénient majeur du traitement aérobie est la consommation excessive d'oxygène. En général, le traitement des margines par l'application seule des procédés biologiques a donné des résultats insuffisants [49]. Ceci est dû en grande partie à la présence de fortes charges organiques polluantes représentées particulièrement par les composés phénoliques.

➤ **Traitement anaérobie des margines**

La fermentation anaérobie peut être utilisée comme un moyen de traitement et d'exploitation des margines [43]. En effet, la digestion anaérobie des margines offre des avantages significatifs en matière de réduction de la consommation d'énergie et de la

production de boues. De plus, elle a révélé des performances élevées en comparaison avec le traitement anaérobie d'autres rejets industriels agroalimentaires. Parmi les avantages de ce type de traitement :

- les bactéries anaérobies ont la capacité de transformer en méthane la plupart des substances organiques présentes,
- la demande de nutriments est faible,
- les mauvaises odeurs ne sont pas émises.

Le traitement anaérobie des margines comprend plusieurs procédés tels que les digesteurs contact anaérobies, le lit de boues à flux ascendant (Upflow Anaérobie Sludge Blanked - UASB) et les lit de boues à filtre anaérobie.

I.7.5. Procédés combinés

Les margines ne peuvent être traitées par un simple procédé biologique, physique ou chimique. Une série de traitements s'avère nécessaire pour réduire la forte concentration en composés phénolique.

➤ **Traitement des margines par électrocoagulation et bio-méthanisation**

Pour répondre aux besoins des industries productrices d'huiles d'olives des pays méditerranéens, un procédé de traitement des margines par électrocoagulation et bio méthanisation a été développé, le couplage de ces deux procédés représente une solution adaptée au problème de l'élimination des margines : la bio-méthanisation permet la transformation de la matière organique en substances chimiques diverses en condition d'anaérobiose et sous l'action de bactéries présentes dans le milieu. Ce procédé permet la formation de biogaz, seulement l'action des bactéries, est dans le cas des margines fortement ralentie par la présence de polyphénols contenus dans les margines, substances toxiques contenus dans ces eaux, un prétraitement est donc nécessaire et se fait par électrocoagulation. L'électrocoagulation est un procédé d'électrolyse qui permet la séparation des margines en boues et en liquides biodégradables. Par ailleurs, les polyphénols et certains autres produits toxiques (métaux lourds) sont éliminés. Les boues sont extraites et vont au compostage, les liquides sont acheminés vers le biométhaniseur.

Parallèlement aux recherches réalisées sur le traitement des margines, des études de valorisation ont été effectuées.

I.8. Valorisation des margines

Les margines sont riches en éléments nutritifs minéraux et organiques. Ce critère a amené les chercheurs à mettre au point de nombreux procédés de valorisation et d'exploitation des margines aussi bien à l'échelle de laboratoire qu'à l'échelle pilote. Cette valorisation a pour objectif l'élimination des composés phénoliques d'une part et l'utilisation des margines dans les domaines de la biotechnologie, de la chimie et de l'agriculture d'autre part.

➤ **Production de biogaz**

L'application du processus de la digestion anaérobie aux margines permet de transformer environ 80% des substances organiques en biogaz (65 à 70% de méthane). Ainsi, la fermentation méthanique permet la dépollution des margines tout en produisant de l'énergie [50].

➤ **Utilisation des margines en compostage**

Le compostage est l'une des techniques de recyclage des margines et leur transformation en fertilisant. Les margines sont absorbées sur un substrat solide avant d'être utilisées comme un compost [51]. donc, ce compost s'obtient principalement par dégradation aérobie-anaérobie de substance organique des résidus solides (margine + résidus agricoles) . Afin que ce processus se réalise, il faut prolonger le temps de contact de ces résidus agricoles dans les margines dont le taux en substances organiques et minérales appropriées pour mener à bien le processus d'obtention du compost [52].

➤ **Récupération de quelques composants**

L'expérience dans ce domaine est très récente et les résultats sont encore à l'état embryonnaire il s'agit en particulier, de la récupération des composants aromatiques et phénoliques et des solutions de glucides. Les composants aromatiques sont obtenus par distillation sous vide et les arômes sont récupérés par extraction aux solvants (hexane puis chloroforme); les principaux composants sont des terpènes, des dérivés benzéniques, des éthers.

- les extraits phénoliques ont été comparés aux anti-oxydants de synthèses les plus connues (BHA: butylhydroxyanisol, BHT: butylhydroxytoluène) dans des essais de résistance à l'oxydation. Il a été constaté que l'addition de l'extrait de margine protège de l'oxydation de manière plus efficace que l'addition du BHA.
- le coût de production de ces extraits des margines est inférieur à celui des antioxydants de synthèse. L'avantage supplémentaire est l'utilisation de

substances naturelles propre d'un aliment millénaire. La fraction des margines peut être utilisée pour la production de biomasse, riche en glucides et fermentescible [52].

II. Matériels et méthodes

Dans ce chapitre, nous avons décrit le matériel et les méthodes généraux utilisés lors des protocoles expérimentaux.

II.1. Echantillonnage

Les margines qui ont servi lors de notre étude sont prélevées d'une unité de trituration d'olives de la région Hamria à Fès.

II.2. Etude physico-chimique des margines

La caractérisation physico-chimique a été basée sur l'étude des paramètres suivants : la conductivité, les composés phénoliques, le pH, la turbidité, et la salinité. Cette caractérisation concernant le margine brute et le margine dilué 1/10.

- **pH**

Le pH est mesuré à l'aide d'un pH-mètre type (HANNA instruments modèle 210).

- **Les composés phénoliques**

Ces composés contenus dans les margines sont déterminés par spectrophotométrie selon la méthode [53].

- **Conductivité électrique, et la salinité**

La conductivité, la salinité et TDS sont mesurés à l'aide d'un conductimètre de type inoLabLevel 1. La conductivité est exprimée en mS/cm.

- **La turbidité**

La turbidité est mesurée à l'aide d'un turbidimètre de type AQUA LYTIC modèle AL250T-IR, elle est exprimée en NTU.

- **L'intensité de la couleur**

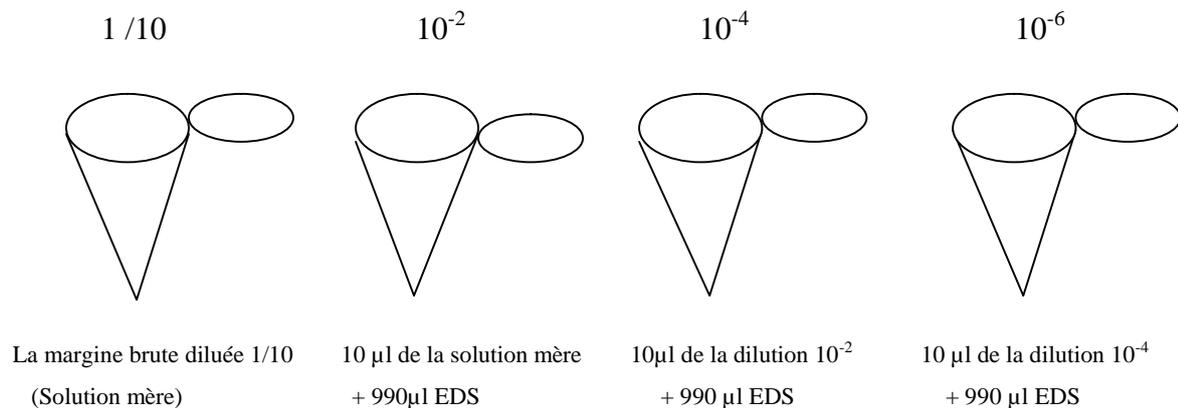
L'intensité de la couleur a été déterminée par la mesure de l'absorbance à l'intervalle [430-710nm] (spectrophotomètre visible (JENWAY modèle 6051)).

II.3. Etude microbiologique des margines

Les analyses microbiologiques des margines sont réalisées à travers le dénombrement des bactéries, des levures et des champignons.

II.3.1. Dénombrement

L'analyse microbiologique des échantillons a été réalisée dès réception au laboratoire, afin d'éviter toute contamination. Après homogénéisation des margines, une série de dilutions dans de l'eau distillée stérile est réalisée. Un volume de 0,1 ml de chaque dilution appropriée est étalé sur des boîtes de Pétri contenant le milieu gélosé de choix.

**Les bactéries :**

Le milieu de culture utilisé est le milieu LB, l'incubation des boîtes étalées est effectuée à 37°C pendant 24 heures.

Champignons :

Le milieu EM est le milieu de culture est utilisé, l'incubation des boîtes ensemencées est réalisée à 30°C pendant 3 à 7 jours.

Levures :

Le milieu YPG est choisi pour cette culture, nous avons ajouté le Kanamycine sulfate (25 μ g.ml⁻¹) Comme antibiotiques afin d'inhiber la croissance bactérienne. L'incubation est faite à 30°C pendant 48 à 72 heures.

