

## Valorisation des margines dans la région de Fes

### [ Valorization of margins in the region of Fes ]

*Abdelkhalek Touahar<sup>1</sup> and Amina Stout<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Laboratoire de Biodiversité et Ressources Naturelles, Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université Ibn Tofail, B.P. 133, Kénitra, Morocco

<sup>2</sup>Laboratoire de Biotechnologie Microbienne, UFR Amélioration et Transformation Microbienne et Végétale, Faculté des Sciences, Université Ibn Tofail, BP 133, 14000 Kénitra, Morocco

Copyright © 2022 ISSR Journals. This is an open access article distributed under the *Creative Commons Attribution License*, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

**ABSTRACT:** Margine, effluents from olive oil extraction, pose serious pollution problems due to their high concentration of organic matter and Polyphenols, often discharged into river waters and thus represent a significant pollution load, consider as a source of concern for the region. In our study, we were interested in looking for treatment techniques to reduce the harmful effect of vegetable water, and the different areas that can benefit from the recovery of these effluents. The use of the two-phase system or that of improving the three-phase system by installing a pretreatment system (physicochemical and biological) in the oil mills, remain among the most suitable solutions to be applied in our region, the exploitation of our recommendations remains a little limited unfortunately, and this is mainly due to economic constraints.

**KEYWORDS:** margine, polyphenols, treatment, recovery.

**RESUME:** 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 poly phénols, souvent rejetées dans les eaux des fleuves elles représentent ainsi une charge de pollution importante, considérer comme une source d'inquiétude pour la région. Dans notre étude, on s'est intéresser à chercher des techniques de traitement réduire l'effet nuisible des margine, et les différents domaines qui peuvent bénéficier de la valorisation de ces effluents. L'utilisation du système bi phasique ou bien celle de l'amélioration du système tri phasique par l'installation d'un système de prétraitement (physico- chimique et biologique) dans les huileries, restent parmi les solutions les plus convenables à appliquées dans notre région, l'exploitation de nos recommandations reste un peu limitée malheureusement, et ceci est due essentiellement à des contraintes économiques.

**MOTS-CLEFS:** margine, polyphénols, valorisation.

## 1 INTRODUCTION

La margine constitue un problème environnemental pour les pays qui produisent de l'huile d'olive dont le Maroc. De nombreuses études ont mis l'accent sur le traitement et la valorisation des margines. Ces derniers sont riches en éléments nutritifs minéraux et organiques [1]. Ce critère a amené les chercheurs à mettre au point de nombreux procédés de valorisation et d'exploitation des margines [2]. Parallèlement aux recherches réalisées sur le traitement des margines, des études de valorisation ont été effectuées. Les margines sont riches en poly phénols qui se caractérisent par leur pouvoir anti- microbien [3-4]. 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. Les chercheurs ont identifié dans le margine dérivés d'acide cinnamique tels que (l'acide caféique), (l- caffeil - glucose), les acides benzoïque, l'acide vanillique, éthanol / 3-3,4 dérivés \_dihydroxyphenyl (4 - hydroxytyrosol - poids - glucoside, 4 hydroxytyrosol - di glucoside et oleuropéine) et les flavonoïdes tels que (l'apigénine, flavanone, la lutéoline, lutéoline -7- glucoside) et de la quercétine, l'acide protocatéchique, l'acide vanillique, l'acide p-hydrox benzoïque, le p- hydroxybenzaidehyde, le tyrosol, l'hydroxytyrosol, l'acide hydroxyphényl, syringaldehyde p- cumarique, p- vanilline, l'acide férulique, le 3,4 dihydroxymandélique acide et souletin [5-6].

## 1.1 MARGINE

### 1.1.1 DEFINITION

Les margines sont des eaux de végétation qui sont générées lors de l'extraction de l'huile d'olive vierge. Ce sont des effluents riches en matière organique (composés phénoliques, lipides, sucres, protéines...) et en sels minéraux (potassium, Sodium, magnésium...). Ces margines sont souvent épandues de manière incontrôlée sur les sols agricoles ou stockées dans les cuvettes, exposant ainsi les systèmes eau sol- plant à une pollution inéluctable [7].



Fig. 1. Rejet des margines dans un Oued

### 1.1.2 ORIGINE DES MARGINES

Les margines sont obtenues lors de l'extraction de l'huile d'olive à partir de l'eau contenue dans le fruit, ajoutée au cours du broyage et des étapes de trituration. La qualité et la quantité des margines dépendent de l'opération d'extraction d'huile d'olive. Elles sont aussi influencées par la variété d'olives, la saison de récolte, le taux de maturation des fruits et les conditions climatiques. Les différentes techniques d'extraction d'huile d'olive aboutissent à la formation des margines en quantités variables, allant de 400 à 500 L/tonne d'olives pour les unités traditionnelles et une tonne de margines /tonne d'olives pour les unités modernes [8].

### 1.1.3 CARACTERISTIQUE PHYSICO- CHIMIQUES ET CARACTERISTIQUES BIOLOGIQUE

#### 1.1.3.1 LES CARACTERISTIQUES PHYSIQUES

Les margines sont des liquides résiduels aqueux brun, avec un goût amer. Leur pH est acide (4 - 5,5), elles dégagent une odeur fétide qui se développe au fur et à mesure que les margines vieillissent [9-10].

#### 1.1.3.2 LES CARACTERISTIQUES CHIMIQUES

Stipule que les analyses menées sur les margines (Tab.1) peuvent nous renseigner sur la variabilité des paramètres chimiques [11].

Tableau 1. Caractéristiques physico-chimiques des margines

Paramètres	Unité	Valeurs moyennes	Référence
PH	Echelle (0-14)	4-5,5	C.O.I. 1990 et Levi-Minzi al.1992
Conductivité	ms/cm	18-50	Levi-Minzi et al.1992
DBO5	g/l	100	Balice et al.1990
DCO	g/l	200	Balice et al.1990

#### 1.1.3.3 CARACTERISTIQUES BIOLOGIQUES

Il existe plusieurs paramètres biologiques intervenir dans la caractérisation des margines tel que la demande chimique en oxygène et la demande biologique en oxygène.

**Tableau 2. Caractéristiques biologiques des margines [12]**

Paramètres	Valeurs
DCO	100 à 200 kg /m
DBO5	100 kg /m
Poly phénols	1; 2 g/l

#### 1.1.4 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 [13-14].

**Tableau 3. Composition chimique de la pâte des margines obtenue par le procédé Dalmolive [65]**

Composant	Valeurs % de la matière sèche totale
Matière azotée totale	21.6
Matière grasse	4.0
Cellulose brute	13.1
Matière minérale	8.9
Extrait non azotée	52.5
Matière azotée digestible	17.2

##### 1.1.4.1 FRACTION MINERALE

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].

##### 1.1.4.2 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 [16].

###### 1.1.4.2.1 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, la raffinose et le xylose sont aussi présent [17-18].

###### 1.1.4.2.2 COMPOSES PHENOLIQUES

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.

###### ➤ 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.

###### ✓ 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 [19, 20]
- Acide p-coumarique [19,20]
- Acide protocatéchique [19,20]
- Acide vanillique [19,20]

- Acide 4-hydroxyphénylacétique [20]
- Acide syringique [21]
- Acide p-hydrox benzoïque [21]
- Acide vératrique [21]

### ✓ Alcools phénoliques

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

- Hydroxyphényléthanol [22].
- dihydroxyphényléthanol [22]
- hydroxyphényléthanol (tyrosol) [19].
- Syringaldéhyde [19].

Ces alcools peuvent être parfois liés à des glucosides comme le 4-di glucoside  $\beta$  (3,4\_dihydroxyphenyl) éthanol.

### ✓ Les polymères phénoliques

Les poly phénols identifiés dans les margines sont essentiellement:

- Les anthocyanes.
- Les tannins: leur structure est très complexe, leur

Concentration peut atteindre 12 g.l<sup>-1</sup> [23-24]. Ils sont classés conventionnellement en tanins hydrolysables et tanins condensés.

### ➤ Autres composés phénoliques

D'autres composés phénoliques monomères ont été identifiés [25]:

- Oleuropéine
- L-caféyl- glucose
- Apépine
- Lutéoline

## 1.2 IMPACTS DES MARGINES SUR L'ENVIRONNEMENT

Selon [26], le rejet des effluents des industries productrices d'huiles d'olive est un problème majeur surtout dans les pays du bassin méditerranéen. Ces eaux fortement polluées causent de sérieux dégâts environnementaux (figure 1).

