

FACULTE DES SCIENCES DHAR EL MEHRAZ FES

Thèse

Présentée pour l'obtention du diplôme de

Doctorat National

UFR : Biologie cellulaire et moléculaire appliquée à
l'environnement et à la santé

Spécialité : Microbiologie de L'Environnement

Soutenue le 20 / 06 / 2003

Par

M^{elle} Halah AISSAM

**Etude de la biodégradation des effluents des
huileries (margines) et leur valorisation par
production de l'enzyme tannase**

Devant le jury composé de :

M. BENLEMLIH	Professeur à la Faculté des Sciences de Fès	Président
M. CHAOUCH	Professeur à la Faculté des Sciences de Fès	Rapporteur
M. EL HASSOUNI	Professeur à la Faculté des Sciences de Fès.	Rapporteur
M. PENNINCKX	Professeur-Chef de Service à l'Institut Pasteur de Bruxelles	Rapporteur
M. MERZOUKI	Professeur à la Faculté des Sciences de Fès.	Examineur
A. ZAID	Professeur à la Faculté des Sciences de Meknès	Examineur

DEDICACES

A mes très chers parents

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

Ce travail représente le fruit de votre soutien, vos sacrifices, et vos encouragements. Jamais il n'aurait vu le jour sans les conseils que vous avez consentis pour mon éducation. Que Dieu vous protège et vous accorde une longue vie pleine de santé et de bonheur !

A mes très chères sœurs : Fadoua, Khaoula, Rouae et Manal.

A tous ceux qui me sont chers.

REMERCIEMENTS

A Monsieur **Mohamed BENLEMLIH**, Professeur à la Faculté des Sciences de Fès et Directeur de Laboratoire de Microbiologie de l'Environnement, je vous dois le meilleur accueil que vous m'avez réservé dans votre laboratoire, et la mise à ma disposition tous les moyens pour me permettre de réaliser mes recherches dans les meilleures conditions. Vous m'avez tant aidé et supporté au moment où j'en avais le plus besoin.

Aucun mot ne pourrait exprimer mes remerciements et ma vive gratitude, et que le présent travail soit un faible témoignage de ma très haute reconnaissance et mon profond respect. Merci pour tout.

J'adresse ma profonde reconnaissance à Monsieur **Mohamed MERZOUKI**, Professeur à la Faculté des Sciences de Fès, qu'il trouve ici l'expression de ma gratitude et mes sincères remerciements pour l'aide qu'il m'a apportée dans les corrections du manuscrit et les discussions enrichissantes.

Je ne saurais remercier suffisamment Monsieur **Mohammed EL HASSOUNI**, Professeur à la Faculté des Sciences de Fès, de m'avoir permis de mener à bien la partie moléculaire de ce mémoire et de l'intérêt qu'il n'a cessé de m'accorder tout au long de ce travail avec patience et maîtrise.

Je tiens à remercier également Monsieur **Abdelhamid ZAID**, Professeur à la Faculté des Sciences de Meknès qui a accepté d'examiner ce travail, c'est un honneur pour moi de le voir siéger parmi les membres de jury de ce mémoire.

A Monsieur **Mehdi CHAOUCH**, Professeur à la Faculté des Sciences de Fès, qu'il trouve ici le témoignage de mes vifs remerciements pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant d'apporter son jugement sur ce travail.

A Monsieur **Michel PENNINCKX**, Professeur-Chef de Service à l'Institut Pasteur de Bruxelles, tous mes remerciements pour le temps qu'il a consacré à la lecture de ce travail et surtout pour la peine qu'il s'est donnée pour son déplacement.

Un remerciement spécial et sincère à Monsieur **Faouzi ERRACHIDI** qui, sans sa collaboration et son aide, je n'aurais pu surmonter bon nombre de difficultés dans mon travail,

il a su me prodiguer à tout instant, conseil et encouragement tant au niveau scientifique qu'amical.

Mes vifs remerciements s'adresse aussi à Madame **Ilham ATIKI**, pour l'aide et l'amitié qu'elle m'a apportée.

