

# Liste des figures

**Figure 1 :** Evolution de la superficie de culture de l'olivier au Maroc.

**Figure 2 :** Répartition de la production mondiale de l'huile d'olive (%) pendant les 5 dernières années (2003 2008).

**Figure 3 :** Répartition et capacités de trituration des unités artisanales et industrielles au Maroc.

**Figure 4 :** cinétique de germination de tournesol.

**Figure 5 :** croissance végétative des plantes Tournesol irriguées par différents effluents.

# Liste des tableaux

**Tableau 1 :** la composition chimique des margines.

**Tableau 2 :** la composition minérale des margines.

**Tableau 3 :** Concentration des composés phénoliques dans les margines.

**Tableau 4 :** les différents effluents dont on a imbibé les graines de tournesol avec le témoin positif (l'eau) et le témoin négatif (MB).

**Tableau 5 :** Caractéristiques physico-chimiques des margines étudiées.

**Tableau 6 :** Résultats des dénombrements des FMAT pour le sol intact et les sols traités par différents effluents en comparant avec le témoin négatif et le témoin positif.

# Liste des abréviations

**CF:** Chlorures ferriques.

**EPS:** Eau physiologique stérile.

**FMAT:** Flore mésophile aérobie totale.

**HO:** Huile d'olive.

**MB:** Margines brutes.

**MO:** Micro-organismes.

**P:** Phosphate.

**PCA:** Plate count agar.

**SA:** Sulfates d'alumines.

**T+ :** Témoin positif.

**T- :** Témoin négatif.

**UFC:** Unité formant colonie.

# Sommaire :

Introduction générale :.....	1
Synthèse bibliographique:.....	2
• Introduction :.....	2
I. Le secteur oléicole au Maroc :.....	2
1. L'olivier et huile d'olive : .....	2
2. Extraction et unités de trituration d'olive : .....	3
II. Caractéristiques et composition des margines : .....	4
1. Caractéristiques des margines : .....	4
III. Impact des margines sur l'environnement :.....	6
1. Pollution des eaux : .....	7
2. Pollution des sols :.....	7
3. Pollution d'air et du paysage :.....	7
IV. Traitement des margines :.....	8
1. Traitements physiques : .....	8
• Procédé des membranes :.....	8
• Procédé de bio-filtration : .....	8
• L'adsorption :.....	8
2. Traitements chimiques :.....	9
• Oxydation humide : .....	9
• Coagulation – floculation : .....	9
3. Traitements biologiques :.....	9
• Traitement aérobie :.....	9
• Traitement anaérobie :.....	10
4. Traitements thermiques :.....	10
• Evaporation naturelle :.....	10
• Evaporation forcée :.....	10
5. Traitements combinés :.....	11
6. Traitement des margines par électrocoagulation et bio-méthanisation : .....	11
V. Voies de valorisation des margines :.....	11
1. Utilisation des margines comme fertilisant :.....	11

2.	Production des enzymes : .....	12
3.	Effet antioxydant des margines : .....	12
VI.	Culture de tournesol et leurs exigences : .....	12
1.	Préparation du sol: .....	12
2.	Fertilisation : .....	12
3.	Irrigation : .....	12
	Matériel et Méthodes : .....	13
I.	Caractéristiques physico-chimiques des margines : .....	13
•	pH : .....	13
•	Conductivité électrique, et la salinité : .....	13
•	La turbidité : .....	13
•	Dosage des chlorures: .....	13
•	Dosage des orthophosphates : .....	13
•	Extraction et dosage des polyphénols des margines : .....	13
II.	Valorisation des margines : .....	14
•	Préparation du sol et des pots : .....	14
•	La mise en germination : .....	14
•	Cinétique de germination des graines de <i>Tournesol</i> : .....	15
•	Protocole d'irrigation : .....	16
•	Suivi de la croissance végétative : .....	16
•	Suivi microbiologique du sol : .....	16
	Résultats et discussion : .....	18
I.	Caractéristiques physico-chimiques des margines : .....	18
II.	Valorisation des margines : .....	19
•	Cinétique de germination des graines de <i>Tournesol</i> : .....	19
•	Suivi de la croissance végétative : .....	20
•	Suivi microbiologique du sol : .....	20
	Conclusion : .....	23
	Références .....	24

## Introduction générale :

L'olivier constitue la principale espèce fruitière cultivée en méditerranée. Sa faculté à croître et à produire dans diverses situations de culture ainsi que son adaptation aux conditions climatiques les plus critiques ont permis son développement.

L'accroissement de la production oléicole et l'introduction des techniques modernes pour l'extraction de l'huile avec des systèmes continus de trituration à trois phases utilisant beaucoup d'eau. Phénomène qui a placé l'olivier dans une position délicate de pollueur potentiel. C'est pour cela que l'olive et l'huile qui ont dérivé, ne constituent qu'une part infime de la biomasse produite tout au long du processus oléicole. Les margines et les grignons d'olives représentent les résidus de la trituration des olives qui engendrent des problèmes environnementaux inquiétants : 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 :

- ✓ 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.
- ✓ Une faible acidité.

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].

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 restent insuffisants et incomplets. Citons :

- 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.
- 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.
  - Le traitement biologique anaérobie est limité par des problèmes d'acidification, de toxicité et de biodégradabilité.
- Ce travail va porter sur la valorisation des margines en irriguant la culture de tournesol par des margines traitées par voie physico-chimique, ainsi sur l'étude des caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques du sol et végétal après irrigation, en comparant par le témoin positif (irrigué par l'eau) et le témoin négatif (irrigué par les margines brutes).

## **Synthèse bibliographique:**

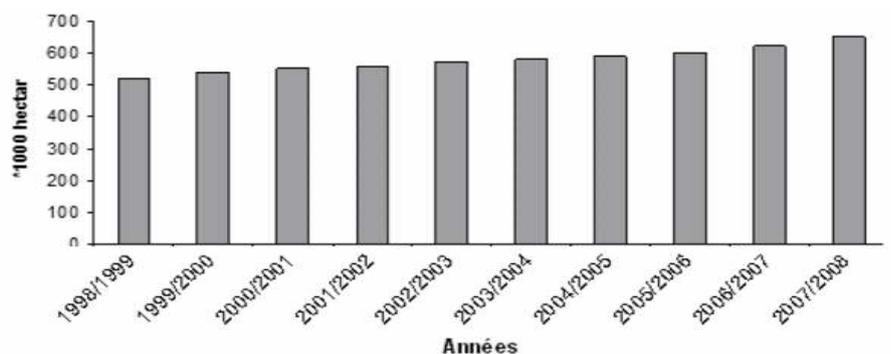
### **✚ Introduction :**

Les margines constituent les rejets des moulins à huile d'olive. Elles proviennent pour 40 à 50 % du fruit et le reste des quantités d'eau utilisées pour le lavage des olives et leur trituration. Ces effluents sont des eaux usées très acides (pH compris entre 4,5 et 5,2), très salines (conductivité électrique située entre 8 et 16dS/m). Ces effluents présentent un grand pouvoir polluant des cours d'eau, dû surtout à leur couleur et leur concentration élevée en matières organiques et en polyphénols [3]. Différentes recherches ont démontré que l'épandage des margines avait des répercussions agronomiques défavorables, liés essentiellement à la teneur élevée en substances phénoliques non facilement biodégradables.