### 1.2.1 LA POLLUTION DE L'AIR

Causée généralement par la décomposition de ces effluents. Leur forte teneur en sels, leur forte charge organique et leur acidité saturer les milieux récepteurs et provoquent des dégagements d'odeur désagréable liée à la formation d'hydrogène sulfureux (H<sub>2</sub>S), lors du processus de fermentation [27].

### 1.2.2 LA POLLUTION DES EAUX

Leur très forte charge en matière organique empêche les eaux de s'auto-épurer et la pollution peut s'étendre sur de très longues distances [28]. Leur teneur en matière grasse provoque la formation d'un film imperméable, empêchant la pénétration de la lumière et de l'oxygène et leur forte acidité provoque l'asphyxie de la faune et la flore marine [29]. Caractères Valeurs DCO g/l 340 Composé phénolique g/l 2,05 Chlorure g/l 11.16 Conductivité ms/cm 24 pH 4,75 Taux des sucres g/l 26,87 DBO5 g/l 1250 Matière sèche g/l 240 Matière minérale g/l 23 Matière volatile g/l 212 Matière en suspension g/l 10 Taux d'humidité % 86 Masse volumique (g/cm<sup>3</sup>) 1,05.

### 1.2.3 LA POLLUTION DU SOL

L'épandage direct des effluents d'huileries d'olive sur les sols provoque un colmatage et une diminution de leur qualité [30]. Les substances toxiques contenues dans ces eaux se fixent dans les sols. Certaines de ces substances telles que les phénols peuvent inhiber l'activité microbienne du sol [31].

### 1.3 LES TRAITEMENTS DES MARGINES

Jusqu'à nos jours, le traitement des margines constitue un problème complexe vu la qualité et la quantité des substances chimiques qu'elles renferment. En effet, l'application d'un traitement simple s'avère insuffisant et incomplet [32]. 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:

- Procédé thermique,
- Procédé physique,
- Procédé chimique,
- Procédé biologique.

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 [33].

#### 1.3.1 PROCÉDES 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 faible 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
- 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, formation d'une croûte, des panneaux évaporateurs dans les bassins de stockage des margines ont été introduits. 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<sup>2</sup>/m<sup>3</sup> du bassin. Parmi les inconvénients de cette méthode; le dégagement de mauvaises odeurs et l'importance du coût d'énergie dépensée.

#### 1.3.2 PROCÉDES 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 résiduels, 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 résiduelles. 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.

### 1.3.2.1 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).

### 1.3.3 PROCEDES 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 (120à330°C), le procédé d'oxydation fournit du CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>O; 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.

### 1.3.4 PROCEDES 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 terreurs*, *Phanérochaete chrysosporium* et *Pleurotus ostreatus* [34].

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 [35].

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 subit ensuite une digestion anaérobie [36-437]. 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'O<sub>2</sub>.l<sup>-1</sup>).

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 [38]. D'autres travaux ont prouvé l'efficacité du traitement aérobie des margines par *Phanérochaete 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'O<sub>2</sub>.l<sup>-1</sup>. 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 *Geotrichum* sp, *Aspergillus* sp. Et *Candida tropicalise* respectivement [39]. L'inconvénient majeur du traitement aérobique est la consommation excessive d'oxygène. En général, le traitement des margines par l'application seule des procédés biologiques a donné des résultats insuffisants [40]. 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 [41]. 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 (Up flow Anaérobie Sludge Blanked UASB) et les lit de boues à filtre anaérobie.

#### **1.3.5 PROCÉDES 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 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 poly phénols contenus dans les margines, substances toxiques contenus dans ces eaux, un prétraitement est donc nécessaire et se fait par électrocoagulation.

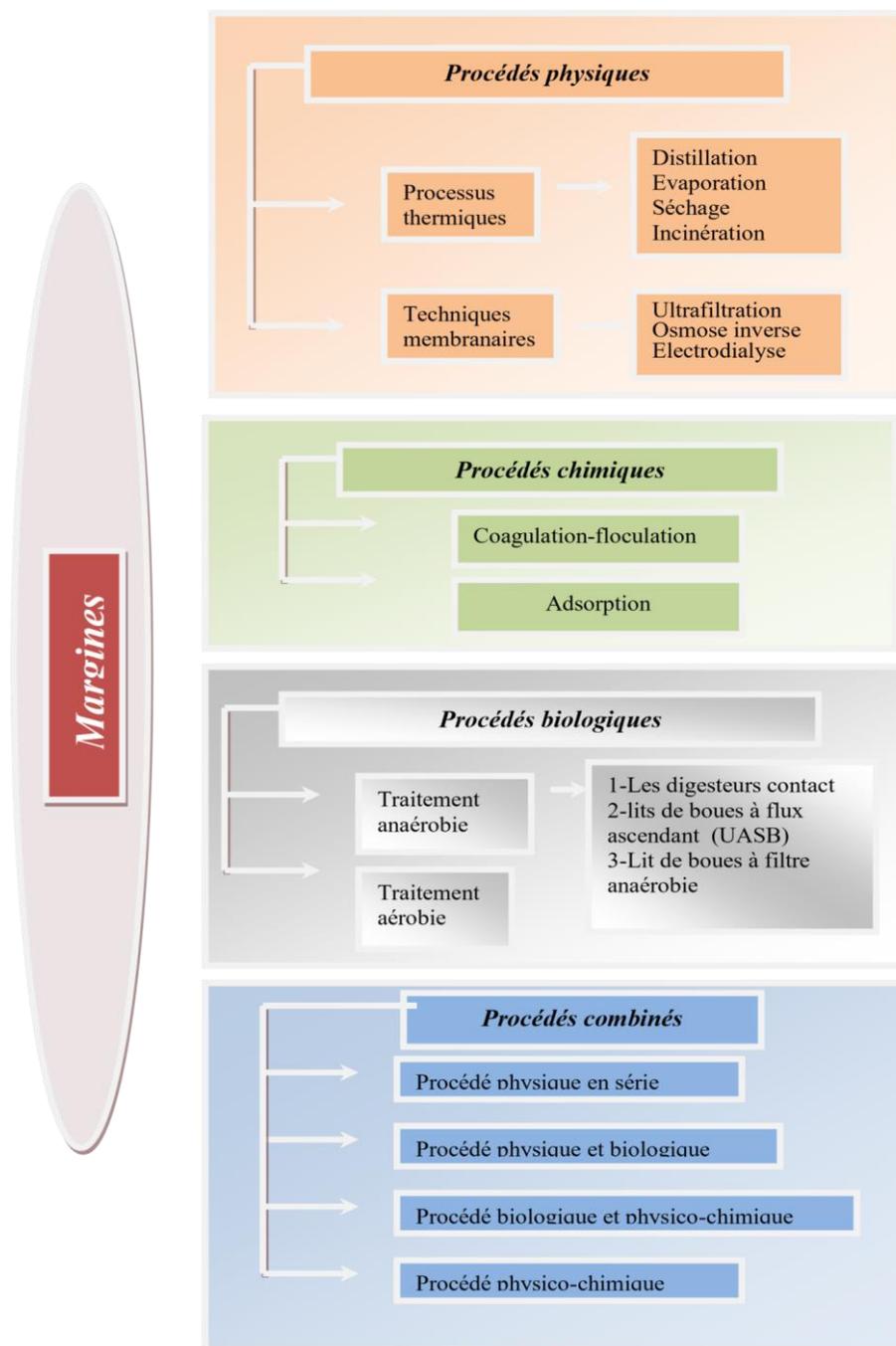


Fig. 2. Les principales voies de traitement des margines

#### 1.4 LA VALORISATION DES MARGINES

Parallèlement aux recherches réalisées sur le traitement des margines, des études de valorisation ont été effectuées. 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 [42]. 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.

##### 1.4.1 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 [42].

### 1.4.2 COMPOSTAGE DES MARGINES

Les margines peuvent être utilisées pour obtenir un compost fertilisant pour les sols [43]. Le compostage des margines a été réalisé traditionnellement en Espagne dans des bassins d'évaporation [44, 45]. La technique consiste à ajouter aux margines toutes sortes de résidus secs, agricoles ou forestiers, et le mélange subit une fermentation aérobie anaérobie. Ensuite, un séchage partiel et un conditionnement sous forme de pellette sont effectués. Le produit ainsi obtenu est utilisé comme engrais. L'avantage du compost formé à partir des margines est l'absence des micro-organismes pathogènes avec des concentrations élevées de phosphore et de potassium contrairement aux résidus solides urbains [46]. On a mis en œuvre un procédé permettant la biotransformation des margines en engrais. Les margines sont mélangées avec la paille de blé, et compostées sous aération forcée.