Un grand merci à Monsieur **Noureddine EL OUTASSI** pour sa sympathie inépuisable et son sens de collaboration.

Mes remerciements les plus sincères à tout le personnel de la Faculté des Sciences de Fès et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

RESUME

La caractérisation physico-chimique des margines de la station d'évaporation naturelle de la ville de Fès, a montré que cet effluent est trop chargé en matières organiques évaluées en terme de DCO (154 g d'O₂.l⁻¹). Il est caractérisé aussi par un taux élevé en composés phénoliques (9,7 g/l). L'étude microbiologique de ces margines a révélé que ce rejet renferme une charge microbienne assez faible (FMAT : $8,4 \cdot 10^3$ UFC.ml⁻¹, levures : $7,6 \cdot 10^3$ UFC.ml⁻¹, champignons : $4 \cdot 10^2$ UFC.ml⁻¹).

L'étude microbiologique de ces margines a permis d'isoler une seule souche bactérienne appartenant au genre *Pseudomonas*, deux types de champignons (*Penicillium sp.* et *Aspergillus niger*), et 8 espèces de levures (*Candida boidinii*, *Candida diddensiae*, *Candida wickerhamii*, *Pichia kluyveri*, *Pichia membranaefaciens*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Geotrichum terrestre* et *Zygosaccharomyces fermentati*).

La croissance de ces souches sur différentes sources de carbone a révélé que les levures : *Candida boidinii* et *Geotrichum terrestre*, ainsi que les champignons : *Penicillium sp.* et *Aspergillus niger* sont les souches les plus performantes dans l'assimilation des composés phénoliques et lipidiques.

L'adaptation de ces quatre souches indigènes à croître sur les margines à différentes concentrations croissantes (25%, 50%, 75% et 100%) permet d'augmenter la résistance des micro-organismes à la toxicité des composés phénoliques des margines brutes. Ainsi, les souches *A. niger*, *Penicillium sp.*, *G. terrestre* et *C. boidinii* ont réduit la DCO à des taux de 78,3% ; 63,1% ; 48,4% et 40,3% respectivement après un mois de traitement des margines brutes. Cette étude a montré également l'intérêt de la souche *A. niger* dans l'élimination de la DCO (78,3%) et des composés phénoliques (63,1%).

L'étude préliminaire de la production de l'enzyme tannase par *Aspergillus niger* HA37 sur différentes concentrations d'acide tannique telles que 0,2% ; 0,5% et 1% a montré que l'activité enzymatique maximale est respectivement de l'ordre de 0,6 ; 0,9 et 1,5 UE.ml⁻¹.

L'étude de la production de l'enzyme tannase par *Aspergillus niger* HA37 en utilisant les margines à 25% comme milieu de culture a donné des résultats encourageants. La production de cette enzyme reste plus ou moins stable pendant plus que 30 heures, elle varie entre 0,37 et 0,64 UE.ml⁻¹. Cette production de l'enzyme tannase est accompagnée par des taux d'abattement des composés phénoliques et de la DCO de l'ordre de 71,1% et 66% respectivement.

Mots clés

Marges, étude physico-chimique et microbiologique, traitement biologique, tannase.

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE.....	1
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	
I. Situation oléicole mondiale.....	5
II. Secteur oléicole au Maroc.....	6
III. Synoptique de fabrication d'huile d'olives.....	8
III. 1. Opérations préliminaires.....	8
III. 2. Broyage.....	8
III. 3. Malaxage.....	9
III. 4. Séparation des phases.....	9
IV. Procédés d'extraction d'huiles d'olives.....	9
IV. 1. Procédé en discontinu ou système à presse.....	9
IV. 2. Procédé en continu ou système à centrifugation.....	11
IV. 3. Comparaison entre les procédés en continu et en discontinu.....	12
V. Problématique environnementale générée par les margines.....	13
V. 1. Origine des margines.....	13
V. 2. Estimation du débit des margines.....	14
V. 3. Pollution par les margines.....	14
VI. Caractérisation physico-chimique des margines.....	14
VI. 1 Fraction minérale.....	16
VI. 2. Fraction organique.....	18
VI. 2. 1. Sucres.....	18
VI. 2. 2. Composés azotés.....	18
VI. 2. 3. Vitamines.....	19
VI. 2. 4. Acides organiques.....	19
VI. 2. 5. Huiles.....	19
VI. 2. 6. Composés phénoliques.....	20
VI. 2. 6. 1. Les monomères phénoliques.....	20
VI. 2. 6. 2. Les polymères phénoliques.....	23
VI. 2. 6. 3. Métabolisme des composés phénoliques.....	24
VI. 2. 6. 3. 1. Dégradation aérobie des monomères aromatiques.....	24
VI. 2. 6. 3. 2. Induction et répression.....	31
VI. 2. 6. 3. 3. Dégradation des lignines.....	31
VI. 2. 6. 3. 4. Distribution et rôle physiologique des Oxygénases.....	31
VII. Origine de la coloration.....	32
VIII. Toxicité des margines.....	34
IX. Caractérisation microbiologique des margines.....	34