### **I. Le secteur oléicole au Maroc :**

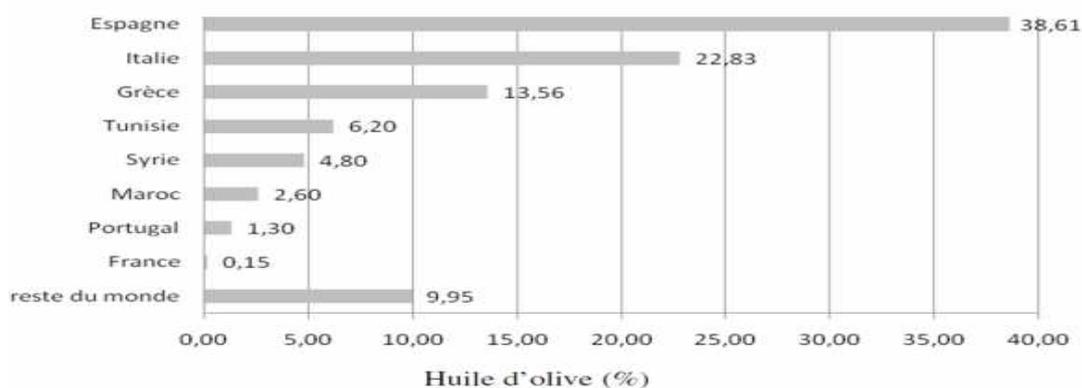
#### **1. L'olivier et huile d'olive :**

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]**

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). L'évolution du HO 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]. 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 2).

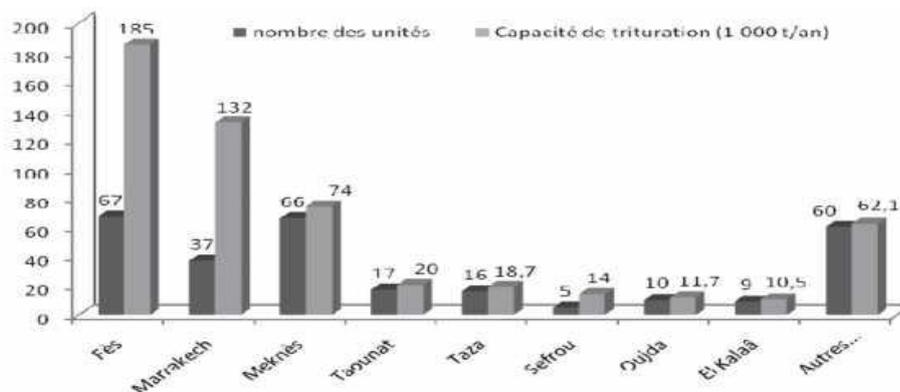


**Figure 2 : Répartition de la production mondiale de l'huile d'olive (%) pendant les 5 dernières années (2003 2008) [8].**

## 2. Extraction et unités de trituration d'olive :

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 15600 *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 3)



**Figure 3. Répartition et capacités de trituration des unités artisanales et industrielles au Maroc [6].**

Les systèmes traditionnels ont cédé la place aux équipements modernes. Auparavant, l'extraction était effectuée de manière discontinue. De même, après le développement des appareils de centrifugation, la séparation de l'huile des eaux de végétation est devenue moins coûteuse (9).

#### **a. Procédés en discontinu ou système à presse**

Ce sont les systèmes classiques par pression avec broyeurs. Le broyage des olives suivi du malaxage se font sous des meules. Une pâte est obtenue au bout d'une demi-heure environ. Elle est composée de grignon et un moût contenant l'huile et les margines. La séparation des deux phases solide-liquide se fait par simple pression, alors que l'huile est séparée des margines par décantation naturelle.

#### **b. Procédés en continu ou système à centrifugation :**

L'extraction d'huile d'olive se fait à travers des phases successives contrairement au procédé discontinu. Les olives sont lavées, broyées, mélangées avec l'eau chaude et malaxées. Les phases liquides et solides sont séparées par centrifugation. Le moût subit à son tour une centrifugation pour séparer l'huile des margines. [10]

## **II. Caractéristiques et composition des margines :**

### **1. Caractéristiques 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 [11-12].

**Tableau1: la composition chimique des margines [13]**

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

Les caractéristiques et la composition des margines est complexe et hétérogène, elle dépend de plusieurs facteurs :

- 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 [13-14].

#### **i. 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) [15].

**Tableau 2: la composition minérale des margines [15].**

Éléments chimiques :	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
Nickel	3,3

#### **ii. Fraction organique :**

La composition organique des margines varie en fonction du stade de maturation des olives, du processus d'extraction, des conditions climatiques et de la variété de l'olivier. Il contient des polyphénols de haut poids moléculaire, comme l'anthocyane et tanins dont la concentration atteint 12g/l [17], et des acides organiques comme acide fumarique, lactique et glycérique, en plus des lipides, des glucides et des vitamines principalement les vitamines B, et tous les acides aminés.

Ces rejets sont aussi caractérisés par la prédominance de substances toxiques notamment les composés phénoliques (9.7 g/l) [11.19]. Ces derniers sont divisés en plusieurs classes qui dépendent des caractéristiques structurales de leur squelette carboné, ils contiennent des acides phénoliques et aldéhydes, flavonoïdes, tannins et lignines [18], Les différents pourcentages des composés phénoliques sont portés dans le **tableau 3**.

**Tableau 3: Concentration des composés phénoliques dans les margines.**

<b>Composés phénoliques :</b>	<b>Pourcentage (%) :</b>	<b>Référence :</b>
Acides phénoliques		
Acide coumarique	0.021	
Acide caféique	0.0072	[21]
Acide vanillique	0.017	
Tyrosol	0.014	
Hédroxytyrosol	0.002	[22]
Flavonoïdes		
Lutéoléine	0.014	[20]
Luteolin 7-O-glucoside	0.021	

### **iii. Fraction microbiologique :**

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 [23] est lié essentiellement à l'action exercée par les Composés phénolique et les pigments bruns ou catéchol-mélaninique [24]. Ces effluents agissent sur les bactéries en dénaturant les protéines cellulaires et en altérant les membranes [11]. Ils peuvent inhiber également l'activité des bactéries symbiotiques fixatrices d'azote dans le tube digestif des ruminants en inhibant leur activité enzymatique [25].

### **III. Impact des margines sur l'environnement :**

Les margines, effluents d'extraction de l'huile d'olive, posent de sérieux problèmes de pollution par leur concentration élevée en matières organiques et en polyphénols. Des études de toxicité et de biodégradabilité ont montré que les composés phénoliques qui sont de nature humiques, sont responsables de la coloration noire très peu toxiques et difficilement biodégradables par contre, les composés tanniques sont très toxiques mais biodégradables.