Fig. 3. Le compostage des margines

### 1.4.3 PRODUCTION DES PROTEINES D'ORGANISMES UNICELLULAIRES (POU)

L'obtention des protéines unicellulaires constitue une des solutions optimales pour la valorisation de l'effluente huilerie d'olive. La plupart des procédés appliqués sont basés sur l'utilisation des levures capables de transformer les substances organiques en biomasse à haut contenu en protéines et vitamines de grande valeur pour l'alimentation animale et même humaine [47].

### 1.4.4 PRODUCTION D'ENZYMES

Les effluents huileries d'olive peuvent être utilisés comme milieu pour la production d'enzymes en utilisant des microorganismes. Cultivés sur les effluents huileries d'olive, *Cryptococcus albidus* permet une production de 13 UI/ml de pectinases en 48 heures. Cette production peut être améliorée à 29.6 UI/ml en éliminant les phénols par floculation clarification [48]. La réutilisation de ces enzymes pectinolytiques dans le processus mécanique d'extraction d'huile d'olive permet d'augmenter le rendement en huile [49].

### 1.4.5 EPANDAGE

La valorisation des margines par épandage a été largement étudiée par plusieurs auteurs [50, 51, 52, 53]. Les margines peuvent être utilisées dans l'irrigation en raison de leur richesse en eau et en minéraux nutritifs. Un mètre cube de margines apporte 3,5 à 11 kg de K<sub>2</sub>O; 0,6 à 2 kg de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> et 0,15 à 0,5 kg de MgO par hectare de terrain irrigué. Cependant, cette technique présente certains inconvénients: Problèmes de stockage vu que la période oléicole coïncide avec la période pluviale, Colmatage du sol [51], L'acidité et la salinité élevées peuvent provoquer des brûlures sur les plantes [54], Contamination des eaux souterraines [55,51], Inhibition de la germination due à l'effet phytotoxique exercé par les composés phénoliques sur les plantes [50,51], Modification de la composition de la flore du sol [55], Modification des caractéristiques physico-chimiques du sol [56, 57] et Coût élevé de transfert des margines des huileries vers les terres agricoles. Quoique le potassium et le phosphore contenus dans les margines puissent remplacer ceux des engrais chimiques, l'acidité, la forte salinité et la haute conductivité, ainsi que le contenu en composés phénoliques sont à l'origine d'une limitation de toute utilisation efficace des margines comme fertilisant. Pour résoudre partiellement ce problème, [58] ont développé une méthode automatique pour la détermination et la récupération des anions inorganiques totaux présents dans les margines après 10 minutes. Cette technique repose sur l'utilisation de la dialyse couplée à la chromatographie d'échange ionique sans l'addition de réactifs qui risquent d'infecter les quantités d'anions solubles.



*Fig. 4. L'épandage des margines*

#### **1.4.6 PRODUCTION D'ANTIOXYDANTS NATURELS**

Huile d'olive est classée parmi les huiles végétales les plus résistantes à l'autoxydation. Cette stabilité oxydative est fortement liée à la teneur en composés phénoliques totaux. Cette résistance à l'oxydation des huiles vierges diminue assez rapidement quand on élimine les poly phénols par extraction au méthanol [59].

Des chercheurs ont proposé d'extraire les composés phénoliques de l'effluente huilerie d'olive pour les valoriser en tant qu'antioxydants naturels. Parmi les composés les plus utilisés on peut citer l'acide caféique, le tyrosol et l'acide 4-hydrox benzoïque. Ces derniers sont des précurseurs très utilisés dans l'industrie agro-alimentaire et pharmaceutique [60].

#### **1.4.7 UTILISATION EN ALIMENTATION ANIMALE**

Les margines ont été utilisées directement comme aliment pour le bétail [61]. Cependant, cette pratique reste à risque, en raison des taux élevés en sodium et en composés phénoliques pouvant engendrer un effet antitrypsique. De même, elles ont été fournies aux volailles à la place de Léau potable [62]. Cette expérience a montré qu'il y avait un léger abaissement du taux de mortalité de ces animaux.

L'apport des margines déshydratées a provoqué des diarrhées chez les ruminants [63, 64]. Le procédé Dalmolive décrit par [65] semble remédier au problème. Il consiste à mélanger 50 kg de margines avec 20 kg de grignons et 12,6 kg de divers résidus et sous produits agricoles pour réduire l'effet inhibiteur des composés phénoliques. Ceci produit 29 kg d'aliments en pellettes dont la composition est indiquée dans le tableau 3.

## **2 MATERIEL ET METHODE**

### **MÉTHODE ET MATÉRIEL**

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

### **ECHANTILLONNAGES**

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

#### **2.1 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.

##### **2.1.1 PH**

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

##### **2.1.2 LES COMPOSES PHÉNOLIQUES**

Ces composés contenus dans les margines sont déterminés par spectrophotométrie selon la méthode [66].

### 2.1.3 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.

### 2.1.4 LA TURBIDITÉ

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

### 2.1.5 L'INTENSITÉ DE LA COULEUR

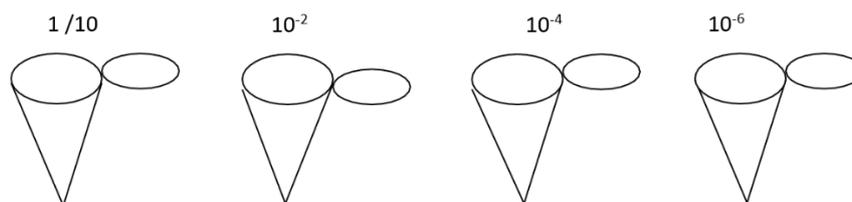
L'intensité de la couleur a été déterminée par la mesure de l'absorbance à l'intervalle [430-710nm] (spectrophotomètre visible (JENWAY modèle 6051)).

## 2.2 ETUDE MICROBIOLOGIQUE DES MARGINES

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

### 2.2.1 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.



La margine brute diluée 1/10 de la dilution $10^{-4}$ (Solution mère) + 990 $\mu$ l EDS	10 $\mu$ l de la solution mère + 990 $\mu$ l EDS	10 $\mu$ l de la dilution $10^{-2}$ + 990 $\mu$ l EDS
---	---	--

#### ✓ 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, ajouté le Kanamycine sulfate (25  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup>) Comme antibiotiques afin d'inhiber la croissance bactérienne. L'incubation est faite à 30°C pendant 48 à 72 heures.

## 2.3 L'ACTIVITÉ ANTIBACTÉRIENNE DES MARGINES

### 2.3.1 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.

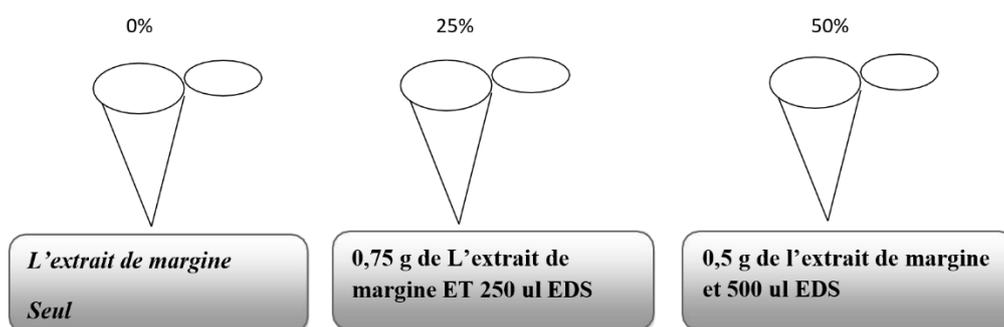
### ✓ Les souches testées

On a 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

### ✓ Les dilutions réalisées des margines visqueuses

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



### ✓ 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 (Na Cl 0,9%) de la souche à étudier, préalablement ajustée à l'aide de l'étalon 0,5 Mc Ferland à 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.

## 2.4 PRÉPARATION DES EXTRAITS PHÉNOLIQUES

### 2.4.1 MÉTHODE D'EXTRACTION DES POLY PHÉNOLS 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.

### 2.4.2 EXTRACTION DES COMPOSÉS PHÉNOLIQUES À L'ACÉTATE D'ÉTHYLE

Les composés phénoliques contenus dans les margines sont extraits selon la méthode [67]. 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 [68].