II.4. L'activité antibactérienne des margines**II.4.1. Préparation des margines:**

Les margines ont subi une filtration pour éliminer les matières solides flottantes puis ces effluents ont été concentrées par évaporation à 103°C

II.4.2. Les souches testées:

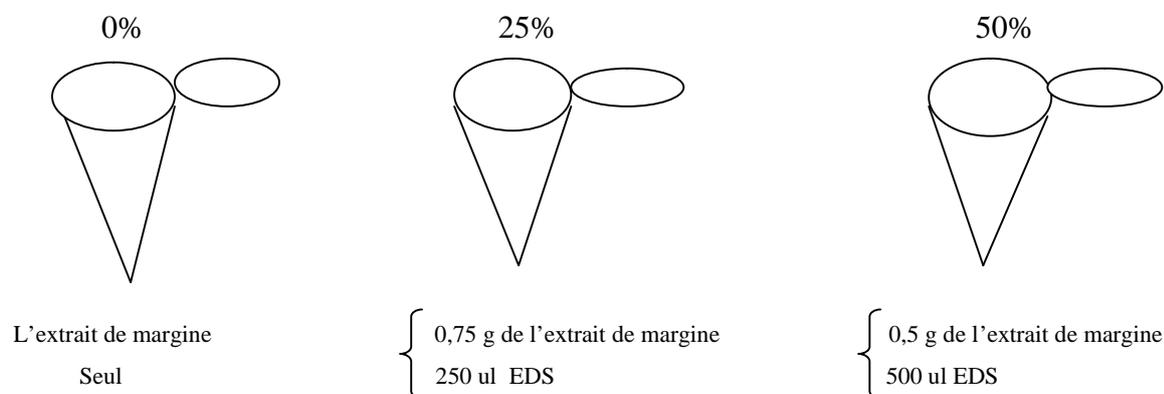
Nous avons ciblé six microorganismes (originaire de Laboratoire de Biotechnologie Microbienne) pour les tests de l'activité antimicrobienne

- ✓ *Escherichia coli*
- ✓ *Salmonella*
- ✓ *Pseudomonas aeruginosa*
- ✓ *Staphylococcus aureus*
- ✓ *Bacillus cereus*

✓ *Bacillus subtilis*

II.4.3. Les dilutions réalisées des margines visqueuses :

En vue de tester les activités antibactériennes des margines nous avons opté de travailler sur trois dilutions différentes.



II.4.4. Activité antimicrobienne par la méthode de diffusion sur disque

L'activité antimicrobienne a été réalisée en utilisant la méthode de diffusion sur les milieux gélose de LB pour les bactéries. Ainsi, les milieux LB sont uniformément ensemencés à l'aide d'un écouvillon stérile par une suspension en saline (NaCl 0,9%) de la souche à étudier, préalablement ajustée à l'aide de l'étalon 0,5 McFarland a une turbidité environ de 10^8 bactéries/ ml. Des disques en papier absorbant de Whatman de 6 mm de diamètre sont stérilisés à l'autoclave (121°C pendant 20 minutes). Ils sont imbibés par les margines à tester (introduits dans les flacons contenant les margines évaporés de différent concentration). Les disques ainsi préparés sont déposés sur les milieux de LB. Après 24 h d'incubation à 37°C. Le diamètre des auréoles d'inhibition est mesuré. Les manipulations sont répétées 2 fois pour chaque test.

II.5. Préparation des extraits phénoliques

II.5.1. Méthode d'extraction des polyphénols à partir des margines brute

L'extraction des composés phénoliques à partir des margines brutes est une extraction de type liquide-liquide qui repose sur le principe de solubilité dans les solvants organiques. Le choix du solvant dépend de la nature des composés à extraire, de leur solubilité dans le solvant et de la nature du matériel végétal.

II.5.2. Extraction des composés phénoliques à l'acétate d'éthyle

Les composés phénoliques contenus dans les margines sont extraits selon la méthode [54]. Les margines doivent, au préalable, subir un prétraitement par l'hexane pour éliminer les

lipides .il s'agit d'une extraction liquide-liquide à l'acétate d'éthyle celui-ci souvent utilisé pour ce type d'extraction [55].

II.5.2.1. Délipidation des margine

5 ml de margines sont ajoutées à 5 ml d'hexane (V/V). La solution est mélangée pendant 3min. Le mélange subit ensuite une agitation suivie d'une décantation pendant 10 min. les margines délipidées sont recueillies après séparation complète en deux phases : l'hexane (surnageant) et les margines délipidées (phase aqueuse) prêtes à une extraction liquide-liquide.

II.5.2.2. Extraction à l'acétate d'éthyle

L'acétate d'éthyle est additionné aux margines délipidées (V/V). L'ensemble est homogénéisé, après une centrifugation à 5000 rpm/12min, le mélange est complètement séparé en deux phases : l'acétate d'éthyle riche en polyphénols en surnageant et les margines en culot. La phase organique riche en composés phénoliques subit une évaporation sous vide dans un évaporateur rotatif à 75°C. Ces extraits phénoliques obtenus ont servi aux teste d'activité antibactérienne vis-à-vis des six souches choisies.

II.6. Traitement physico-chimique

II.6.1. La méthode coagulation-floculation

➤ Principe de la méthode de JAR TEST

La méthode Jar-test repose sur le phénomène de coagulation floculation : une série de 4 béchers agités de la même façon. Cette série comportant les mêmes échantillons des margines est soumise à des doses croissantes du coagulant afin de déterminer la dose optimale. Les résultats sont appréciés visuellement ou par la mesure de la turbidité.

Ce processus comprend trois phases :

- **Agitation rapide** : le coagulant est introduit dans l'échantillon répandu rapidement et uniformément.
- **Coagulation** : Le but de la coagulation est de neutraliser les charges de ces particules afin de favoriser la formation d'un agglomérat.
- **Floculation** : correspond par définition à la formation des flocs qui sont des agrégats particulaires. C'est la deuxième étape de la formation des particules décan tables à partir des colloïdes déstabilisées. Ceci est du à une agitation lente, qui transforme les particules en flocons de plus grande taille pour permettre la séparation par décantation.

➤ **Conditions d'essais :**

Tous les essais ont été effectués en pratiquant, successivement, une agitation rapide (200tr/min) pendant 10 minutes, une agitation lente (45tr/min) pendant 30 minutes et enfin une décantation pendant 3 heures. Les paramètres suivis dans le surnageant recueilli après la décantation sont tel que le pH, la turbidité, la conductivité, le volume des boues décantées et la coloration du surnageant.

➤ **Réactif**

-Margine

-La solution de HCL pour baisser le pH ou la solution de NaOH (2N) pour l'augmenter.

-Sulfate d'Alumine A12 (SO₄)₃.

-Chlorure ferrique FeCl₃.

➤ **Appareillage:**

-Jar-test.

-pH mètre

-Conductimètre

-Turbidimètre

-Spectrophotomètre

II.6.2. Techniques expérimentales

Dans une série de 4 béchers nous avons introduit 40 ml de margine brute ajustée avec 400 ml d'eau, puis le pH est ajusté selon le coagulant utilisé. Nous avons ensuite exploité des doses croissantes du coagulant. Le mélange est laissé sous agitation rapide durant 10 minutes puis sous-agitation lente pendant 30 minutes. L'agitation est enfin arrêtée et la solution est transvasée dans éprouvette graduée. Le mélange est laissé pendant 3 heures pour une décantation. Nous avons alors prélevé un volume du surnageant pour mesurer la turbidité. La turbidité des eaux usées étudiées renseigne en fait sur l'efficacité du traitement par chaque dose de coagulant. Nous avons mesuré d'une part le pH, la conductivité, les volumes des boues décantées du surnageant pour les différentes concentrations et d'une autre part nous avons suivi visuellement la coloration du surnageant de chaque concentration. Et enfin nous avons réalisé aussi le dosage des composés phénoliques présents dans le surnageant après traitement physicochimique.

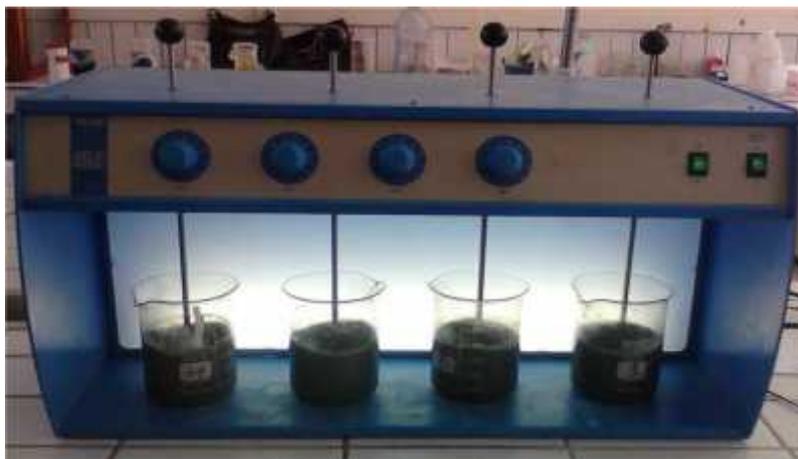


Figure 6 : Appareillage de jar-test

II.7. La Biotraitement

Deux espèces de levures *Candida albicans* et *Candida tropicalis* et une espèce de champignon *Aspergillus niger* sont sélectionnées pour le traitement des margines.