En effet, le rejet des margines reste jusqu'à présent un problème écologique prépondérant Ainsi qu'un redoutable souci pour les pays producteurs d'huile d'olive. L'absence de méthodes de traitement adaptées pousse les propriétaires d'huileries à rejeter ces eaux dans la nature sans aucun contrôle [26].

### **1. Pollution des eaux :**

Les margines sont rejetées le plus souvent dans des récepteurs naturels, des cours d'eau, sans aucun contrôle préalable et nuisent fortement à la qualité de ces eaux de surfaces; la très forte charge en matières organiques empêche ces eaux de s'auto-épurer et la pollution peut s'étendre sur de très longues distances [27].

La coloration des eaux naturelles due aux tannins est l'un des effets les plus visibles de la pollution. De plus, la teneur élevée en sucres réducteurs provoque la prolifération des micro-organismes qui y profitent comme substrat, ceci diminue la disponibilité de l'oxygène dans l'écosystème aquatique, de même que l'accumulation du phosphore provoque l'eutrophisation des eaux [28].

En outre, l'épandage des margines, très riches en éléments azotés, peut causer la pollution des nappes souterraines situées dans la zone ou à proximité du site d'épandage et souiller la qualité de l'eau potable ; or dans le bassin méditerranéen, les ressources en eau sont rares et leur préservation, tant que quantitativement que qualitativement est capitale. Ensuite, Les lipides présents dans les margines forment un film imperméable à la surface des rivières et ses bords empêchent la pénétration de la lumière et l'oxygène [29].

### **2. Pollution des sols :**

Les composés phénoliques, les acides organiques, le pigment et la haute salinité (conductivité élevée) peuvent causer des effets phytotoxiques sur les oliviers [30]. Ils provoquent une diminution de la matière sèche en diminuant la disponibilité de l'azote, en plus de leur toxicité pour certains micro-organismes. Les acides, les éléments minéraux et les substances organiques aboutissent à une destruction de la capacité d'échange cationique du sol, par la suite, une augmentation de la stérilité du sol. Qui augmente suite à l'action altérante des acides, des minéraux et des composés organiques [31].

La forte acidité des margines a un impact négatif sur le sol et ses constituants. La microflore Bactérienne du sol peut être détruite suite à l'acidification du milieu. Par ailleurs le caractère visqueux des margines entraîne la formation d'un dépôt huileux qui provoque L'imperméabilisation du sol dans un premier lieu et son asphyxie par la suite [32].

### **3. Pollution d'air et du paysage :**

Les fortes teneurs en sels des eaux de végétation, leur forte charge et leur acidité sursaturent le milieu récepteur et provoquent des conditions d'anaérobioses propices aux dégagements d'odeurs désagréables liées à la formation d'acide H<sub>2</sub>S lors du processus de fermentation. Les odeurs encombrant fortement les bordiers du cours d'eau [33].

#### **IV. Traitement des margines :**

Jusqu'à maintenant, le traitement des margines constitue un problème complexe vu la qualité et la quantité des substances chimiques qu'elles renferment. Donc, l'application d'un traitement simple s'avère insuffisant [24 ,11]. Les procédés de traitement dont nous avons pris connaissance sont multiples. Toutefois, les procédés de traitement envisageables pour l'élimination de la charge polluante des margines peuvent être classés selon quatre catégories : procédés physiques, procédés chimiques, procédés biologiques, procédés thermiques et peuvent être utilisés seuls ou combinés.

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 [9].

##### **1. Traitements 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.

- 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 m<sup>2</sup>/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).

L'adsorbant le plus utilisé pour éliminer les polluants organiques des eaux résiduaux est le charbon actif. Cependant, il est non seulement une matière relativement chère, mais après saturation, le coût de régénération pour sa réutilisation est élevé. Encoure l'adsorption sur charbon actif est généralement limitée pour l'élimination des substances non polaires [34].

## **2. Traitements 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 (10 à 220 Bars) et à des températures relativement élevées (120-330°C), le procédé d'oxydation fournit du CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>O; mais ce procédé nécessite aussi un traitement aérobic. Malgré son efficacité, ce traitement n'a pu être réalisé à l'échelle industrielle son coût d'investissement reste trop élevé.

- Coagulation – floculation :

La coagulation est parmi les méthodes les plus efficaces pour éliminer les matières organiques en suspension et colloïdales. Elle consiste à traiter les margines avec des produits tensioactifs ou certains coagulants. Ce traitement est certainement le moins coûteux [35].

[36] a obtenu des réductions de 35% et de 31% de la matière organique en utilisant respectivement des sels de fer et des sels d'aluminium. La coagulation par la chaux a donné une réduction de la DCO de 40 à 50% [37 ; 38].

Ce processus peut être utilisé après traitement biologique pour éliminer les matières en suspension et les polluants résiduels [36]. L'inconvénient majeur de ce traitement réside dans le fait qu'on a un simple transfert de la pollution de l'état soluble à l'état boueux. En plus, la plupart des composés organiques contenus dans les margines sont difficiles à précipiter.

## **3. Traitements biologiques :**

Ils sont basés sur la croissance des microorganismes aux dépens des matières organique, biodégradables, qui constituent, pour eux, des aliments.

- Traitement aérobic :

Plusieurs études ont été réalisées sur le traitement aérobic des margines, par des cultures pures de micro-organismes tels que *Aspergillus Niger*, *Azotobacter chroococcum*, *Azotobacter vinelandii*, *Aspergillus terreus*, *Phanerochaete chrysosporium* et *Pleurotus ostreatus* [39].

D'autres travaux ont prouvé l'efficacité du traitement aérobic 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 [40]. 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 [41-42].

Au Maroc, le traitement aérobic des margines à pH neutre par les micro-organismes du sol a permis d'éliminer 70% des composés phénoliques [43]. D'autres travaux ont prouvé l'efficacité du traitement aérobic des margines par *Phanerochaete chrysosporium*. Les résultats de cette

étude ont révélé des taux d'abattement des polyphénols de l'ordre de 83% respectivement après 12 jours d'incubation [44].

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 [11]. Ceci est dû en grande partie à la présence de fortes charges organiques polluantes représentées particulièrement par les composés phénoliques.

- **Traitement anaérobie :**

La fermentation anaérobie peut être utilisée comme un moyen de traitement et d'exploitation des margines [39]. 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.
- les mauvaises odeurs ne sont pas émises.

#### **4. Traitements 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 :

- 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 éviter 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 /m du bassin. Parmi les inconvénients de cette méthode, citons :

- le dégagement de mauvaises odeurs.
- l'importance du coût d'énergie dépensée.

## **5. Traitements 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 phénoliques.

## **6. 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 ralentie par la présence de polyphénols, substances toxiques contenus dans ces eaux (margines), 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.

## **V. Voies de valorisation des margines :**

Pour pouvoir être recyclés et /ou valorisés, les « déchets » organiques ne doivent plus être considérés comme des résidus dont il faut se débarrasser mais comme des matières premières qui peuvent présenter un intérêt soit agronomique (fertilisation, apport de matière organique...), soit matière (alimentaire ou industriel), soit énergétique. Par ailleurs beaucoup d'efforts ont été consacrés à l'élimination des polyphénols dans les margines, car ils sont plus toxiques, par des approches physico-chimiques [56] ou par dégradation biologique [57].