### 2.4.3 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 ppm/12min, le mélange est complètement séparé en deux phases : l'acétate d'éthyle riche en poly phénols 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 tests d'activité antibactérienne vis-à-vis des six souches choisies.

## 2.5 TRAITEMENT PHYSICO-CHIMIQUE

### 2.5.1 LA MÉTHODE COAGULATION-FLOCCULATION

#### 2.5.1.1 PRINCIPE DE LA MÉTHODE DE JAR TEST

La méthode Jar-test repose sur le phénomène de coagulation flocculation: 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 particuliers. C'est la deuxième étape de la formation des particules décan tables à partir des colloïdes déstabilisés. Ceci est du à une agitation lente, qui transforme les particules en flocons de plus grande taille pour permettre la séparation par décantation.

#### 2.5.1.2 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.

##### 2.5.1.2.1 REACTIF

- Margine.
- La solution de HCL pour baisser le pH ou la solution de Na OH (2N) pour l'augmenter.
- Sulfate d'Alumine A12 (SO4) 3.
- Chlorure ferrique FeCl3.

##### 2.5.1.2.2 APPAREILLAGE

- Jar-test.
- pH mètre.
- Conductimètre.
- Turbidimètre.
- Spectrophotomètre.

#### 2.5.1.3 TECHNIQUES EXPÉRIMENTALES

Dans une série de 4 béchers introduit 40 ml de margine brute ajustée avec 400 ml d'eau, puis le pH est ajusté selon le coagulant utilisé. En suite 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. 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. Mesurer d'une part le pH, la conductivité, les volumes des boues décantées du surnageant pour les différentes concentrations et d'une autre part on a suivi visuellement la coloration du surnageant de chaque concentration. Et enfin réalise aussi le dosage des composés phénoliques présents dans le surnageant après traitement physicochimique.

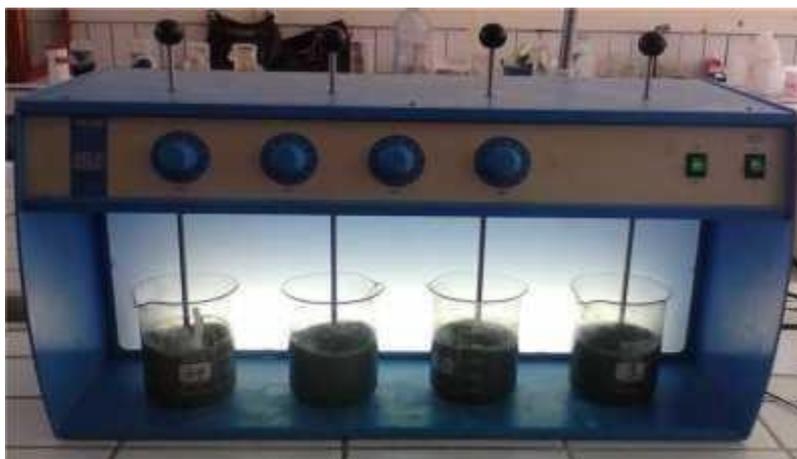


Fig. 5. Appareillage de jar-test

## 2.6 LA BIO TRAITEMENT

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

### 2.6.1 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.

### 2.6.2 DOSAGE DES COMPOSÉS PHÉNOLIQUE PAR COLORIMÉTRIE

Les composés phénoliques sont déterminés par la méthode spectrophotométrique [66]. Elle est basée sur la réduction d'un mélange d'acide phosphotungstique (Réactif de Folin-Dennis).

Les mono phénols et les poly phénols 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 gallique 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 ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 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.

## 2.7 TEST D'ACTIVITÉ ANTIBACTÉRIENNE APRÈS LE TRAITEMENT PAR COAGULATION-FLOCCULATION ET BIOLOGIQUE

### 2.7.1 TEST D'ACTIVITÉ ANTIBACTÉRIENNE APRÈS LE TRAITEMENT PAR COAGULATION- FLOCCULATION

Les margine traitées par la dose optimale de  $\text{FeCl}_3$  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.

### 2.7.2 TEST D'ACTIVITÉ ANTIBACTÉRIENNE APRÈS LE TRAITEMENT BIOLOGIQUE

Les échantillons traités par la dose optimale de  $\text{FeCl}_3$  et d' $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  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.

### 3 RESULTATS ET DISCUSSION

#### 3.1 LES CARACTERISTIQUES 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 le 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 [69]. 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, constaté qu'ils 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. Analyse est répétée deux fois.

##### 3.1.1 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.

##### 3.1.2 LA CONDUCTIVITE ÉLECTRIQUE ET LA SALINITE

Les margines étudiées ont une conductivité électrique trop élevée de l'ordre de 7 mS.cm<sup>-1</sup> 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.

##### 3.1.3 LES COMPOSES PHENOLIQUES

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.

##### 3.1.4 LA TURBIDITE

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).

##### 3.1.5 L'INTENSITE 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 6 représente la variation de l'absorbance en fonction de la longueur d'onde.

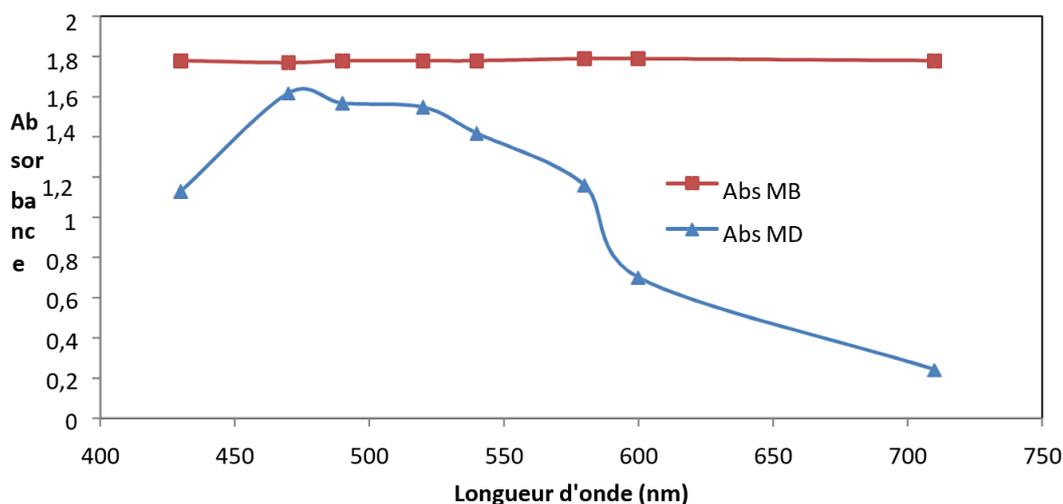


Fig. 6. Evolution de l'absorbance en fonction de la longueur d'onde

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.

### 3.2 CARACTERISATION MICROBIOLOGIQUE

Dans cette étude ce fait dénombrement des microorganismes des margines pour établir l'effet des composés phénoliques sur la biomasse microbienne de ces effluents et aussi pour une mise en évidence des microorganismes capables de survivre dans ces conditions.

#### 3.2.1 DENOMBREMENT DES MICRO-ORGANISMES

Les résultats du dénombrement des germes présentés dans le tableau 6. Ceci montrent que les levures et les champignons qui sont respectivement de l'ordre de  $4 \cdot 10^6$  UFC.ml<sup>-1</sup> et  $6 \cdot 10^6$  UFC.ml<sup>-1</sup> 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 [70]. 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 4. 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.

### 3.3 L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE DES COMPOSES PHENOLIQUES EXTRAITS DES MARGINES

#### 3.3.1 L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE

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). Constaté que cet effet antibactérien est plus important sur les bactéries gram positives (auréole de 11 à 16 mm).