II.7.1. Mode opératoire

Des volumes de 20 ml de différent type de margines (le margine brute, diluée et les différent margine traitée) par coagulation-floculation sont mis dans des Erlenmeyers de 250 ml. Ces Erlenmeyers sont stérilisés par autoclavage à une température de 120°C pendant 20 minutes. Ensuite ajout d'un 1ml de la souche en suspension .Après incubation à 30°C sous agitation pendant 48 heures, un échantillon de 5 ml est prélevé et centrifugé. Le surnageant est utilisé pour doser les composés phénoliques.

II.7.2. Dosage des composés phénolique par colorimétrie

Les composés phénoliques sont déterminés par la méthode spectrophotométrique [53].Elle est basée sur la réduction d'un mélange d'acide phosphotungstique (Réactif de Folin-Dennis). Les monophénols et les polyphénols réduisent ce réactif à un mélange bleu d'oxyde de tungstène et de molybdène. La coloration produite présente un maximum d'absorption à 765 nm. Les résultats sont exprimés en équivalent de gramme d'acide galique par litre d'échantillon utilisé dans la gamme étalon.

A 1 ml de l'extrait dilué (1ml de l'extrait phénolique +4ml eau distillée), sont ajoutés 500 ul d'eau distillée, 500 ul de la solution de carbonate de sodium (Na_2CO_3) puis 500 ul du réactif Folin- Ciocalteu. Après 30 min d'incubation à 40°C et à l'obscurité, l'absorbance est

mesurée à 765 nm au spectrophotomètre contre un blanc sans extrait. La quantification des composés phénoliques a été faite en fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire de la forme $y = ax$ réalisée en utilisant l'acide gallique comme référence. Les résultats seront donc exprimés en équivalents d'acide gallique.

II.8. Test d'activité antibactérienne après le traitement par coagulation-floculation

Nous avons choisi les margines traitées par la dose optimale de Fe Cl_3 et de $\text{Al}_2 (\text{SO}_4)_3$. Elles ont été concentrées par l'évaporation à 103°C , pour éliminer l'eau puis L'activité antimicrobienne est réalisée en utilisant la méthode de diffusion sur disque.

II.8. Test d'activité antibactérienne après le traitement biologique

Les échantillons traités par la dose optimale de Fe Cl_3 et de $\text{Al}_2 (\text{SO}_4)_3$ ont ensuite subi un traitement biologique. De la même façon, ces échantillons ont été concentrés par l'évaporation 103°C , puis L'activité antimicrobienne de ces margines est étudiée en utilisant la méthode de dif

III. Résultats et discussion

III.1. Les caractéristiques physico-chimique des margines

Les margines présentent un rejet fortement pollué sous forme de liquide résiduel dont la composition est variable. Cette variabilité dépend du type d'olives (l'espèce picholine marocaine est la plus dominante au Maroc), du degré de leur maturation (selon la période de collecte), des systèmes de culture, de la pratique de salage pour la conservation des olives, des conditions climatiques et du procédé utilisé pour l'extraction d'huile d'olive [56]. Les margines se caractérisent aussi par une odeur nauséabonde qui s'accroît au fur et à mesure de leur stockage. Dès le premier aperçu des margines, on a constaté qu'elles représentent une coloration brune à brune-rougeâtre, qui devient de plus en plus sombre au cours de leur stockage, avec un aspect trouble et une odeur forte qui rappelle celle d'huile d'olive. Chaque analyse est répétée deux fois.

- **Le pH**

La mesure du pH effectuée donne une valeur de l'ordre de 4,5. Les margines sont donc des effluents acides, en raison de la présence des acides organiques (acides phénoliques, acides gras...). La valeur enregistrée dans notre étude se trouve dans la limite inférieure de la fourchette citée dans la littérature (4,5 à 6). Cette variation dépend des facteurs mentionnés ci-dessus.

- **La conductivité électrique et la salinité**

Les margines étudiées ont une conductivité électrique trop élevée de l'ordre de 7 mS.cm⁻¹ et une salinité de 4,7. Ces valeurs reflètent la teneur élevée en sels présents dans ces effluents. En effet, en plus de la richesse naturelle en sels minéraux, les olives sont conservées au niveau des usines dans le sel commercial, ce qui confère aux margines une forte conductivité électrique.

- **Les composés phénoliques**

Ces rejets sont aussi caractérisés par la prédominance de substances toxiques notamment les composés phénoliques (4,3 g/l) qui leur confèrent un pouvoir antimicrobien. Cette concentration élevée pourrait limiter toute biodégradation naturelle, et par conséquent pourrait entraîner une perturbation profonde de tout écosystème.

- **la turbidité**

Ces margines présentent une turbidité de l'ordre de 667 NTU en raison des teneurs élevées en matières en suspension et en substances organiques.

Après l'opération de dilution (1/10), les caractéristiques des margines montrent une faible augmentation du pH (4,9), une diminution de la turbidité (100 NTU), de la conductivité (2,02mS/cm à 23,3°C) de la salinité (0,9) et des composés phénoliques (0,55g/l).

- **L'intensité de la couleur**

Un suivi par spectrophotométrie a été réalisé sur l'effluent dans la zone du visible (depuis la longueur d'onde 430 nm jusqu'à 710 nm). Ceci en vue de mesurer les absorbances correspondantes. La figure 7 représente la variation de l'absorbance en fonction de la longueur d'onde.

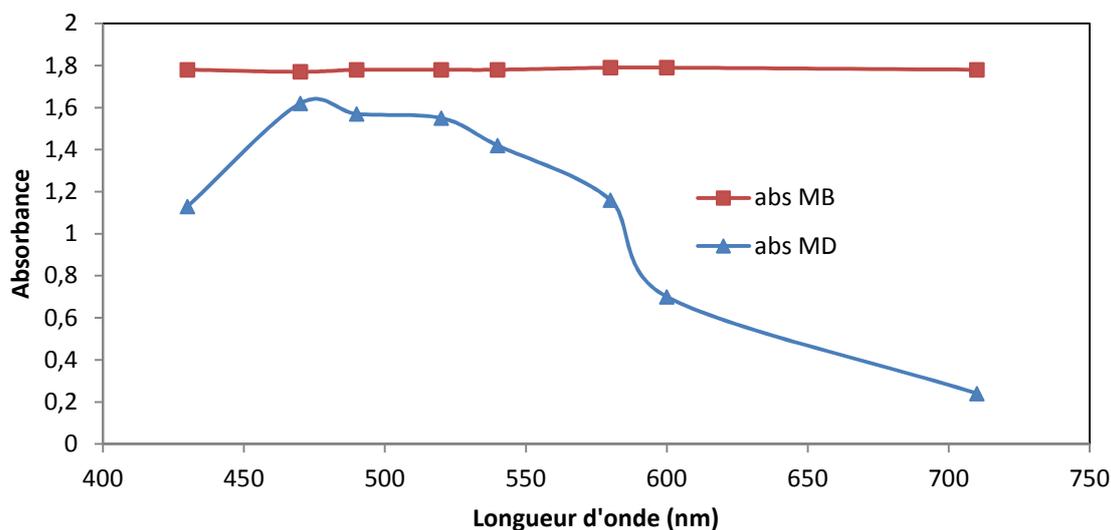


Figure7 : Evolution de l'absorbance en fonction de la longueur d'onde.

On remarque que les margines brutes présentent de fortes absorbances pour toute la gamme du visible (de 430 à 710 nm). Cependant les margines diluées montrent une diminution des absorbances notamment à partir de $\lambda = 520$ nm.

III.2. Caractérisation microbiologique

Pour ce volet de notre étude nous nous sommes intéressées au dénombrement des micro-organismes des margines pour établir l'effet des composés phénoliques sur la biomasse microbiennes de ces effluents et aussi pour une mise en évidence des microorganismes capables de survivre dans ces conditions.

III.2.1. Dénombrement des micro-organismes

Les résultats du dénombrement des germes présentés dans le tableau 3. Ceci montrent que les levures et les champignons qui sont respectivement de l'ordre de $4 \cdot 10^6$ UFC.ml⁻¹ et $6 \cdot 10^6$ UFC.ml⁻¹ représentent la flore majoritaire de cet effluent. Ces données sont en accord avec les résultats obtenus par d'autres auteurs qui ont montré que dans les margines, les champignons et les levures sont capables de se développer plus que les bactéries [57]. Ceci serait lié aux caractéristiques physico-chimiques des margines qui inhibent la croissance bactérienne

notamment la présence des substances antimicrobiennes (composés phénoliques, tanins, acides gras).

Tableau 3: Caractérisation microbiologique des margines étudiées

Flore microbienne	UFC/ml
Les champignons	$6 \cdot 10^6$
Les levures	$4 \cdot 10^6$
Les bactéries	0

D'après cette étude microbiologique nous avons conclu que les margines étudiées renferment une charge microbienne importante. L'étude physico-chimique effectuée sur ces margines a montré qu'elles sont caractérisées par une forte pollution organique. L'activité et la croissance des micro-organismes seraient probablement influencées par la forte concentration des composés phénoliques.

III.3. L'activité antibactérienne

La méthode de diffusion sur disques nous a permis de mettre en évidence l'activité antibactérienne des margines sur des bactéries pathogènes (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *Salmonella*, *S. aureus*, *B. cereus*, *B. subtilis*). Les résultats de cette l'activité se manifestent différemment sur les six bactéries testées montrant ainsi différents diamètres des zones d'inhibitions (entre 9 et 16 mm), (Tableau 4). Nous avons aussi constaté que cet effet antibactérien est plus important sur les bactéries gram positives (auréole de 11 à 16 mm) (Figure 8).