Voici quelques exemples concrets de valorisation de ce déchet par la voie de la biotechnologie et la physico- chimie :

### **1. Utilisation des margines comme fertilisant :**

Les margines peuvent être utilisées comme engrais en apportent 3,5 à 11 kg de potasse, 0,6 à 2 kg d'acide phosphorique et 0,15 à 0,5 kg de Manganèse par m<sup>3</sup>. Les essais réalisés permettent de fixer certaines précautions à savoir :

- \* Ne pas dépasser la dose de 30 m<sup>3</sup>/ha/an.
- \* Arroser toujours entre les arbres.
- \* Pour les cultures annuelles, arroser au moins 1 mois avant la récolte, pour éviter les effets phytotoxiques et ne jamais arroser pendant la période de végétation [45].

## **2. Production des enzymes :**

La production industrielle des enzymes est possible par les levures et champignons filamenteux en utilisant les margines. Les principaux enzymes obtenus à travers le traitement par ces microorganismes sont lipases, laccases, peroxydases et pectinases sont produits à partir des margines inoculés par *Cryptococcus albidus* mais des lipases ont été obtenues à partir de souche *Yarrowia lipolytica* [46].

## **3. Effet antioxydant des margines :**

Si les margines sont proprement gérées, elles seront moins chères et une source pertinente des antioxydants naturels [47] à cause de leur teneur élevée en substances phénoliques, les polyphénols sont des composés organiques solubles dans l'eau et ils sont abondants dans les margines [48]. Plus de quarante molécules phénoliques ont été identifiées dans les eaux de végétation, avec l'hydroxytyrosol qui est la principale molécule phénolique vue à sa forte capacité antioxydant [49].

En plus comme des substances naturelles possédant un grand potentiel antioxydant, elles présentent un bon prix de commerce, et leur vraie demande est dans la cosmétique, la pharmacie et l'industrie des aliments. D'autre part, si les polyphénols sont laissés sans aucun traitement, les margines seront graduellement oxydés et/ou polymériser rendant les eaux de végétation plus toxiques [50 ; 51;52].

## **VI. Culture de tournesol et leurs exigences :**

### **1. Préparation du sol:**

Le tournesol extrait très bien l'eau du sol, à condition de pouvoir développer son système racinaire très puissant. La préparation du sol aura pour objectifs essentiels : d'assurer une bonne implantation, une levée rapide et faire une bonne réserve en eau tout en permettant un réchauffement rapide du sol [58].

### **2. Fertilisation :**

Le tournesol est une culture moyennement exigeante en éléments fertilisants, mais capable de bien mobiliser ce qui se trouve dans le sol [58].

### **3. Irrigation :**

Le tournesol a des besoins modérés en eau. Dans des sols profonds à forte réserve en eau, l'irrigation est inutile. En sol à faible réserve, le tournesol est sensible au déficit en eau durant la période floraison-remplissage du grain. Un défaut d'alimentation durant cette phase peut pénaliser le rendement [58].

## **Matériel et Méthodes :**

### **I. Caractéristiques physico-chimiques 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.

#### **+ pH :**

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

#### **+ Conductivité électrique, et la salinité :**

La conductivité, la salinité et TDS sont mesurés à l'aide d'un conductimètre de type inoLabLevel

-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.

#### **+ Dosage des chlorures:**

Les chlorures sont déterminés selon la norme (AFNOR T90-014), ils ont été dosés par la méthode de titrimétrie de Mohr avec le nitrate d'argent et les chromates de potassium.

L'apparition d'une teinte rouge caractéristique du chromate d'argent.

#### **+ Dosage des orthophosphates :**

Les orthophosphates sont dosés par la méthode de Murphy et Riley (1962), la détermination de leur concentration est basée sur la formation d'un complexe antimoine-phosphate-molybdate.

Ce complexe est réduit par l'acide ascorbique en composé fortement coloré en bleu.

La densité optique est lue à une longueur d'onde de 882nm.

#### **+ Extraction et dosage des polyphénols des margines :**

##### **1. Délipidation des margines :**

5 ml de margines sont ajoutées à 5 ml d'hexane (V/V). La solution est mélangée à l'aide du vortex pendant 3 min. à une vitesse de 13500 tours/min. Le mélange subit à son tour une seconde centrifugation pendant 12 min. La margine est recueillie après séparation complète en deux phases :

Surnageant —————> l'hexane  
Au fond —————> la margine délipidée

La margine délipidée prête à une extraction liquide-liquide.

### 2. Extraction des composés phénoliques :

L'extraction des polyphénols de la margine délipidée est effectuée avec du méthanol [59]. Un volume du méthanol (60 pour cent sont) est ajouté à un volume de la margine délipidée, et l'ensemble est mélangé au vortex. Le volume total subit une séparation par centrifugation. La phase inférieure est recueillie.

### 3. Dosage des polyphénols totaux :

0.2ml extrait phénolique

+

1.5ml Réactif de Folin-Ciocalteu (diluée 10 fois)

↓ 5min

1.5ml de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  à 5 %

(30 min à 40°C)

→

2h à l'obscurité.

➤ Lecture de la densité optique à 765 nm

N.B. : le blanc est préparé de la même manière en remplaçant l'extrait phénolique par l'eau distillée.

## II. Valorisation des margines :

### ✚ Préparation du sol et des pots :

-On a préparé le sol par tamisage des pierres, puis on a mis les pots selon le dispositif suivant.



### ✚ La mise en germination :

- Les graines de tournesol désinfectées par un passage dans l'éthanol 95° (30 sec à 1 min) ou bien eau de javel, puis dans une solution d'hypochlorite de mercure (1 %) pendant 3 à 4 minutes, sont mises à imbiber dans l'eau distillée stérile en boîtes.



Les graines sont ensuite placées à germer à l'obscurité à une température de 26°C dans un incubateur. Après germination, les plantules sont transplantées dans des pots en plastique d'une capacité de 3 kg, à raison de 50 à 60 plantes par pot, et mises en culture en serre à une température comprise entre 25 et 30°C.

- On a transplanté quatre grains de tournesol dans chaque pot, comme dans l'image ci-dessous.



#### ✚ Cinétique de germination des graines de *Tournesol* :

-La cinétique de germination se fait par imbibition -dans des boites de pétri- (après désinfection des grains comme dans le protocole d'irrigation) des graines dans les différents effluents en comparant avec le témoin positif (dans l'eau) et le témoin négatif (dans les margines bruts).

-L'incubation se fait dans une température de 37°C, on a imbibé 25 graines de tournesol dans 35ml d'effluent par boîte.



-On a imbibé dans 8 boites de pétri (tableau 4), on note les résultats chaque 24h pendant 3 jours.