Tableau 5. Diamètres des zones d'inhibitions des margines en mm

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

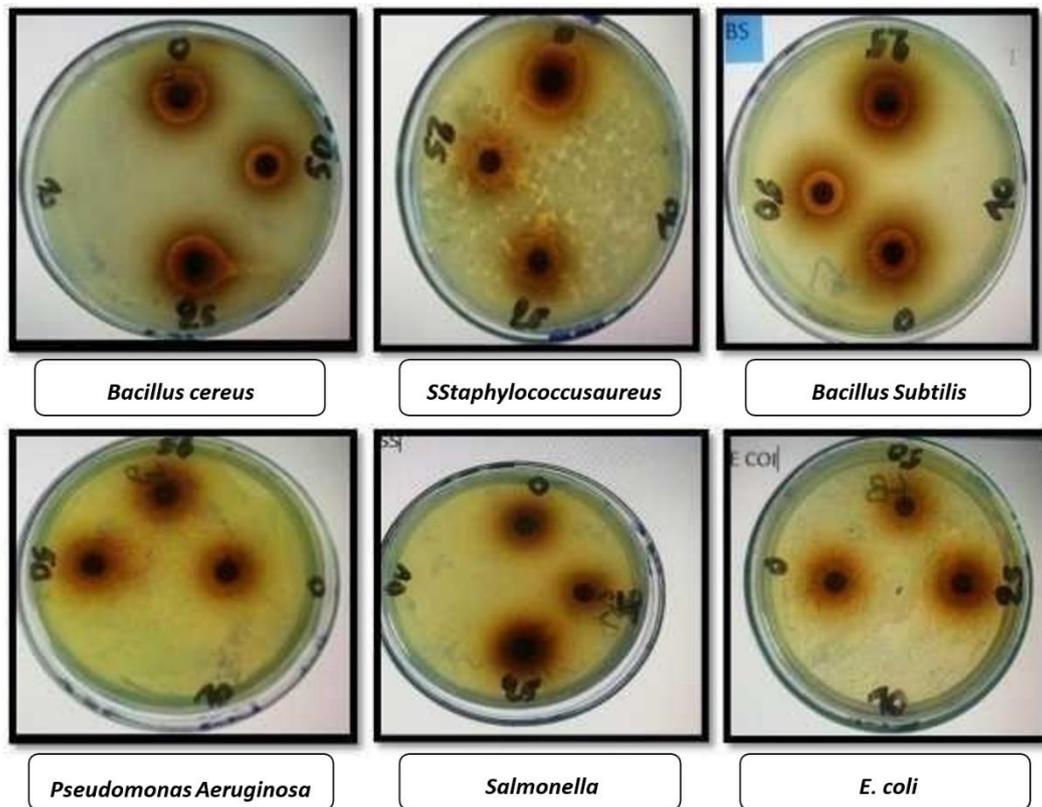


Fig. 7. Activité antibactérienne des margines vis-à-vis des bactéries testées

### 3.3.2 L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE DES COMPOSES PHENOLIQUES EXTRAITS DES MARGINES

Les composés phénoliques des margines serait le principal facteur du pouvoir antibactérien. Pour confirmer cette déduction nous avons testé l'effet des composés phénolique (extraits des margines) sur la multiplication des bactéries testées (figure7).

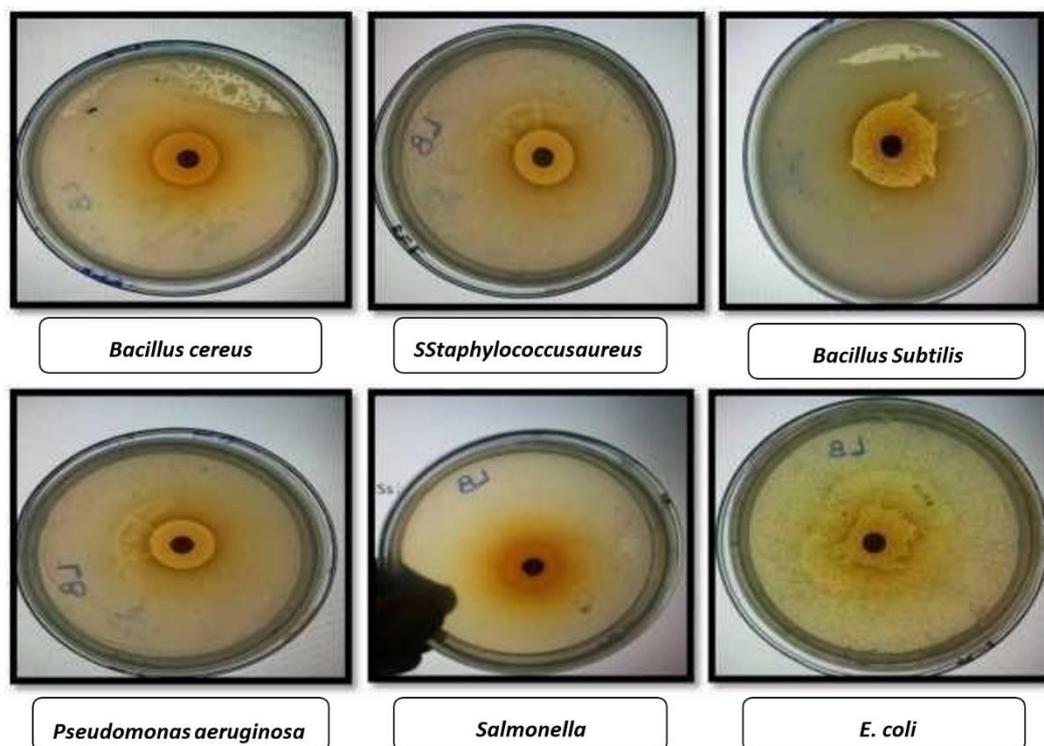


Fig. 8. *Activité antibactérienne des composés phénoliques vis-à-vis les bactéries testées*

D’après ces résultats les composés phénoliques confèrent aux margines un pouvoir antibactérien [70-71], 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 [72]. Les acides phénoliques sont beaucoup moins polaires. Cette propriété peut faciliter le transport de ces molécules à travers la membrane cellulaire. Ils sont capables se 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 [73].

### 3.4 TRAITEMENT PHYSICOCHIMIQUE DES MARGINES

Dans cette partie, 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.

#### 3.4.1 TRAITEMENT AU CHLORURE FERRIQUE

Les conditions et les résultats des essais de coagulation utilisant le chlorure ferrique comme coagulant sont illustrés sur le tableau 6. 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<sub>3</sub>.

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 permette une bonne coagulation-floculation. Concernant le volume de boue, mesuré en fonction du temps de décantation (8 heures). Les résultats sont présentés sur le tableau 6.

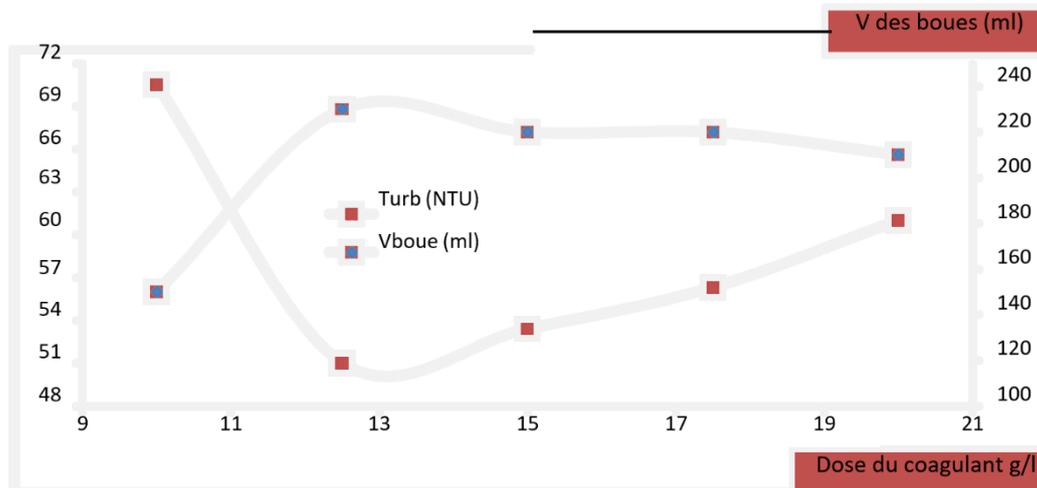
Tableau 6. *Conditions et résultats des essais au FeCl<sub>3</sub>*

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



**Fig. 9. Volume des boues décantées dans le traitement au FeCl<sub>3</sub>**

La figure 9 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<sub>3</sub>.



**Fig. 10. Variation de la turbidité et du volume des boues en fonction de la dose de FeCl<sub>3</sub>**

Constate que la turbidité est minimale pour une quantité de 12,5 g/l (FeCl<sub>3</sub>) 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<sub>3</sub>) et diminue avec l'ajout du coagulant. On obtient des décolorations pour les doses à partir de 12,5g/l (FeCl<sub>3</sub>). On peut donc conclure que la dose optimale de 12,5 g/l de FeCl<sub>3</sub> 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.