X. Impact sur le milieu naturel.....	35
XI. Traitement des margines.....	36
XI. 1. Procédés physiques.....	36
XI. 1. 1. Processus thermiques.....	36
XI. 1. 1. 1. Distillation.....	36
XI. 1. 1. 2. Evaporation.....	37
XI. 1. 1. 3. Séchage.....	38
XI. 1. 1. 4. Incinération.....	39
XI. 1. 2. Techniques membranaires.....	39
XI. 1. 2. 1. Ultrafiltration.....	39
XI. 1. 2. 2. Osmose inverse.....	39
XI. 1. 2. 3. Electrodialyse.....	40
XI. 2. Procédés chimiques.....	41
XI. 2. 1. Coagulation-floculation.....	41
XI. 2. 2. Adsorption.....	41
XI. 3. Procédé biologique.....	42
XI. 3. 1. Traitement anaérobie des margines.....	42
XI. 3. 1. 1. Les digesteurs contact.....	43
XI. 3. 1. 2. lits de boues à flux ascendant (UASB).....	43
XI. 3. 1. 3. Lit de boues à filtre anaérobie.....	44
XI. 3. 2. Traitement aérobie des margines.....	44
XI. 4. Procédés combinés.....	46
XI. 4. 1. Procédé physique en série.....	47
XI. 4. 2. Procédé physique et biologique.....	47
XI. 4. 3. Procédé biologique et physico-chimique.....	48
XI. 4. 4. Procédé physico-chimique.....	48
XII. Valorisation des margines.....	49
XII. 1. Production de biogaz.....	49
XII. 2. Compostage des margines.....	50
XII. 3. Production des protéines d'organismes unicellulaires (POU).....	51
XII. 4. Production d'enzymes.....	52
XII. 5. Epandage (Fertilisation des terres agricoles).....	53
XII. 6. Utilisation en alimentation animale.....	54