Tableau 4 : Diamètres des zones d'inhibitions des margines en mm

Bactéries	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Salmonella</i>	<i>E.coli</i>
0%	17	16	13	12	10	12
25%	15	15	11	10	9	10
50%	12	14	10	10	9	11

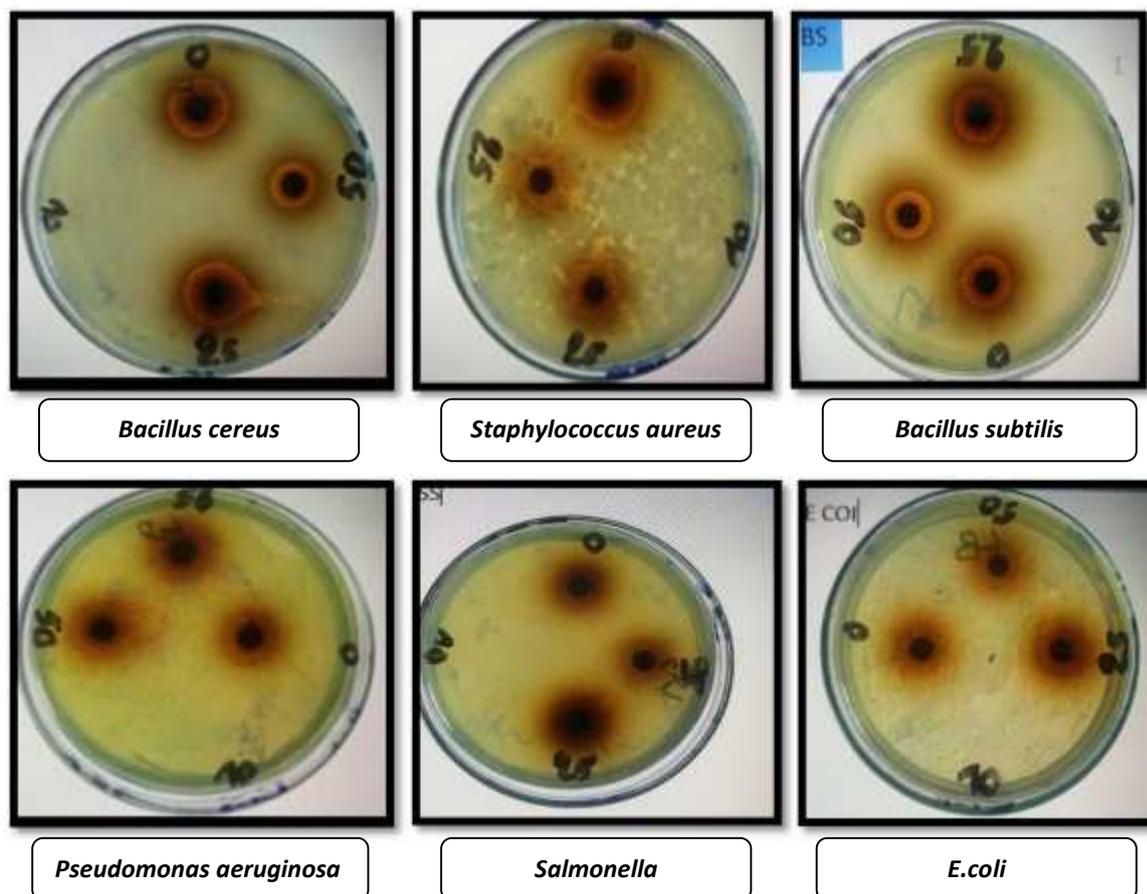
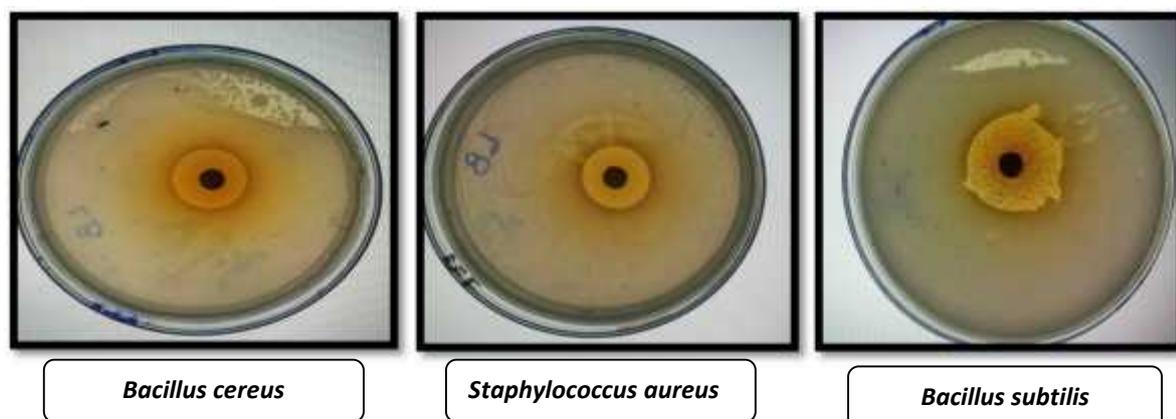


Figure 8 : Activité antibactérienne des margines vis-à-vis des bactéries testées.

III.4. L'activité antibactérienne des composés phénoliques extraits des margines

Les composés phénoliques des margines seraient le principal facteur du pouvoir antibactérien. Pour confirmer cette déduction nous avons testé l'effet des composés phénoliques (extraits des margines) sur la multiplication des bactéries testées (figure 8).



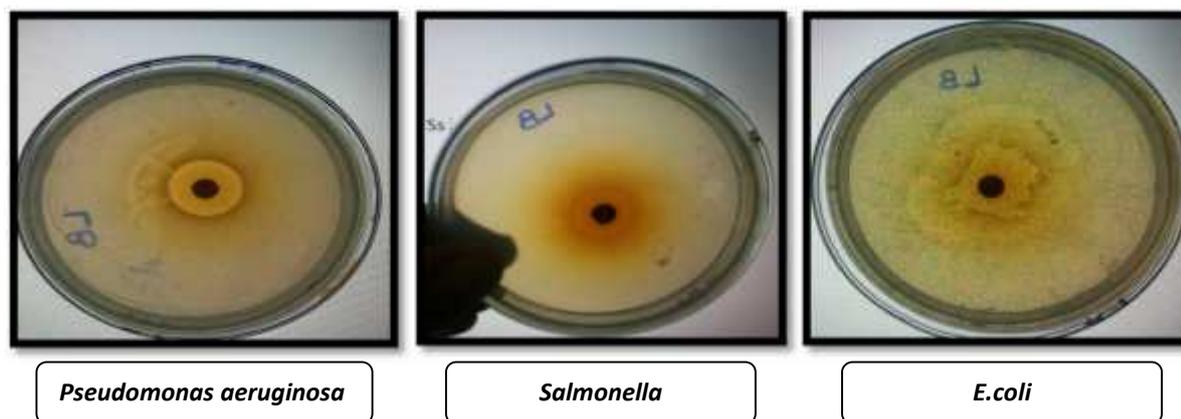


Figure 9: Activité antibactérienne des composés phénoliques vis-à-vis les bactéries testées

D'après ces résultats les composés phénoliques confèrent aux margines un pouvoir antibactérien [57-59], car d'une part ces composés sont caractérisés par une très forte réticulation et aussi une dénaturation des protéines, d'une autre part en raison de leur chaîne latérale acide [60]. Les acides phénoliques sont beaucoup moins polaires. Cette propriété peut faciliter le transport de ces molécules à travers la membrane cellulaire. Ils sont capables de complexer avec les protéines extracellulaires solubles et aussi avec les parois bactériennes comme c'est le cas des quinones. Les flavonoïdes (plus lipophiles) peuvent également perturber les membranes microbiennes [61].

III.5. Traitement physicochimique des margines

Dans cette partie, nous avons réalisés une étude du traitement des margines par une méthode physico-chimique de coagulation-floculation. Ceci en vue de comparer d'une part l'efficacité de ce traitement des margines avec celui des micro-organismes. D'autres parts, pour combiner les deux types de traitements visant une meilleure efficacité de l'abattement des composés phénoliques des margines.