#### 3.4.2 TRAITEMENT AU SULFATE D'ALUMINIUM

Les conditions et les résultats des essais de coagulation utilisant le sulfate d'aluminium sont illustrés sur le tableau 7. Le pH est ajusté dans ce cas à une valeur de 6,50.

Le tableau 7 présente l'évolution de la turbidité et du volume des boues décantées en fonction de la dose du coagulant (sulfate d'aluminium).

Tableau 7. 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

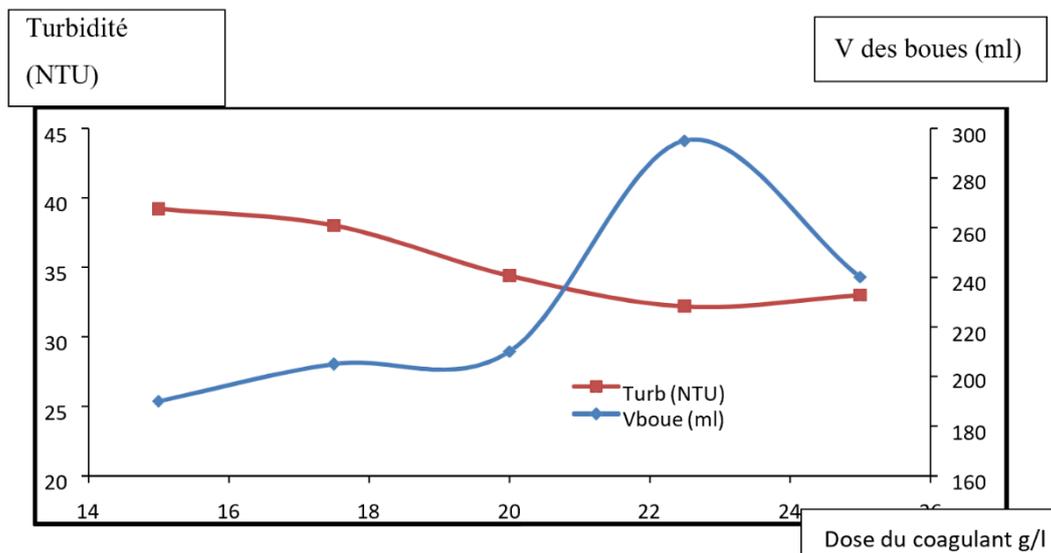


Fig. 11. Variation de la turbidité et du volume des boues avec la dose de sulfate d'aluminium

Comme dans le cas du chlorure ferrique, et après observation de l'évolution des différents paramètres, 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.

### 3.4.3 COMPARAISON DES RESULTATS DE COAGULATION OBTENUS

Le tableau 8 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 8. Turbidité et volume de boue de la margine traitée par les différents coagulants

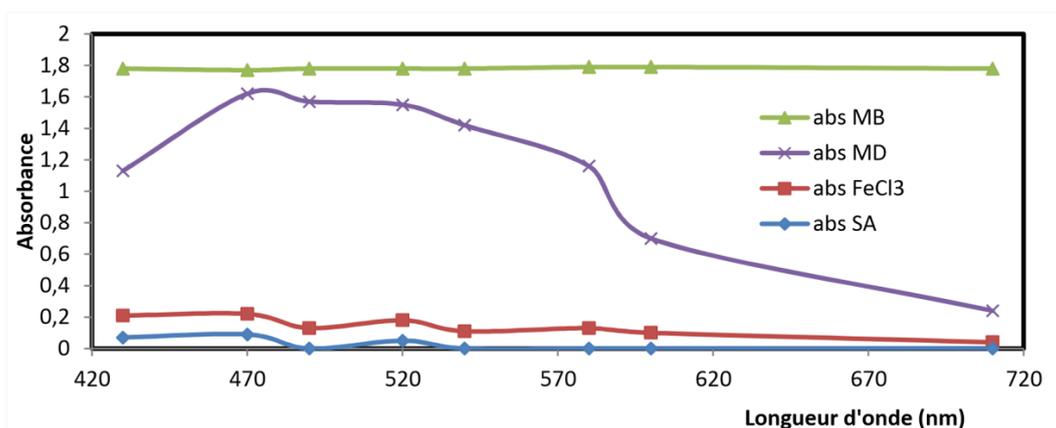
Coagulant	Quantité de coagulant (g/l)	Volume de boue (ml)	Turbidité (NTU)
Chlorure ferrique	12.5	230	51.0
Sulfate d'aluminium	22.5	295	32.2

La figure 12 représente les deux échantillons correspondant aux doses optimales des margines traitées à l'aide des deux coagulants (sulfate d'aluminium et chlorure ferrique). Une bonne décoloration dans les deux cas. Cependant la décoloration est nettement meilleure pour le traitement avec le sulfate d'aluminium.



**Fig. 12.** *Echantillons de margine traitée par le sulfate d'aluminium et le chlorure Ferrique*

La figure 13 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.



**Fig. 13.** *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.

### 3.5 TAUX D'ABATTEMENT DES COMPOSES PHENOLIQUES PAR TRAITEMENT PHYSICO- CHIMIQUE ET TRAITEMENT BIOLOGIQUE

#### 3.5.1 TAUX D'ABATTEMENT DES COMPOSES PHENOLIQUES PAR TRAITEMENT PHYSICO- CHIMIQUE

La figure 14 représente le taux d'abattement des composés phénoliques après le traitement physico-chimique.

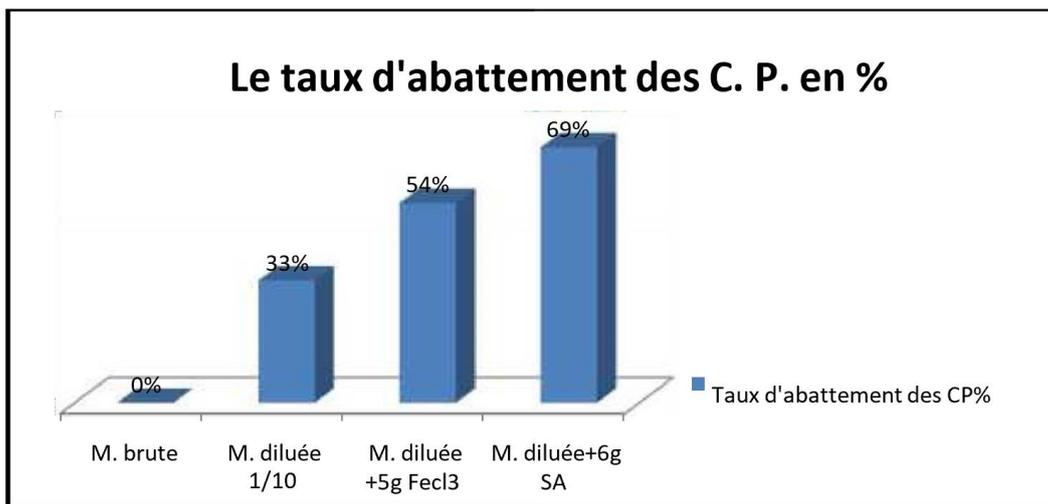


Fig. 14. Evolution des composés phénoliques dans les différents types de margines

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

### 3.5.2 LE TAUX D'ABATTEMENT DES COMPOSES PHENOLIQUES APRES LE TRAITEMENT BIOLOGIQUE

Le figure 14 indique le taux d'abattement des composés phénoliques par les souches étudiées dans les différents types de margines.