**Tableau 4 : les différents effluents dont on a imbibé les graines de tournesol avec le témoin positif (l'eau) et le témoin négatif (MB).**

boite 1	boite 2	boite 3	boite 4	boite 5	boite 6	boite 7	boite 8
MB	Diluée à 1/2	Diluée à 1/4	Diluée à 1/10	CF	CH	SA	Eau

**✚ Protocole d'irrigation :**

- Nous avons optés pour un essai d'irrigation de la plante tournesol avec différents effluents de margines en comparant avec les témoins.
- Le témoin positif irrigué avec de l'eau et le témoin négatif avec les margines bruts.
- Après la germination des plantes (voir l'image suivante), l'irrigation se fait par un volume de 100ml une fois tous les deux jours.



**✚ Suivi de la croissance végétative :**

- Le suivi de la croissance végétatif se fait par mesurer la longueur des végétaux une fois tous les deux jours, en notant les mesures dans un tableau on peut comparer la croissance végétative de plantes irriguées par différents effluents et les témoins négatif et positif.
- Les résultats obtenus sont représentés sous forme de graphe.

**✚ Suivi microbiologique du sol :**

-Les analyses microbiologiques des margines sont réalisées à travers le dénombrement de la Flore mésophile aérobie totale {FMAT}.

1. Préparation de milieu de culture PCA :

Le milieu de culture PCA est préparé dans un Erlèn Meyer d'un litre, dont les composés sont :

Agar agar ..... 15g  
Peptone ..... 5g  
Extrait de levure ..... 2,5g  
Glucose ..... 1g

-Le mélange est agité avec un agitateur puis stérilisé à l'autoclave et mis au réfrigérateur.

-On coule le milieu dans des boîtes de pétri après avoir les stériliser à l'autoclave.

## 2. Dénombrement :

L'analyse microbiologique des échantillons a été réalisée avant et après irrigation par des margines traitées, brutes (témoin négatif) et l'eau (témoin positif).

Après homogénéisation du sol par agitation dans l'eau physiologique stérile, une série de dilutions est réalisée. Un volume de 0,1 ml de chaque dilution appropriée est étalé sur des boîtes de Pétri contenant le milieu PCA

### 1. Préparation des dilutions :

1 /10 SM	10-3	10-5
1g du sol +10ml	10 µl de la solution mère	10µl de la dilution 10-2
EPS	+ 990 µl EPS	+ 990 µl EPS

### 2. FMAT :

Le milieu de culture utilisé est le milieu PCA, l'incubation des boîtes étalées est effectuée à 37°C pendant 48 heures.

## Résultats et discussion :

### I. Caractéristiques physico-chimiques des margines :

- Avant d'effectuer les tests de traitement, une caractérisation de cet effluent s'impose. Le tableau 5 représente les différents paramètres physico-chimiques de la margine.

**Tableau 5 : Caractéristiques physico-chimiques des margines étudiées.**

Paramètres	Margine brute	Margine diluée 10 fois	Margines traitées par $FeCl_3$	Margines traitées par $Al_2(SO_4)_3$	Margines traitées par $Ca(OH)_2$
pH	4,00	4,60	-	-	-
Turbidité (NTU)	890	320	0,72	1,80	56,4
Conductivité (mS/cm)	11,5	1,850	14,80	9,98	6,62
Salinité	6,9	0,8	8,7	5,7	3,7
Chlorures (mg Cl- /l)	7100	-	700	355	355
Polyphénols	2,	-			
Orthophosphates (en mg de P)	0,52708	-	0	0	0

L'analyse de ces résultats (Tableau 5) montre que l'effluent est acide. Cette valeur faible de pH due à la richesse de la margine en acides organiques (acides phénoliques, acide gras, etc). Les valeurs de **turbidité et salinité** sont très élevés. Ils dépassent largement les teneurs des paramètres physico-chimiques de rejet des eaux usées domestiques ou urbaines.

Après dilution, les caractéristiques des margines montrent une faible augmentation du **pH** et une diminution de **la turbidité**.

Les margines étudiées ont une **conductivité électrique** trop élevée de l'ordre de 11 mS.cm<sup>-1</sup> et une salinité de 6. 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.

La teneur en **chlorures** dans les margines brutes est élevée par rapport à celle des margines traitées, donc le traitement de ces effluents fait diminuer les chlorures. Cette forte teneur en chlorures est due à la pratique du salage (ajout du sel en quantités importantes) pour la conservation des olives avant le processus d'extraction.

Ces rejets sont aussi caractérisés par la prédominance de substances toxiques notamment les composés phénoliques qui leur confèrent un pouvoir antimicrobien. Cette concentration élevée pourrait entraîner une perturbation profonde de tout écosystème.

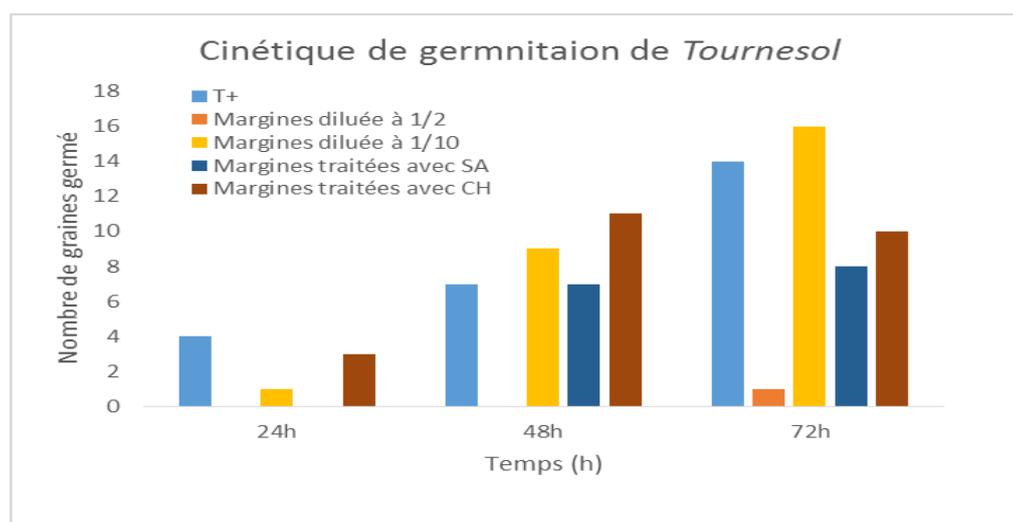
On remarque d'après le tableau que la teneur en **polyphénols** est élevée dans les margines brutes que dans les effluents traités. On constate donc que le traitement des margines diminue la teneur en polyphénols qui sont la cause essentielle à leur toxicité.

Pour la teneur en **orthophosphates**, on remarque qu'elle est élevée dans les margines brutes et nulle dans les effluents des margines traitées. On déduit donc que le traitement des margines diminue et élimine les orthophosphates des effluents.

## II. Valorisation des margines :

### ✚ Cinétique de germination des graines de Tournesol :

Nous avons imbibé 25 graines / 35ml .boite, après incubation dans 30°C on compte le nombre des graines de tournesol qui ont germées dans des différents effluents chaque 24h pendant 3jours, La figure suivante (figure 4) montre les résultats obtenus sous forme d'un graphe.