-CHAPITRE I -

Caractérisation physico-chimique et microbiologique des margines

I. INTRODUCTION.....	56
II. MATERIEL ET METHODES.....	56
II. 1. Echantillonnage.....	56

II. 2. Etude physico-chimique des margines.....	56
II. 2. 1. Détermination des paramètres organiques.....	57
II. 2. 1. 1. Acidité (pH).....	57
II. 2. 1. 2. Matières en suspension (MES).....	57
II. 2. 1. 3. Matière sèche (MS) et matière volatile (MV).....	57
II. 2. 1. 4. Demande chimique en oxygène (DCO).....	57
II. 2. 1. 5. Composés phénoliques.....	58
II. 2. 1. 6. Sucres totaux.....	58
II. 2. 1. 7. Matière grasse.....	58
II. 2. 2. Détermination des paramètres minéraux.....	59
II. 2. 2. 1. Conductivité électrique.....	59
II. 2. 2. 2. Orthophosphates.....	59
II. 2. 2. 3. Azote total.....	59
II. 2. 2. 4. Ions ammoniums.....	59
II. 2. 2. 5. Calcium et magnésium.....	60
II. 2. 2. 6. Sodium et potassium.....	60
II. 2. 2. 7. Chlorures.....	60
II. 2. 3. Détermination des paramètres métalliques.....	61
II. 2. 3. 1. Minéralisation des métaux lourds.....	61
II. 2. 3. 2. Dosage des métaux lourds.....	61
II. 3. Etude microbiologique des margines.....	61
II. 3. 1. Dénombrement.....	61
II. 3. 2. Purification.....	62
II. 3. 3. Identification.....	63
III. RESULTATS ET DISCUSSION.....	64
III. 1. Caractérisation physico-chimique.....	64
III. 1. 1. Caractérisation organique.....	64
III. 1. 1. 1. Acidité.....	64
III. 1. 1. 2. Matières en suspension (MES).....	64
III. 1. 1. 3. Matière sèche (MS) et matière volatile (MV).....	65
III. 1. 1. 4. Demande chimique en oxygène (DCO).....	65
III. 1. 1. 5. Composés phénoliques.....	65
III. 1. 1. 6. Sucres totaux.....	65
III. 1. 1. 7. Matière grasse.....	66
III. 1. 2. Caractérisation minéralogique.....	66
III. 1. 2. 1. Conductivité.....	67
III. 1. 2. 2. Calcium, magnésium, potassium et sodium.....	67
III. 1. 2. 3. Chlorures.....	67

III. 1. 2. 4. Orthophosphates et azote total.....	68
III. 1. 2. 5. Ions ammoniums.....	68
III. 1. 3. Caractérisation métallique.....	68
III. 2. Caractérisation microbiologique.....	69
III. 2. 1. Dénombrement des micro-organismes.....	69
III. 2. 2. Identification des micro-organismes.....	70
III. 2. 2. 1. Bactéries.....	70
III. 2. 2. 2. Champignons.....	71
III. 2. 2. 3. Levures.....	72
IV. CONCLUSION.....	74

-CHAPITRE II- Identification et caractérisation des souches de levures

I. INTRODUCTION.....	76
II. MATERIEL ET METHODES.....	77
II. 1. Identification classique des souches de levures.....	77
II. 1. 1. Etude des caractères morphologiques.....	77
II. 1. 1. 1. Etude du mode de reproduction végétative.....	77
II. 1. 1. 2. Etude du mycélium.....	77
II. 1. 1. 3. Etude de la sporulation.....	77
II. 1. 2. Etude des caractères physiologiques.....	78
II. 1. 2. 1. Fermentation des sucres.....	78
II. 1. 2. 2. Assimilation des sources de carbone.....	78
II. 1. 2. 3. Assimilation des nitrates.....	79
II. 1. 2. 4. Croissance sur milieu sans vitamine.....	79
II. 1. 2. 5. Croissance à 37°C.....	79
II. 1. 2. 6. Test de l'urease.....	79
II. 1. 2. 7. Résistance au cycloheximide.....	79
II. 2. Identification moléculaire des souches de levures.....	80
II. 2. 1. PCR.....	80
II. 2. 2. Conditions de la PCR.....	80
II. 2. 3. Visualisation des produits de PCR par électrophorèse.....	81
II. 2. 4. Séquençage des ADN amplifiés.....	81
III. RESULTATS ET DISCUSSION.....	81
III. 1. Identification classique.....	81
III. 1. 1. Identification du genre.....	81
III. 1. 2. Description de l'espèce.....	84

III. 2. Identification moléculaire.....	88
IV. CONCLUSION.....	91

-CHAPITRE III-

Sélection des souches de levures et de champignons performantes dans le traitement des margines