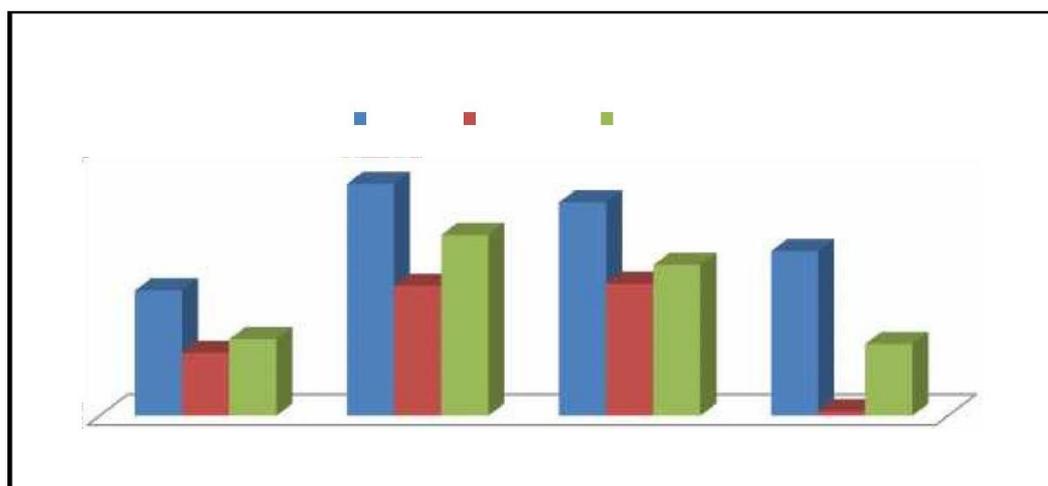


Fig. 15. Le taux d'abattement des composés phénoliques (CP) pour les 3 souches testées

D'après les résultats de la figure 15, constate que le traitement biologique pour les margines brutes montre des résultats non satisfaisant par rapport à celui des margine diluées. Dans les margines diluée 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. tropicalise. 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 [74]. 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 des 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 [75]. A Niger est capable à la fois de dégrader des

polymères aromatiques comme les tannins et les anthocyanes et des monomères aromatiques [76]. 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-di oxygénase [77].

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 A12 (SO4) 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 A12 (SO4) 3 de respectivement). Mais le traitement des margines par ces deux genre *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 les levures. 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.

### 3.6 L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE APRES LE TRAITEMENT PAR COAGULATION- FLOCCULATION ET BIOLOGIE

#### 3.6.1 L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE APRES LE TRAITEMENT PAR COAGULATION- FLOCCULATION

La mise en évidence de l'activité antibactérienne des margines après le traitement par coagulation- floculation est illustré dans la figure 15.

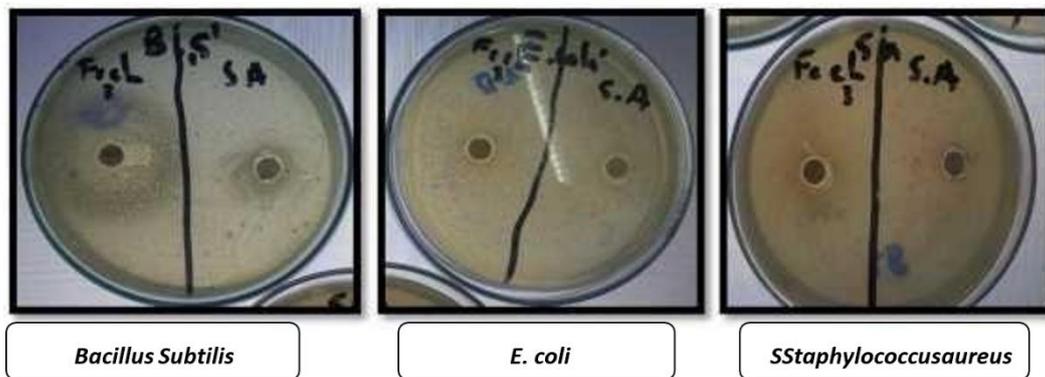


Fig. 16. L'activité antibactérienne après le traitement par coagulation- floculation

Les résultats montrent une diminution des zones d'inhibitions par rapport les margine non traitées. Ceci est dû à une diminution des composés phénolique par ce procédé physicochimique.

#### 3.6.2 L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE APRES LE TRAITEMENT BIOLOGIQUE

La mise en évidence de l'activité antibactérienne des margines après le traitement biologique est illustré dans la figure 17.

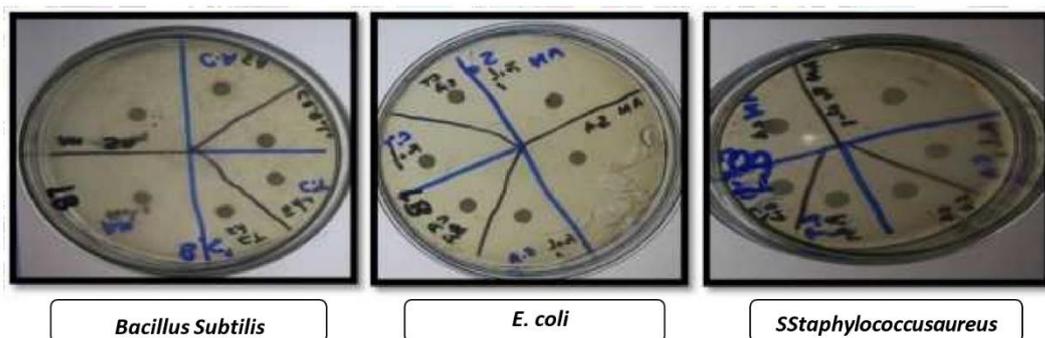


Fig. 17. L'activité antibactérienne après le traitement biologique

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.

#### **4 CONCLUSION**

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. la réalisation d'un traitement faisant appel à des Micro-algues du fait de la grande capacité épuratoire de certaine algue

#### **REFERENCES**

- [1] Bouknana D., Hammouti B., Salghi R., Jodeh S., Zarrouk A., Warad I., Aouniti A and Sbaa M., *J. Mater. Environ. Sci.* 4 (2014) 1039.
- [2] Fiestas Ros d'Ursinos J.A., Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (FAO). (1981) 93.
- [3] Ramos-Cormenzana A., FAO, Madrid. pp. (1986).
- [4] Larif M., Ouhssine M., Soulaymani A., Elmidaoui A., *RES ChemIntermed.DOI* (2013) 13-1267-0.
- [5] Pompei C., and Codovilli F., *Sci. Technol. Aliment.*, 4 (1974) 363.
- [6] Saez-Mestre E., *Contenido fenolico de1 alpechin y actividad antibacteriana*. Memoria de Licenciatura. Facultad de Farmacia, Universidad de Granada. (1989).
- [7] Yaakoubi A., Chahlaoui A., Rahmani M., Elyachioui M., Oulhote Y., (2009). Effet de l'épandage des margines sur la microflore du sol. *Agrosolutions*. 20: 1.
- [8] Fiorentino A. Gentili A. Isidori M. Monaco P. Nardelli A. Panella A. et Fabio T. (2003). Environmental effects caused by olive mill waste waters: Toxicity comparison of low- molecular-weight phenol compounds. *Journal Agricultural. Food Chemistry*, 51: 1005-1009.
- [9] Ranalli A. 1991. The effluent from olive mills: proposals for re-use and purification with reference to Italian legislation. *Oliviae* 85. p37.
- [10] Hamdi M. 1993. Valorisation et épuration des effluents des huileries d'olive, l'utilité de la microbiologie industrielle. *Olivae*. (46). p 20-24.
- [11] Ouabou E., Anouar A. et Hilali S. 2014. Traitement de la margine brute d'huile d'olive par distillation suivi de neutralisation par chaux. *Journal of Applied Biosciences* 79. Maroc 6867- 6872.
- [12] Amirante P. 1999. Traitement et utilisation des sous-produits. Séminaire international sur les innovations scientifiques et leur application en oléiculture et oléotechnie. Florence. Italie. Eds COI 1999. 44 p.
- [13] Ranalli A. (1991). The effluent from olive mills: Proposals for re-use and purification with reference to Italian legislation, *Olivae*, 37, 30-39.
- [14] 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.
- [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] 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.
- [17] Hamdi M, (1993). Future prospects and constraints of olive mill waste waters and treatment: A. Review, *Bioprocess Engineering*, 8, 209-214.
- [18] Fernandez Diaz M J, 1983. Olives, In Rehm HJ, Reed G (Eds° *Biotechnology?* Verlag chemie, Weinheim, 5, 379-397.
- [19] Vasquez R.A., Maestro D.R., Graciani C.E. (1974). Compentes fenolicos de l'aceintuna. II. Polyphenols Del alpechin. *Grasas y Aceites*, 25, 341-345.
- [20] 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.