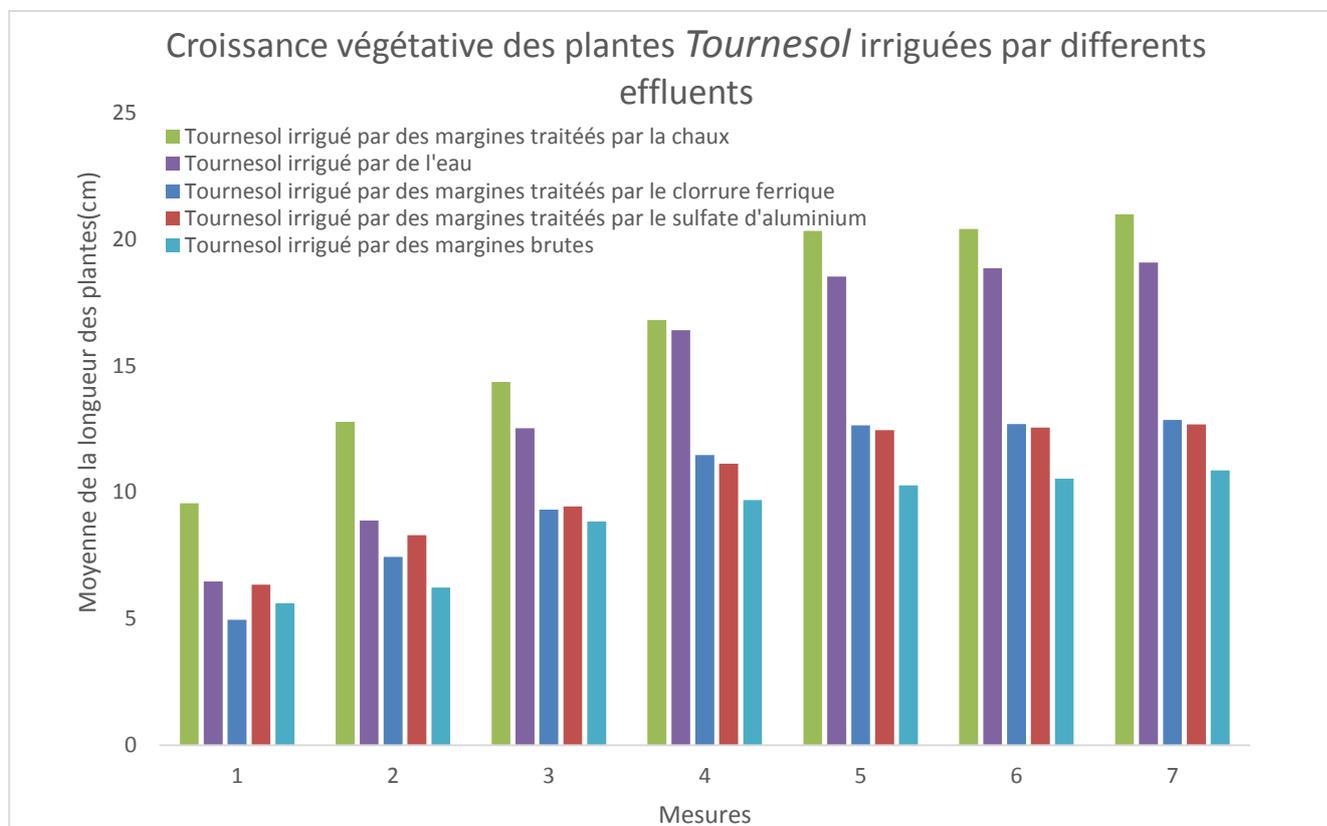
**Figure 4 : cinétique de germination de tournesol :**

L'analyse du graphe montre que les graines qui ont subi une bonne germination sont celles imbibées dans l'eau (T+), de même pour les graines imbibées dans les margines diluées à 1/10 et les effluents traités par SA et CH, alors que les margines brutes et les margines diluées à 1/2 aucune graine n'est germée. On peut déduire que les margines ont un impact nocif sur la germination à cause de sa teneur en polyphénols, son acidité, salinité...

On constate donc que le traitement des margines diminue ou annule cette toxicité et on trouve que les graines germent après leur imbibition dans des effluents traités.

### ✚ Suivi de la croissance végétative :

On prend les mesures de la taille des plantes de la culture de tournesol dès qu'on a commencé à irriguer par les effluents, les résultats obtenus sont représentés sous forme de graphique (voir figure5).



**Figure 5 : croissance végétative des plantes Tournesol irriguées par différents effluents.**

L'analyse du graphique montre que la taille des plantes augmente progressivement avec le temps.

Nous enregistrons que les plantes irriguées par les margines traitées par la chaux se croissent plus par rapport aux autres traitements et par rapport aux témoins.

Les plantes irriguées par l'eau se croissent de même plus que les plantes irriguées par les margines traitées par CF et SA.

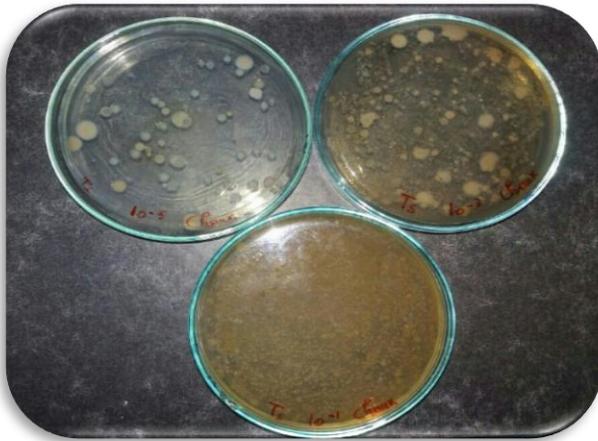
Les plantes qui ne sont pas bien crû sont celles irriguées par les margines brutes.

On déduit que le traitement le plus efficace c'est celui de la chaux.

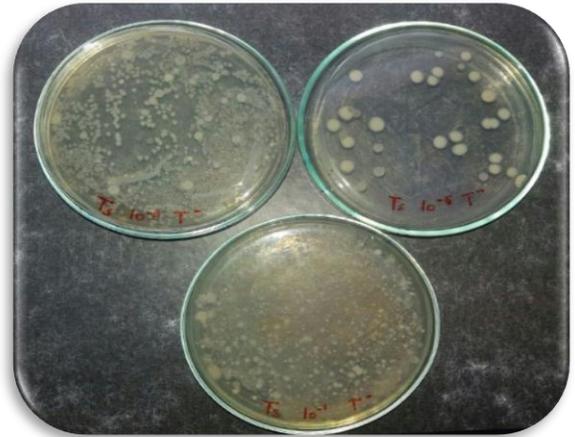
### ✚ Suivi microbiologique du sol :

Les analyses microbiologiques du sol ont porté sur la flore mésophile aérobie totale (FMAT).