I. INTRODUCTION.....	93
II. MATERIEL ET METHODES.....	93
II. 1. Echantillonnage.....	93
II. 2. Choix des souches pour cette étude.....	94
II. 3. Sélection des souches choisies.....	94
II. 4. Bio-traitement.....	94
II. 4. 1. Préparation de la préculture.....	95
II. 4. 2. Mise en culture.....	96
II. 5. Analyses physico-chimiques.....	97
III. RESULTATS ET DISCUSSION.....	97
III. 1. Caractérisation des souches de levures et des champignons.....	97
III. 2. Traitement des margines en cascade à différentes concentrations par les quatre souches sélectionnées.....	99
III. 2. 1. Dégradation des composés phénoliques.....	99
III. 2. 2. Dégradation de la matière organique.....	100
III. 2. 3. Dosage de la biomasse produite.....	101
III. 2. 4. Discussion.....	102
III. 3. Suivi du traitement des margines brutes durant un mois.....	105
III. 3. 1. Evolution des composés phénoliques.....	105
III. 3. 2. Evolution de la DCO.....	106
III. 3. 3. Evolution de la biomasse produite.....	107
III. 3. 4. Interprétation des résultats de l'évolution des composés phénoliques, de la DCO et de la biomasse produite.....	107
III. 3. 5. Evolution du pH.....	109
III. 4. Discussion.....	111
IV. CONCLUSION.....	114

-CHAPITRE IV-

Etude cinétique de la production de l'enzyme tannase par *Aspergillus niger* HA37 sur l'acide tannique

I. INTRODUCTION.....	115
II. MATERIEL ET METHODES.....	117
II. 1. Milieu de culture.....	117
II. 2. Matériel biologique.....	117
II. 3. Inoculation du milieu de culture.....	118
II. 4. Techniques du dosage.....	118
II. 4. 1. Dosage du CO ₂	118
II. 4. 2. Dosage de l'acide tannique et des composés phénoliques.....	118
II. 4. 3. Détermination de la biomasse sèche.....	119
II. 4. 4. Dosage des protéines contenues dans la biomasse produite.....	119
II. 4. 5. Dosage de l'enzyme tannase.....	119
II. 4. 6. Chromatographie des composés phénoliques sur colonne de Séphadex G-50.	119
III. RESULTATS ET DISCUSSION.....	120
III. 1. Production de l'enzyme tannase par <i>A. niger</i> HA37 sur l'acide tannique.....	120
III. 1. 1. Croissance d' <i>A. niger</i> HA37 sur milieu solide (ATA) contenant l'acide tannique à 1%	121
III. 1. 2. Effet de la concentration initiale d'acide tannique sur la croissance d' <i>A. niger</i> HA37.....	122
III. 1. 3. Effet de la concentration initiale d'acide tannique sur la production de l'enzyme tannase <i>A. niger</i> HA37.....	124
III. 1. 4. Production de la biomasse d' <i>A. niger</i> HA37 après 48 heures d'incubation.....	125
III. 1. 5. Effet de la concentration d'acide tannique sur les paramètres de la croissance de la production de l'enzyme tannase.....	126
III. 2. Production de l'enzyme tannase par <i>A. niger</i> HA37 sur les margines.....	127
III. 2. 1. Evolution de la teneur des composés phénoliques et de l'enzyme tannase produite durant le traitement des margines par <i>A. niger</i> HA37.....	127
III. 2. 2. DCO finale et biomasse produite par <i>A. niger</i> HA37.....	129
III. 2. 3. Evaluation par chromatographie de l'efficacité du traitement des margines par <i>A. niger</i> HA37.....	129
IV. CONCLUSION.....	131
CONCLUSION GENERALE.....	132
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	137
ANNEXES.....	156

PROBLEMATIQUE

Au cours des dernières décennies, en raison de l'accroissement démographique, de l'expansion industrielle et du développement de l'agriculture, les cours d'eau ont subi une très forte dégradation due essentiellement aux rejets domestiques et industriels, à l'utilisation des engrais et des pesticides et aux produits chimiques qui y sont déversés.

Le cas de l'Oued Sebou, en aval de la ville de Fès, reste un exemple frappant et inquiétant, car son état de pollution a atteint un niveau nécessitant des actions concrètes immédiates.

Plusieurs études et campagnes d'analyse ont été réalisées par l'Office National de l'Eau Potable (O.N.E.P) et le Laboratoire National de l'Environnement. Ces investigations ont prouvé que la période située entre la mi-octobre et la mi-mars se caractérise par une intensification de la pollution des eaux de l'Oued Sebou. Cette période correspond à la saison de la production de l'huile d'olive par les industries oléicoles. La très forte charge organique rejetée durant cette période est estimée au taux de la pollution engendrée par des centaines de milliers d'habitants. Cette pollution de l'Oued Sebou constitue un phénomène particulièrement critique au Maroc puisqu'il représente une ressource importante en eau potable pour les villages aux alentours de l'Oued jusqu'à kénitra.