- [21] Martinez N.L., Ramos-Cormenzana A., Garcia Pareja M.P., Garrido Hoyos S.E. (1992); Biodégradation de composés phénoliques de Del alpechin con *Aspergillus terreus*, *Grasas y Aceites*, 43 (2), 75-81;
- [22] 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.
- [23] Tanchev S, Joncheva N, Genov N, Codounis M, (1980). Identification of anthocyanins contained in olives, *Georgike ereuna*, 4, 5-73.
- [24] Monties B, (1980). Les polymères végétaux, Gautier-villars (eds).
- [25] Capasso R. (1997). The chemistry, biotechnology and ecotoxicology of the polyphenols naturally occurring in vegetable wastes. *Curr. Top. Phytochem., Res. Trends*, 1, 145-156.
- [26] Benyahia N. et Zein K. 2003. Analyse des problèmes de l'industrie de l'huile d'olive et solutions récemment développées. 2<sup>ème</sup> conférence Internationale Swiss Environmental Solutions for Emerging Countries (SESEC II). Lausanne. Suisse. pp1-7.
- [27] Yahyaoui N., 2012. Etude de l'adsorption des composés phénoliques des margines d'olive sur carbonate de calcium, hydroxapatite et charbon actif.
- [28] Mebirouk M. 2002. Rejet des huileries. Développement d'un procédé intégré pour la biodégradation des polyphénols dans la margine. *CMPP News*. N°11.
- [29] Yahyaoui N., 2012. Etude de l'adsorption des composés phénoliques des margines d'olive sur carbonate de calcium, hydroxapatite et charbon actif. Mémoire de magister. Université de Mouloud Mammeri. Tiziouzeu. p129.
- [30] Ghattas D. 2004. Valorisation des margines par digestion anaérobie. Mémoire de diplôme d'études approfondies (DEA). Contrôle et gestion de qualité. «Application à l'agroalimentaire». Institut de recherches agronomiques Libanais. P39.
- [31] Benyahia N. et Zein K. 2003. Analyse des problèmes de l'industrie de l'huile d'olive et solutions récemment développées. 2<sup>ème</sup> conférence Internationale Swiss Environmental Solutions for Emerging Countries (SESEC II). Lausanne. Suisse. pp1-7.
- [32] Ranalli A. (1991a). The effluent from olive mills: Proposals for re-use and purification with reference to Italian legislation. *Olivae*, 37, 30-39.
- [33] 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.
- [34] 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.
- [35] 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.
- [36] 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.
- [37] Hamdi M., Bouhamed H., Ellouz R. (1991b). Optimisation of *Aspergillus niger* growth on olive mill wastewaters, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36, 285-288. Dédicaces.
- [38] Kissi M., Mountadar M., Assobhei O., Gargiulo E., Palmieri G., Giardina P., Sanna 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.
- [39] 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.
- [40] Ranalli A. (1991a). The effluent from olive mills: Proposals for re-use and purification with reference to Italian legislation. *Olivae*, 37, 30-39.
- [41] 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.
- [42] 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.
- [43] Papadimitriou E.K., Chatjipa I., Balis C. (1997). Application of composting to olive mill wastewater treatment. *Environnemental technologie*. 18: 101-107.
- [44] Fiestas Ros d'Ursenos J.A. (1981). Différentes utilisations des margines: Actes séminaire international sur la valorisation des sous-produits de l'olivier. FAO-UNDP. Tunisie, pp 93-110.
- [45] Fiestas Ros de Ursinos, J.A., Borja R. (1992) Use and treatment of olive mill wastewater: Current situation and prospects in Spain. *Grasas y Aceites*. 2: 101-106.
- [46] Tomati U., Galli E. (1992). In *Humus, its structure and role in agriculture and environment*, Kubat J. Ed. Elsevier, London. 117-126.
- [47] El Alami B. (2000). Contribution à l'étude de l'activité anti-oxydante de la fraction phénolique des margines. Mémoire de 3<sup>ème</sup> cycle, Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Rabat, Maroc. 93 p.
- [48] 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.
- [49] Petruccioli M., Servili M., Montedero G.F., Federici F. (1988). Development of a recycle procedure for the utilization of vegetation waters in the olive oil extraction process. *Biotechnology Letters*. 1: 55-60.
- [50] Morisot A. (1979). Utilisation des margines par épandage. *Olivae*. 19: 8-13.

- [51] Ranalli A. (1991) the effluent from olive mills: Proposals for re-use and purification with reference to Italian legislation. *Olivae*. 37: 30-39.
- [52] IOM. (2004). Industrie oléicole au Maroc ET son impact sur l'environnement: Propositions d'actions de lutte contre la pollution générée par les huileries d'olives, CAS de la province de Taounate. 14 p.
- [53] Tomati U., Galli E. (1992). In *Humus, its structure and role in agriculture and environment*, Kubat J. Ed. Elsevier, London. 117-126.
- [54] Fonty G., Jouany J.P., Forano E. et Gouet Ph. (1986). Interaction entre espèces microbiennes dans le rumen. *Reprod. Nutr. Dev.* 26: 147-159.
- [55] Fiestas Ros d'Ursinos J.A. (1977). Problèmes del aprovechamiento y depuración de las aguas residuales de las almazaras. XIII. Reunion plenaria asamblea miembros del instituto de la Grasa y Sus Derivados.
- [56] Sierra J., Martí E., Montserrat G., Crau anas R., Grau M.A. (2001). Characterisation and evolution of a soil affected by olive oil mill wastewater disposal. *The Science of the total environment*. 279: 207-214.
- [57] Zenjari B., Nejmeddine A. (2001). Impact of spreading olive mill wastewater on soil characteristics: laboratory experiments. *Agronomie*. 21: 749-755.
- [58] Buldini P.L., Mevoli A., Quirini A. (2000). On-line micro dialysis-ion chromatographic determination of inorganic anions in olive-oil mill wastewater. *J Chromatogr A*. 882 (1-2), 321-8.
- [59] Montedero G., Anichini F., Fantazzo P. (1980). Composés phénoliques de L'huile d'olive, leur influence sur la technologie d'extraction, sur la résistance à l'oxydation et sur les caractéristiques organoleptiques de l'huile. *Bulletin liaison Groupe Polyphénols*. 9: 39- 55.
- [60] Knupp G., Rücker G., Ramos-Cormenzana A., Garrido Hoyos S., Neugebauer M., Ossenkop T. (1996). Problems of identifying phenolic compounds during the microbial degradation of olive mill waste water. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 38: 277-282.
- [61] Ercoli E., Ertola R. (1983). SCP production from olive black water. *Biotechnol. Lett.* 7: 457-462.
- [62] Fedeli E. (1977). Lipids of olives. *Pros. Chem. Fats other lipids*. 15, 57-74.
- [63] Salvimini V., Cera O. (1984). Acidic phenolic fraction of the juice of olives determined by gas chromatographic method. *Grassas y Aceites*. 25: 178-180.
- [64] Salvemini F. (1985). Composizione chimica e valutazione biologica di un mangime ottenuto essicando tercemente le acque di vegetazione delle olive. *Riv. Delle Sostanze Grasse*. 112: 559-564.
- [65] Martilotti F. (1993). Use of olive by-products in animal feeding in Italy. *Division de la production et de la santé animale*. FAO. Rome. 56-62.
- [66] 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.
- [67] 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.
- [68] 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.
- [69] De Felice, B., Pontecorvo, G., Carfagna, M., (1997). *Acta Biotechnol* 17-231.
- [70] Singleton V.L., Rosi J.A., *Am. J.* (1965) *Oenol. Vitic.* 16 -144.
- [71] Ranalli A., (1991). *Olivae*, 37- 30.
- [72] Esmail A., Abed H., Firdaus M., Chahboun N., Mennane Z., Berny E., et Ouhssine M., J (2014). *Mater. Environ. Sci.* 5- 121.
- [73] Firas A., Hassan F., J. (2008). *Zhejiang Univ. Sci.* 9 (2), 154.
- [74] Capasso R. (1997) the chemistry, biotechnology and ecotoxicology of the polyphénols naturally occurring in vegetable wastes. *Curr. Top. Phytochem., Res. Trends*, 1, 145-156.
- [75] Seng J.M. (1988) Chitine, chitosane et dérivés: De nouvelles perspectives pour l'industrie. *Biofutur*, 71, 40-44.
- [76] Kieslich K. (1976) *Microbial transformations of non-steroid cyclic compounds*. John Wiley and Sons Georg Thieme publishers, 1262 pp.
- [77] Ninnekar h.Z., Vaidyanathan C.S. (1981) Catéchol 1, 2-dioxygenase from *Aspergillus Niger*: purification and properties. *J. Indian Inst. Sci.*, 63, 131-136. Office National de l'Eau Potable (1989) *Pollution de l'oued*.