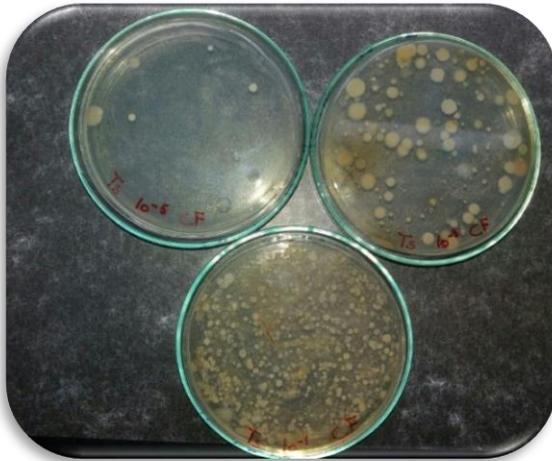
Les résultats du dénombrement des FMAT sont représentés en UFC par boîte, le tableau et les figures suivantes montrent les résultats obtenus.



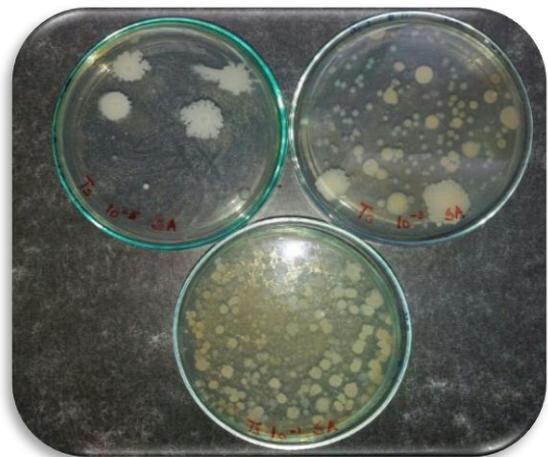
Traitement par la chaux (CH)



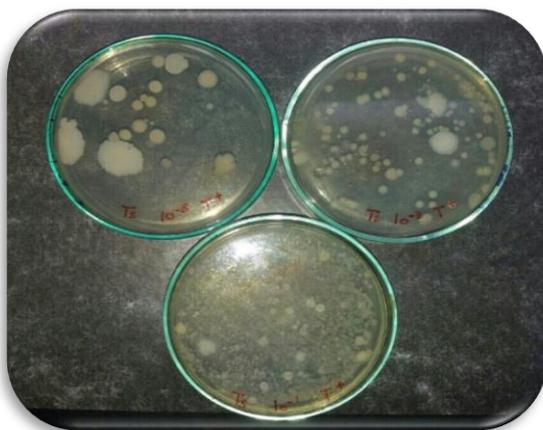
Les margines brutes (T-)



Traitement par chlorure ferrique (CF)



Traitement par sulfates d'alumine (SA)



L'eau (T+)



Le sol intact (SI)

**Tableau 6 : Résultats des dénombrements des FMAT pour le sol intact et les sols traités par différents effluents en comparant avec le témoin négatif et le témoin positif.**

Dilution	Nombre de colonies en UFC par boîte					
	SI	T+	CF	SA	CH	T-
10-1	Tapis	Tapis	Tapis	Tapis	Tapis	Tapis
10-3	294	174	287	300	Tapis	Tapis
10-5	13	22	24	15	76	56

Les margines sont des effluents liquides générés par la fabrication de l'huile d'olive vierge, essentiellement durant les mois de novembre et de décembre. Ces effluents présentent les caractéristiques d'un bon fertilisant et leur valorisation en agriculture constitue une excellente solution d'épuration et de valorisation [11].

Il existe peu d'études sur l'impact de l'épandage des margines sur la composition microbienne du sol [60]. De ce fait, nous avons procédé à un essai d'irrigation par des margines dans le but d'évaluer leur effet sur la flore mésophile aérobie totale du sol.

D'après le tableau on constate que le nombre des MO évolue après irrigation par les différents effluents de margines.

On remarque aussi que le traitement qui a favorisé la croissance des MO est celui de la chaux, donc il est le plus fertilisant.

Cette évolution croissante de la FMAT pourrait être expliquée par l'enrichissement du milieu en azote minéral par les aérobies d'azote qui s'activent également suite à l'irrigation.

## **Conclusion :**

Les margines avec ses propriétés physico-chimiques et microbiologiques représente l'un des problèmes les plus importants auxquels sont confrontés les pays de la Méditerranée, en raison de ses effets néfastes sur les écosystèmes, ce qui pousse à consacrer beaucoup d'efforts pour réduire le taux de pollution et à proposer des solutions convenables, citons le traitement chimique et la valorisation des margines.

Les objectifs principaux de ce travail sont d'une part, d'utiliser des margines traitées chimiquement- dans le but de diminuer leur charge en polyphénols qui sont la cause principale de leur toxicité- pour irriguer des plantes de tournesol, et d'autre part de caractériser les propriétés physico-chimiques et microbiologiques du sol avant et après irrigation par ces effluents de margines, ainsi la croissance végétative des plantes après irrigation.

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, et une diminution de la teneur en polyphénols et en orthophosphates, on peut déduire que le traitement des margines a diminué leur toxicité.

L'étude de la croissance de même a montré que après irrigation par des margines traitées les plantes se croissent d'une façon normale, et surtout ceux qui sont irrigués par les effluents traités par la chaux.

D'après ce qu'on a trouvé on peut déduire que le traitement le plus efficace est celui de la chaux. On peut expliquer le non efficacité des autres traitements par la présence des métaux lourds comme le fer, l'alumine etc ... qui peuvent empêcher la réalisation des résultats attendues.

On conclut que les caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques s'améliorent et la toxicité diminue lors du traitement des effluents, vue que le test d'irrigation est achevée donc on a pu assurer une valorisation de ces margines avec le moindre des couts.

## **Références**

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. C. SAIZ-JIMENEZ, in "International Symposium on Olive By-products valorization", Sevilla, Spain,(1986) 61-76
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. 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.
10. 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
11. Ranalli A. (1991). The effluent from olive mills: Proposals for re-use and purification with reference to Italian legislation, *Olivae*, 37,30-39.

- 12.** Ramos-Cormenzana A, (1986). Physical, chemical, microbiological and biochemical characteristics of vegetation water. In: inter. Sump: On olive by-products valorization. Sevilla-Spain.41-60.
- 13.** Karapinar M, Worgan M.J.T, (1989). Bioprotein production from the waste products of olive oil extraction, *J. Chem. Tech. Biotechnol*, 33, 185-188.
- 14.** 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 Federale d'Allemagne.
- 15.** 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.
- 16.** Balice V., Carrieri C., Carrieri G. (1997) Trattamento chimico-fisico seguito dal biologico delle aque di vegetazione delle olive, *Ricerca*, 2, 50-53.
- 17.** Balice V., Boari G., Cera O., Abbaticchio P. (1982) Indagine analitica sulle acque di vegetazione. Nota 1. *Inquinamento* 7, 49 – 53.
- 18.** Shahidi F, Naczk M (2003) Phenolics in food and nutraceuticals. Boca Raton, FL, USA: CRC Press; 21,37-53.
- 19.** Ranalli A. (1992) Microbiological treatment of oil mill waste waters. *Grasas y Aceites*, 43, 16-19.
- 20.** Vinha AF, Ferreres F, Silva BM, Valentão P, Gonc , alves A, Pereira JA, Oliveira MB, MB, Seabra RM, Andrade PB. (2005) Phenolic profiles of Portuguese olive fruits (*Olea europaea* L.): Influences of cultivar and geographical origin. *Food Chem*,89,561–8.
- 21.** Lesage L., Navarro D., Maunier S., Sigoillot JC., Lorquin J., Delattre M., Simon JL., Leslie, S.B., Israeli, E., Lighthart, B., Crowe, J.H. and Crowe, L.M. (1995) Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3592-3597
- 22.** Capasso., R., Evidente A., Scognamiglio F. (1992) A simple thin layer chromatographic method to detect the main polyphenols occurring in olive oil vegetation waters. *Phytochem Anal*; 3:270–5.