- **traitement au chlorure ferrique**

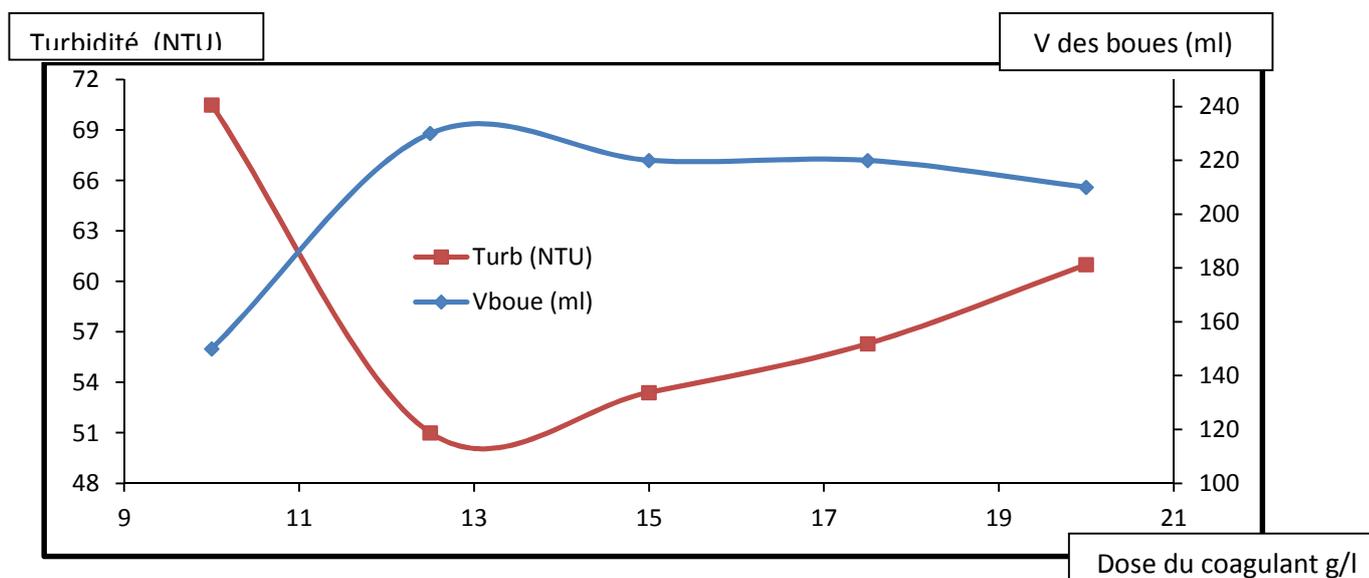
Les conditions et les résultats des essais de coagulation utilisant le chlorure ferrique comme coagulant sont illustrés sur le tableau 5. Tous les essais ont été réalisés avec un ajustement de pH aux environs de 7. En effet, cette zone correspond à la zone de pH optimale de FeCl_3 . Signalons que l'addition progressive de chlorure ferrique aux margines provoque une baisse du pH de 4,9 à 1,19. Un ajustement de pH à 7 était donc nécessaire pour permettre une bonne coagulation-floculation. Concernant le volume de boue, nous l'avons mesuré en fonction du temps de décantation (8 heures). Les résultats sont présentés sur le tableau 5.

Tableau 5: Conditions et résultats des essais au FeCl_3

Essai	Quantité de coagulant (g/l)	pH après l'ajout de coagulant	pH ajusté	Volume de boue (ml)	Turbidité (NTU)
1	10	1.08	7.63	150	70.5
2	12.5	1.19	7.66	230	51.0
3	15	1.10	6.58	220	53.4
4	17.5	1.06	6.75	220	56.3
5	20	1.00	7.40	210	61.0

Figure 10: Volume des boues décantées dans le traitement au FeCl_3

La figure 11 montre alors l'évolution de la turbidité et du volume des boues décantées en fonction de la dose du coagulant lors du traitement au FeCl_3 .

Figure 11: Variation de la turbidité et du volume des boues en fonction de la dose de FeCl_3

On constate que la turbidité est minimale pour une quantité de 12,5 g/l (FeCl_3) puis elle augmente au fur et à mesure que la dose du coagulant augmente. Le volume des boues est maximal aux environs de 12,5 g/l (FeCl_3) et diminue avec l'ajout du coagulant. On obtient des décolorations pour les doses à partir de 12,5g/l (FeCl_3). On peut donc conclure que la dose optimale de 12,5 g/l de FeCl_3 permet un bon abattement de la turbidité (90.14 %) et une bonne décoloration. Ce coagulant permet donc de produire un maximum de volume des boues (575ml/l) suite au traitement des margine diluées.

- **traitement au sulfate d'aluminium**

Les conditions et les résultats des essais de coagulation utilisant le sulfate d'aluminium sont illustrés sur le tableau 6. Le pH est ajusté dans ce cas à une valeur de 6,50.

Tableau 6: Conditions et résultats des essais au Sulfate d'Aluminium

Essai	Quantité de coagulant (g/l)	pH après l'ajout de coagulant	pH ajusté	Volume de boue (ml)	Turbidité (NTU)
1	15	3.43	6.61	190	39.2
2	17.5	3.40	6.56	205	38.0
3	20	3.40	6.59	210	34.4
4	22.5	3.40	6.65	295	32.2
5	25	3.34	6.55	240	33.0

La figure 12 présente l'évolution de la turbidité et du volume des boues décantées en fonction de la dose du coagulant (sulfate d'aluminium).

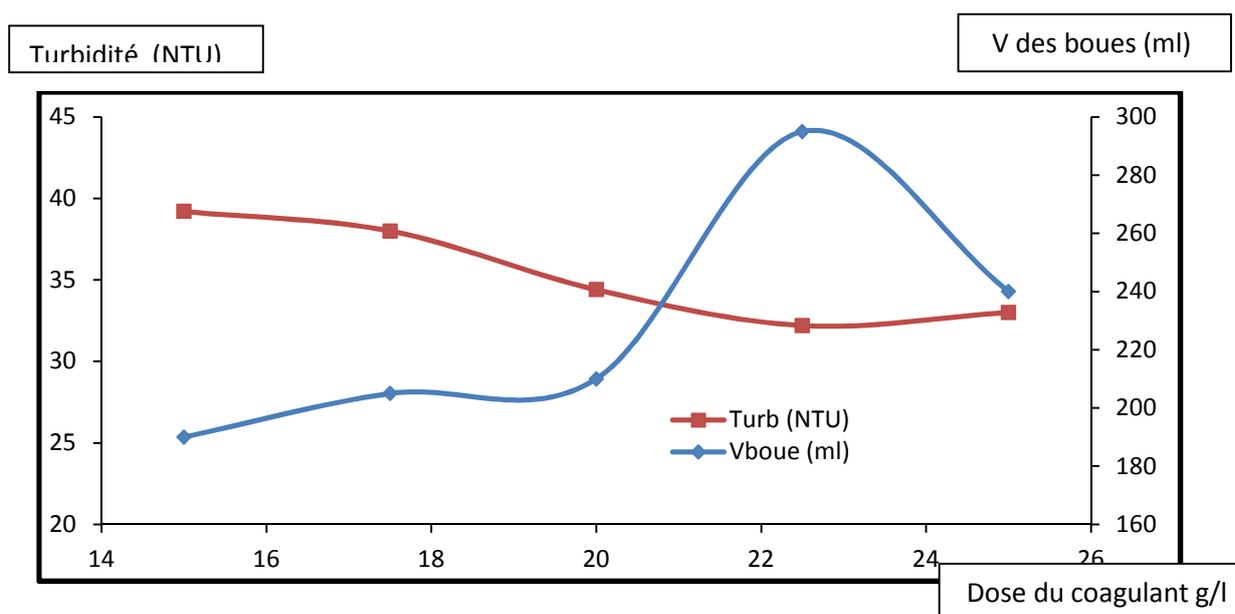


Figure 12: Variation de la turbidité et du volume des boues avec la dose de sulfate d'aluminium

Comme dans le cas du chlorure ferrique, et après observation de l'évolution des différents paramètres, nous avons conclu que, la dose de 22.5 g/l de sulfate d'aluminium permet une meilleure diminution de la turbidité (96.81 %) et une bonne décoloration. Le maximum de boues produites sont de 737.5 ml/l des margines diluées.

- **Comparaison des résultats de coagulation obtenus**

Le tableau 7 résume les résultats des essais effectués pour les deux types de coagulants (sulfate d'aluminium et chlorure ferrique) et aussi les paramètres (Turbidité et volume des boues) correspondant à la dose optimale.

Tableau 7: Turbidité et volume de boue de la margine traitée par les différents coagulants

Coagulant	Quantité de coagulant (g/l)	Volume de boue (ml)	Turbidité (NTU)
Chlorure ferrique	12.5	230	51.0
Sulfate d'aluminium	22.5	295	32.2

La figure 13 représente les deux échantillons correspondant aux doses optimales des margines traitées à l'aide des deux coagulants (sulfate d'aluminium et chlorure ferrique). On note une bonne décoloration dans les deux cas. Cependant la décoloration est nettement meilleure pour le traitement avec le sulfate d'aluminium.



Figure 13 : Echantillons de margine traitée par le sulfate d'aluminium et le chlorure ferrique

La figure 14 montre la variation de l'absorbance des margines traitées par le chlorure ferrique et le sulfate d'aluminium en fonction de la longueur d'onde dans l'intervalle [430-710] nm.