23. 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.
24. 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.
25. Hattenschwiler S. et Vitousek P.M., (2000). The role of polyphenols in terrestrial ecosystem nutrient cycling. *Trends in Ecology and Evolution*. 15: 238-243.
26. Fiorentino F., Garofalo A., De Santi G., Bono., G.B.Giusto G.Norrito (2003) Spatio-temporel distribution of recruits (o group) of *Merluccius* and *Phycis blennoides* (Pisces ; Gadiformes) in the Strait of Sicily (Central Mediterranean). *Hydrobiologie* 503 :223-236.
27. Mébirouk M. (2002) Rejets des huileries, développement d'un procédé intégré pour la biodégradation des polyphénols dans les margines .CMPP NEWS n°1.
28. Lacomelli A. (2000) olive mill waster & Sap adapted by Bacron contracting parties-work shop on agro-industry development in the coastal areas, with special focus on the olive oil industry-Beirut Lebanon,12,120-134
29. Ben yahia et Zein K (2003) Analyse des problèmes de l'industrie de l'huile d'olive et solution récemment développée. Contribution spéciale de sustainable business associates (Suisse) à Se sec.
30. Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (FAO). 93-110. Tunisie. (1983).
31. Filidei S., Masciandro., G and Ceccanti. (2003) Anaerobic digestion of oil mill effluents: evaluation of wastewater the organic load and phytotoxicity reduction water, air and soil pollution, 145, 79-94.
32. Cadillon M (1991) la valorisation agronomique des margines, 3ème rencontre de l'Agence Régionale pour l'Environnement Provence Alpes Côte d'Azur.
33. Manahan SE (1994) *Environnement chemistry*, 6ème Ed, USA, Lewis Publisher.
34. Diamadopoulos E., Samaras P., Sakellaropoulos G.P. (1992) the effect of actived carbon Properties on the adsorption of toxic substances. *Watt. Sci. Tech.*, 25, 153-160

- 35.** Castillo-Rivera L.A. (1999) Etude d'effluent difficilement biodégradable: Caractérisation et Traitement par procédés d'oxydation avancée (POA). Thèse de Doctorat. Université Aix-Marseille I, Marseille, France, 35-54.
- 36.** Fiestas Ros de Ursinos J.A. (1958) Caractéristiques et Elimination des eaux résiduelles des Usines à huile. Ière Conférence Internationale des Techniciens oléicoles. 21-27, Mai, Tanger-Maroc. 5-12.
- 37.** Mendia L., Procino L. (1964) Studio sul trattamento delle acque di rifiuto dei frantoi oleari. Pro. ANDIS conference. Bologna, Italy, 6, 12-17.
- 38.** Beccari M., Majone M., Riccardi C., Savarese F., Torrisi L. (1999) Integrated treatment of olive oil mill effluents : effect of chemical and physical pretreatment on anaerobic treatability. *Wat. Sci. Tech.*, 40, 347-355.
- 39.** 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.
- 40.** 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.
- 41.** 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.
- 42.** Hamdi M., Bouhamed H., Ellouz R. (1991b). Optimisation of *Aspergillus niger* growth on olive mill wastewaters, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 36, 285-288.
- 43.** 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.
- 44.** 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.

- 45.** Fiestas Ros de Ursinos J.A., Leon G., Garcia B ., Maestrojuan S (1986) Possibilidades de utilizacion del alpechin como fertilisante. Simposio Internacional. Sobre Valorizacion de los subproductos del olivar : alpechin y orujo. Marzo, Sevilla- Aspana. 5-6-7,321-330.
- 46.** Goncalves C, Pereira C, Belo I. (2010) Comparison of batch and fed-batch lipase production from olive mill wastewater by *Yarrowia lipolytica* and *Candida cylindracea*. *J Biotechnol* ;150 S:S1–576. In Special Abstracts
- 47.** Niaounnakis C., Halvadakis. (2003) OMW management, Greece ISBN 960-402-123-0.
- 48.** Obied H., Allen M., Bedgood R. (2007). Bioscreening of Australian olive mill waste extracts: Biophenol content, antioxidant, antimicrobial and molluscicidal activities. *Food Chem Tox*;45:1238–48.
- 49.** Tsimidou M., G. Papadopoulos, D. Boskou. (1992) Phenolic Compounds and Stability of Virgin Olive Oil. *Food Chem.* 45: 141-144.
- 50.** Chatzisyneon E., Xekoukoulotakis N., Mantzavinos D., (2009). Determination of key operating conditions for the photocatalytic treatment of olive mill wastewaters. *Catal. Today* 144, 143-148.
- 51.** Celano G.,Smejkalova D., Spaccini R., Picco A (2008) Interaction of three s-triazines with humic acids of different structure, *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 56, 7360-7366
- 52.** Martirani L., Giardina P., Marzullo L., Sannia G. (1996) Reduction of phenol content and Toxicity in olive mill wastewaters with the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Water*.
- 53.** Fiestas Ros de Ursinos J.A. (1981) Différentes utilisations des margines. Actes du Séminaire International sur la valorisation des sous-produits de l'olivier. Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (FAO). 93-110. Tunisie.
- 54.** Ercoli E., Ertola R. (1983) SCP production from olive black water. *Biotechnol. Lett.*, 7, 457-462.
- 55.** Giuliotti 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.
- 56.** D'Annibale., Ricci M ., Quartino D., Federici F ., Fenice M. (2004) *Panus tigrinus* effeciently removes phenols, color and organic load from olive mill wastewater.*Res.Microbiol.* 155,596-603.

**57.** Khoufi S., Aloui F., Sayadi S (2006). Treatment of olive oil mill wastewater by combined process electro-Fenton reaction and anaerobic digestion. *Water Res.*, 40: 2007–2016.

**58 .** LES FICHES TECHNIQUES AB – v. 2012 Réalisation : Groupe technique AB Franche Comté .

**59.** méthode de Vázquez-Roncero et al., 1973

**60.** Lombardo et al., 1988; Briccoli Bati et al., 1990; Marsilio et al., 1990; Cicolani et al., 1992; Picci et Pera, 1993