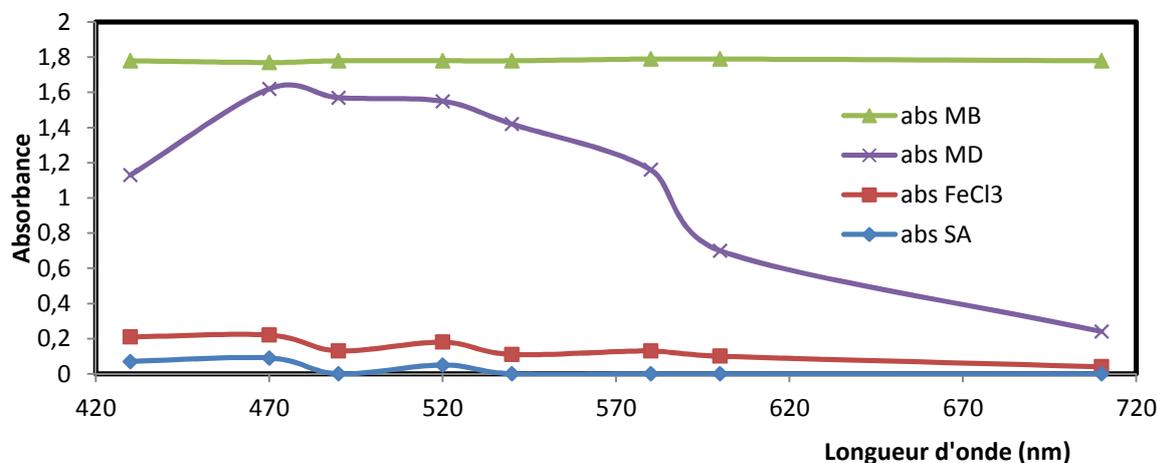


Figure 14: Absorbance de surnageant en fonction de la longueur d'onde de l'intervalle [430-710] nm

D'après les résultats obtenus, on observe que le sulfate d'aluminium permet la réduction du maximum de la turbidité avec un bon abattement de l'absorbance et produit aussi le maximum des boues décantées (environ 96.81 % d'élimination de turbidité). Après, on a le chlorure ferrique (environ 90.14 % d'élimination de turbidité) et produit le moins de boues décantées.

III.6. Taux d'abattement des composés phénoliques par traitement physico-chimique.

La figure 15 représente le taux d'abattement des composés phénoliques après le traitement physico-chimique.

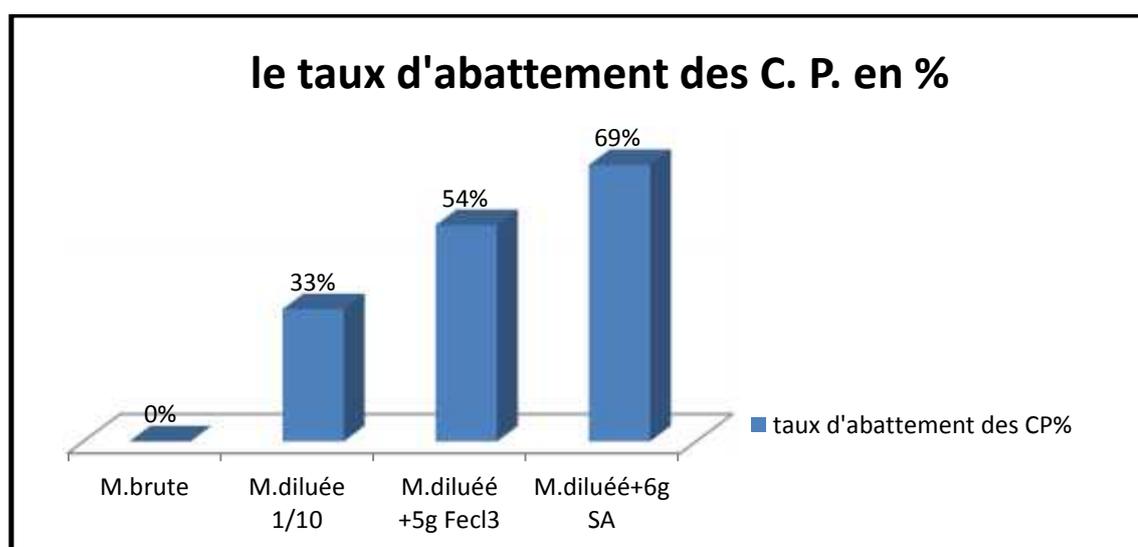


Figure15 : Evolution des composés phénoliques dans les différents types de margines

Les résultats montrent que il y'a une diminution des composés phénoliques. Ceci peut être attribué au phénomène d'adsorption des colloïdes sur les floes formés.

III.7. Le taux d'abattement des composés phénoliques après le traitement biologique

Le figure 16 indique le taux d'abattement des composés phénoliques par les souches étudiées dans les différents types de margines.

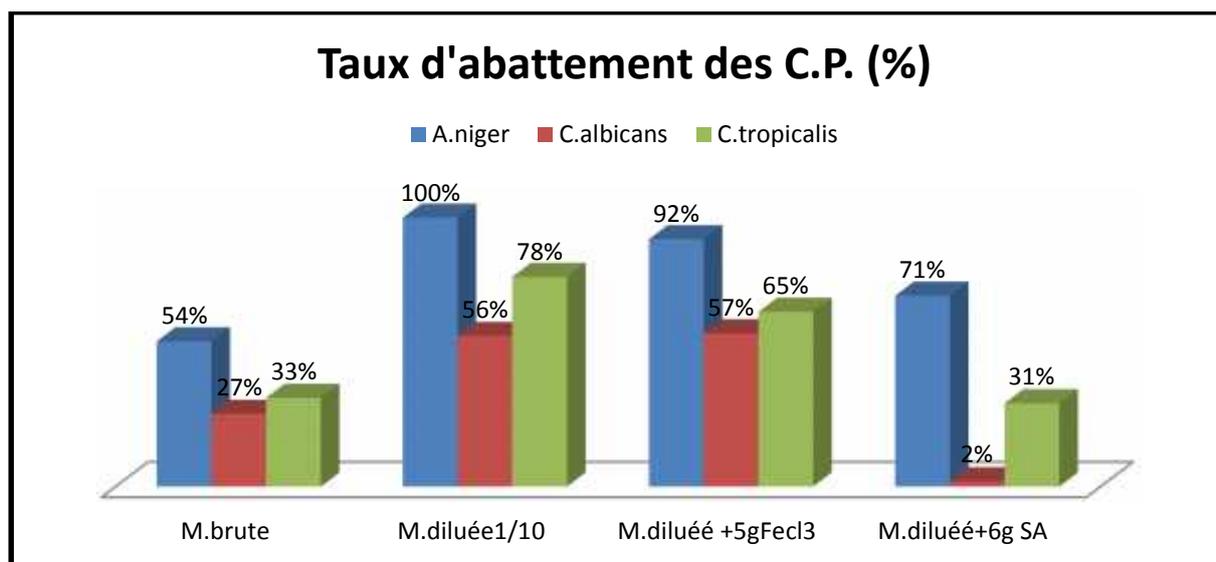


Figure 16: Le taux d'abattement des composés phénoliques (CP) pour les 3 souches testées.

D'après les résultats de la figure 16, on constate que le traitement biologique pour les margines brutes montre des résultats non satisfaisant par rapport à celui des margines diluées. Dans les margines diluées les taux d'abattement obtenus sont de l'ordre de 100%, 56% et 78% avec l'utilisation respectivement de *A. niger*, *C. albicans* et *C. tropicalis*. Par contre dans les margines brutes, le pourcentage de la réduction des composés phénoliques ne dépasse pas 54 %, 27% et 33% de ces souches. Ceci suggère que les margines concentrées seraient capable de diminuer l'activité des micro-organismes. Cette diminution est en relation avec la nature des margines fortement chargées en polluants organiques, en particulier les grandes concentrations des composés toxiques comme les tannins et les composés phénoliques. Certains de ces composés pourraient avoir un effet antimicrobien qui se manifeste par l'altération des membranes cellulaires [62]. En plus les composés phénoliques en forte concentration peuvent se fixer sur les enzymes dont l'activité serait affectée et les cellules microbiennes seraient privées de métabolites intermédiaires, ce qui parviendrait à l'inhibition de leur croissance.

Les résultats montrent également que la capacité d'*A. niger* à assimiler les composés phénoliques est plus élevée que celle des autres micro-organismes dans les différents types de margines. En effet, la chitine des parois d'*A. niger* est connue par sa capacité de fixer les composés phénoliques, ce qui peut contribuer à leur élimination des margines [63]. *A. niger* est capable à la fois de dégrader des polymères aromatiques comme les tannins et les anthocyanes et des monomères aromatiques [64]. En plus, le catéchol qui est un intermédiaire important du catabolisme aérobie des composés aromatiques, est facilement dégradé par *A. niger* grâce à sa catéchol 1,2-dioxygénase [65].

Pour *Candida tropicalis* a aussi la capacité d'éliminer 33%, 78%, 65%, 31% des composés phénoliques pour les margines brutes, diluées, traitées par 5 de $FeCl_3$ et 6g de $Al_2(SO_4)_3$ respectivement. Ces résultats sont supérieurs à ceux obtenus après le traitement des margines par *Candida albicans* (27%, 56%, 57%, 2% pour les margines brutes, diluées, traitées par 5g de $FeCl_3$ et 6g $Al_2(SO_4)_3$ de respectivement). Mais le traitement des margines par ces deux genres *Candida* reste limité puisqu'elles sont considérées comme des souches pathogènes.

Les champignons sont en général plus efficaces que les levures dans le traitement des margines. Ceci est probablement dû à leur système enzymatique plus performant dans la dégradation des composés phénoliques par rapport aux levures. Nous avons aussi pu conclure d'après les figures 15 et 16 que le traitement physico-chimique suivi d'un traitement biologique permet d'augmenter le taux d'abattement des composés phénoliques.

III.8. L'activité antibactérienne après le traitement par coagulation- floculation.

La mise en évidence de l'activité antibactérienne des margines après le traitement par coagulation- floculation est illustrée dans la figure 17.

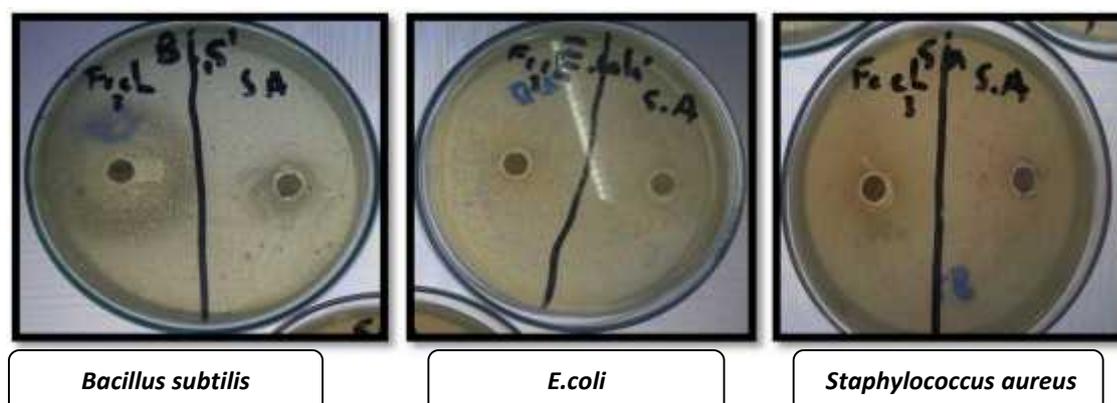


Figure 17 : L'activité antibactérienne après le traitement par coagulation- floculation

Les résultats montrent une diminution des zones d'inhibitions par rapport aux margines non traitées. Ceci est dû à une diminution des composés phénoliques par ce procédé physico-chimique.

III.9. L'activité antibactérienne après le traitement biologique

La mise en évidence de l'activité antibactérienne des margines après le traitement biologique est illustré dans la figure 18.

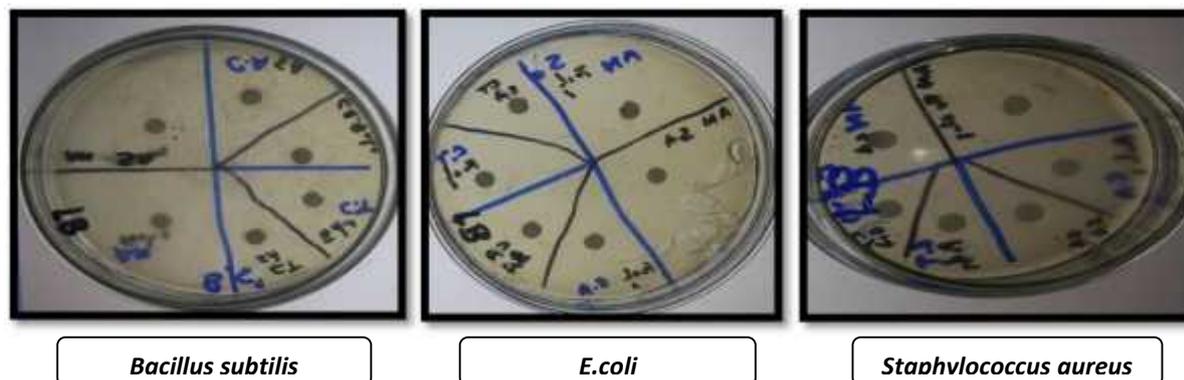


Figure 18 : L'activité antibactérienne après le traitement biologique

Les résultats montrent une absence totale des zones d'inhibitions par rapport aux margines brutes. Ceci indique donc que le traitement biologique permet d'éliminer le reste des composés phénoliques encore présent dans les margines traitées par coagulation-floculation.

Il en découle de l'ensemble des résultats que la faisabilité de ce genre de traitements manifeste une contribution adéquate dans le cadre des traitements combinés physico-chimiques et microbiologiques des margines. Ceci pourrait néanmoins répondre aux tendances actuelles qui visent l'intégration de diverses technologies pour dépolluer les margines à faible coût. Nos résultats prometteurs dévoilant une chute nette des composés phénoliques, ce qui permettrait d'engager et d'améliorer d'autres stratégies de combinaison pour une épuration des margines.

Conclusion et perspectives

Cette étude est réalisée en vue de traitement combiné des margines issue de la région Hamria de Fès. La caractérisation microbiologique nous a permis de dévoiler une charge microbienne importante des margines. Alors que L'étude physico-chimique effectuée sur ces margines a montré une forte pollution organique manifestée particulièrement par les composés phénoliques. D'autre part Le procédé de traitement physico-chimique a révélé une diminution de la turbidité, une augmentation des volumes des boues et une importante décoloration des margines accompagnée d'une diminution des taux de composés phénoliques. Le second traitement biologique utilisant les capacités fongiques à dépolluer d'avantage les margines et a montré une nette chute des composés phénoliques de cet effluent. Nous suggérons en perspectives des traitements combinés faisant intervenir des procédés chimiques suivis de traitements biologiques par un consortium de micro-organismes originaires des margines. Nous visons aussi la réalisation d'un traitement faisant appel à des micro-algues du fait de la grande capacité épuratoire de certaines algues.

Références bibliographiques

1. **Sayadi S., Allouche N., Jaoua M., Aloui F. (2000).** Detrimental effects of high molecular mass polyphenols on olive mill wastewater biotreatment. *Process Biochemistry*. 35, 725-735.
2. **El Hajjouji H., Fakharedine N., Baddi G.A., Winterton P., Bailly J.R., Revel J.C. et Hafidi M. (2007).** Treatment of olive mill waste water by aerobic biodegradation: an analytical study using gel permeation chromatography, ultraviolet-visible and Fourier transform infrared spectroscopy. *Bioresource Technology*. 98: 3513-3520.
3. **Zenjari I. (2000).** Etude écotoxicologique des effluents liquides des huileries de la ville de Marrakech, impact sur les milieux récepteurs et détoxification. Thèse de Doctorat, Faculté des Sciences Semlalia, université Cadi Ayyad, Marrakech, Maroc. 149 p.
4. **El Hajjouji H., Ait Baddi G., Yaacoubi A., Hamdi H., Winterton P., Revel J.C. et Hafidi M. (2008).** Optimisation of biodegradation conditions for the treatment of olive mill wastewater. *Bioresource Technology*. 99: 5505-5510.
5. **Achak A., Ouazzni N., Yaacoubi A. et Mandi L., (2008).** Caractérisation des margines issues d'une huilerie moderne et essai de leur traitement par coagulation-floculation par la chaux et le sulfate d'aluminium. *Revue des Sciences de l'Eau*. 21 : 53-57.
6. **DPV, direction de la production végétale, (2009),** département lié au ministère de l'agriculture, Rabat, Maroc.
7. **DPV, direction de la production végétale, (2008),** département lié au ministère de l'agriculture, Rabat, Maroc.
8. **COI (Conseil Oléicole International), (2008).** International course on water management and irrigation of olive orchards. Limassol-Cyprus, 20 pages.

-
- 9. Ismaili-Alaoui M. et Heddoun A.(2006).** Tentative de modernisation des Maâsra traditionnelles. Unité mobile d'extraction des huiles d'olives. In : Ismaili-Alaoui,M., Roussos, S., Perraud-Gaime, I., (Eds.), *Biotechnology and quality of Olive tree. products around the Mediterranean basin*, Actes Editions, Rabat, Maroc, 243-258.
- 10. Ranalli A. (1991).** the effluent from olive mills : Propsals for re-use and purification with reference to Italian legislation, *Olivae*, 37,30-39.
- 11. Hamdi M, (1993).** valorisation et épuration des effluents des huileries d'olives : l'utilité de la microbiologie industrielle, *Olivae*, 46, 20-24.
- 12. Mouncif M, Tamoh S, Faid M, Achkari-Begdouri A, (1993).** A study of chemical and microbiological characteristics of olive mill waste in Morocco, *Grasas y Aceites*, 44,335-338.
- 13. Zenjari B, Hafidi M, EL Hadrami Bailly J.P, Nejmeddine A (1999).** Traitement aérobie des effluents d'huilerie par les micro-organismes du sol. *Agrochimica*, 5-6.
- 14. Tsioulpas A, Dimou D,Inconomou D, Aggelis G,(2002).** Phenolic removal in olive mill wastewater by strains of *Pleurotus* spp, In respect to their phenol Oxidase (Laccase) activity, *Bioresource Technology*, 84, 251-257.
- 15. Ramos-Cormenzana A, (1986).** Physical, chemical, microbiological and biochemical characteristics of vegetation water. In : inter. Symp : On olive by-products valorization. Sevilla-Spain.41-60.
- 16. Karapinar M, Worgan M.J.T, (1989).** Bioprotein production from the waste products of olive oil extraction,*J. Chem. Tech. Biotechnol*, 33, 185-188.
- 17. Bambalov G, Israilides C, Tanchev S, (1989).** Alcohol fermentation in olive oil Extraction Effluents, *Biological Wastes*, 27, 71-75.
- 18.De felice B, Pontecorvo G, Carfagna L, (1997).** degradation of waste waters from olive oil mills by *Yarrowia lipolytica* ATCC 20255 and *pseudomonas pitida*, *Acta biotechnol*, 17,231-239.

-
- 19. Ramos-Cormenzana A,(1990).** studies on antibacterial activity of wastewaters from olive oil mills (alpechin) : inhibitory activity of phenolic and fatty acids, *Chemosphere*, 2,423-432.
- 20. Annaki A, Chaouch M, Rafiq M, (1999).** Influence de la durée du stockage des olives sur l'évolution de la composition des margines, l'eau, l'industrie, les nuisance, 218, 24-28.
- 21. Fiestas Ros de Ursinos J A, Borja R, (1992).** Use and traetement of olive will wastewater : current situation and prospects in spain, *Grasas y Aceites*, 2, 101-106.
- 22. Lutwin B, Fiestas Ros De Ursinos J A, Geissen K, Kachouri M, Klimm E, De Ladorde Monpezat G, Xanthoulis D, (1996).** Les expériences méditerranéennes dans le traitement et l'élimination des eaux résiduaires des huileries d'olives, Edition (GTZ) GmbH, Eschborn, République Fédérale d'Allemagne.
- 23. Salvemini F, (1985).** Composizione chimica e vegeazione biologica di un mangime ottenuto essicando tercamente le acque di vegetazione delle olive, *Riv, Delle Sostanze Grasse*, 112, 559-564.
- 24. Hamdi M, (1991).** Nouvelle conception d'un procédé de dépollution biologique des margines ; effluents liquides de l'extraction de l'huile d'olive, Thèse de l'université de Provence. Marseille, France.
- 25. Hamdi M, (1993).** Future prospects and constraints of olive mill waste waters une and treatment : A. Review, *Bioprocess Engineering*, 8,209-214.
- 26. Fernandez Diaz M J, 1983.** Olives, In Rehm HJ, Reed G (eds° *Biotechnology ? Verlag chemie*, Weinheim, 5, 379-397.
- 27. Capasso R, De Martino A, Arienzo M, (2002) .** Recovery and characterization of the metal polymeric organic fraction from olive oil mill wastewaters, *J Agric Food Chem*, 50 (10), 2846-55.

-
- 28. Vazquez R.A., Maestro D.R., Graciani C.E. (1974).** Compentes fenolicos de la aceintuna. II. Poliphenoles del alpechin. *Grasas y Aceites*, **25**, 341-345.
- 29. Borja R., Banks C.J., Alba J. (1995a).** A simplified method for determination of kinetic parameters to describe the aerobic biodegradation of two important phenolic constituents of olive mill wastewater treatment by a heterogeneous microbial culture. *Eniro, Sci. Health., A.*, **30** (3), 607-626.
- 30. Martinez N.L., Ramos-Cormenzana A., Garcia Pareja M.P., Garrido Hoyos S.E. (1992) ;** Biodegradacion de compuestos fenolic del alpechin con *Aspergillus terrus*, *Grasas y Aceites*, **43** (2), 75-81 ;
- 31. Tanchev S, Joncheva N, Genov N, Codounis M,(1980).** identification of anthocyanins contrained in olives, *Georgike ereuna*, **4**, 5-73.
- 32. Balice V, Boari G, CERA O, Abbaticchio P, (1982).** Indagine analitica sulle acque di vegetazione. Nota 1, *Inquinamento* , **7**,49-5,3.
- 33. Monties B, (1980).** les polymère végétaux, Gautier-villars (eds).
- 34. Capasso R. (1997).** The chemistry, biotechnology and ecotoxicology of the polyphenols naturally occurring in vegetable wastes. *Curr. Top. Phytochem., Res. Trends*, **1**, 145-156.
- 35. Ramos-Cormenzana A., Jirez-Jiménez B. et Garcia-Pareja M.P., (1996).** Antimicrobial activity of olive mill wastewaters (*alpechin*) and biotransformed olive oil mill wastewater. *International Biodeterioration et Biodegradation*. **38**: 283-290.
- 36. Hamdi M. et Ellouz R., (1993).** Treatment of detoxified olive mill wastewaters by anaerobic filter and aerobic fluidized bed processes. *Environmental Technology*. **14**: 183-188.
- 37. Ranalli A., (1991).** L'effluent des huiles d'olives : propositions en vue de son utilisation et son épuration. Références aux normes italiennes en la matière. *Olivae*. **39**: 18-34.

38. Hattenschwiler S. et Vitousek P.M., (2000). The role of polyphenols in terrestrial ecosystem nutrient cycling. *Trends in Ecology and Evolution*. 15: 238-243.

39. FAO, (1983) valorisations des produits de l'olivier, réunion du comité technique de Madrid.

40. Filidei, S, Masciandro, G and Ceccanti, b, (2003). Anaerobic digestion of oil mill effluents: evaluation of wastewater the organic load and phytotoxicity reduction water, air and soil pollution, 145, 79-94.

41. Ranalli A. (1991a). The effluent from olive mills : Proposals for re-use and purification with reference to Italian legislation. *Olivae*, **37**, 30-39.

42. Francesco G.L. (1993). Evaluations économiques sur l'innovation technologique. Les problèmes de l'environnement dans le secteur oléicole en Italie. *Olivae*, **47**, 15-20.

43. Fountoulakis M.S., Dokianakis S.N., Kornaros M.E., Aggelis G.G., Lyberatos G. (2002) Removal of phenolics in olive mill wastewaters using the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Water Res.*, **36** (19), 4735-44.

44. Borja R., Banks C.J., Alba J. (1995a) A simplified method for determination of kinetic parameters to describe the aerobic biodegradation of two important phenolic constituents of olive mill wastewater treatment by a heterogeneous microbial culture. *Environ. Sci. Health., A.*, **30** (3), 607-626.

45. Hamdi M. (1991a). Nouvelle conception d'un procédé de dépollution biologique des margines, effluents liquides de l'extraction de l'huile d'olive, Thèse de l'université de Provence. Marseille, France.

46. Hamdi M., Bouhamed H., Ellouz R. (1991b). Optimisation of *Aspergillus niger* growth on olive mill wastewaters, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **36**, 285-288.

-
- 47. Kissi M., Mountadar M., Assobhei O., Gargiulo E., Palmieri G., Giardina P., Sannia G. (2001).** Roles of two white-rot basidiomycete fungi in decolorisation and detoxification of olive mill waste water. *Appl Microbiol Biotechnol.*, **57** (1-2), 221-6.
- 48. Fadil K., Chahlaoui A., Ouahbi A., Zaid A., Borja R. (2003).** Aerobic biodegradation and detoxification of wastewaters from the olive oil industry. *International biodeterioration & biodegradation*, **51**, 37-41.
- 49. Ranalli A. (1991a).** The effluent from olive mills : Proposals for re-use and purification with reference to Italian legislation. *Olivae*, **37**, 30-39.
- 50. 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.
- 51. Roig, A , Cayuela , ML, Sanchez-Monedero, MA, (2006).** An overview on olive mill wastes and their valorisation methods. *Waste Management* 26,960-969.
- 52. Nefzaoui, A, (1991).** Contribution à la rentabilité de l'oléiculture par une valorisation optimale des sous-produits. Séminaire sur l'économie de l'olivier. Tunis.
- 53. Singleton V. L and Arossi J.A (1965).** Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic- phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Technol et Viticul* ,16 : 144-153.
- 54. DE Macro E, Maria S, Antonello P and Raffaele S. (2007).** Characterization and fractionation of phenolic compounds extracted from olive oil mill wastewaters. *Food Chem* , 104 : 858-867.
- 55. Della Grace L, Previtiera L, Temessi F, and Carrelli A. (2004).** Lowmolecular weight components of olive oil mill waste-waters. *Phytochem.Analys*, 15 : 184-188.
- 56. De Felice, B., Pontecorvo, G., Carfagna, M.,(1997).** *Acta Biotechnol* 17-231.
- 57. Singleton V.L., Rosi J.A., Am. J. (1965)** *Oenol. Vitic.* 16 -144.

- 58. Hanato T., Kagawa H., Yasuhara T., Okuda T.,** *Chem. Pharm. Bull.* 36(1988) 2090.
- 59. Ranalli A.,** (1991). *Olivae*, 37- 30.
- 60. Esmail A., Abed H., Firdaous M., Chahboun N., Mennane Z., Berny E., et Ouhssine M., J(2014).** *Mater. Environ. Sci.* 5- 121.
- 61. 28. Firas A., Hassan F., J. (2008).** *Zhejiang Univ. Sci.* 9(2) ,154.
- 62. Capasso R. (1997)** The chemistry, biotechnology and ecotoxicology of the polyphenols naturally occurring in vegetable wastes. *Curr. Top. Phytochem., Res. Trends*, **1**, 145-156.
- 63. Seng J.M. (1988)** Chitine, chitosane et dérivés: De nouvelles perspectives pour l'industrie. *Biofutur*, **71**, 40-44.
- 64. Kieslich K. (1976)** Microbial transformations of non-steroid cyclic compounds. John Wiley and Sons Georg Thieme publishers, 1262 pp.
- 65. Ninnekar h.Z., Vaidyanathan C.S. (1981)** Catéchol 1,2-dioxygénase from *Aspergillus niger* : purification and properties. *J. Indian Inst. Sci.*, **63**, 131-136. Office National de l'Eau Potable (1989) Pollution de l'oued.