La province de Fès constitue le premier pôle de concentration des unités industrielles (42% des huileries marocaines) (Achkari-Begdouri, 1994). On estime que pendant la période oléicole, les margines pourraient représenter les 2/3 de la pollution biodégradable industrielle de la ville et environ la moitié de la pollution totale de l'agglomération de Fès. De ce fait, durant cette période, l'Oued Sebou peut être exempt d'oxygène sur plusieurs dizaines de kilomètres et par conséquent, toute forme de vie aquatique disparaît (ONEP, 1989). Le suivi de la qualité des eaux de Sebou mené par l'ONEP a montré que l'impact des rejets des huileries de la ville de Fès et de sa région est fortement ressenti au niveau des installations de potabilisation.

L'industrie oléicole qui produit principalement l'huile d'olive, engendre deux résidus : l'un solide (les grignons) et l'autre liquide (les margines). Les grignons sont réutilisés en agriculture et en industries, alors que les margines sont rejetées directement dans les égouts. Les critères de la pollution des margines se limitent à trois facteurs principaux :

- L'acidité,

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

De ce fait, le rejet de ces effluents dans les rivières et les égouts sans aucun traitement préalable pose de sérieux problèmes pour le système aquatique (Levis-Menzi *et al.*, 1992 ; Francesco, 1993 ; Bouranis *et al.*, 1995 ; Cabrera *et al.*, 1996 ; Sayadi *et al.*, 2000). Leur effet nocif dérive en grande partie de leur contenu en composés phénoliques qui peuvent inhiber la croissance des micro-organismes, spécialement les bactéries (Capasso *et al.*, 1995 ; Capasso, 1997). Ce qui diminue la décomposition biologique naturelle.

Ces considérations ont conduit plusieurs chercheurs à l'échelle nationale et internationale à choisir la voie du traitement et de la valorisation des margines pour limiter leur pollution (Gharsallah *et al.*, 1999 ; Garcia Garcia *et al.*, 2000 ; Leger *et al.*, 2000 ; Kissi *et al.*, 2001 ; Garrido Hoyos *et al.*, 2002 ; Pozo *et al.*, 2002 ; Fenice *et al.*, 2003). Cependant, les procédés développés jusqu'à présent restent très limités et leur coût très élevé (Hamdi, 1993a ; Hamdi, 1993c). Par conséquent le traitement par des bassins d'évaporation naturelle reste actuellement, la technique la plus usitée en raison de sa simplicité. Néanmoins, elle provoque des effets néfastes sur l'environnement (Hamdi, 1993a).

Les margines déversées dans le bassin versant de l'Oued de Sebou représentent 40% de celles produites au Maroc (Scandiaconsult, 1992). Vu l'importance de cette rivière, il s'est avéré nécessaire de trouver une solution immédiate à cet aléa. Plusieurs études ont été réalisées et différentes solutions ont été proposées par la wilaya de Fès, par l'ONEP et par la firme SWEEP-Scandiaconsult. Cependant, la plupart de ces procédés souffrent de contraintes technico-économiques et nécessitent une adaptation aux conditions locales et régionales de Fès. La collecte des margines et leur mise en décharge était la seule solution immédiate et provisoire pour résoudre ce problème en attendant des procédés de traitement innovants. En 1996, la station d'évaporation naturelle située à Oulad Jamaa a été mise en service afin de soulager les eaux de l'Oued de Sebou des rejets des huileries. Elle est constituée de deux bassins qui reçoivent seulement 30% des margines produites par les huileries de la ville de Fès durant les campagnes oléicoles (Ministère des Travaux Publics, 1997). Cependant, cette solution préconisée par la ville de Fès est non seulement funeste sur le plan écologique mais

également peu efficace. La pollution s'accroît au fil des années et la recherche d'un système de traitement adéquat devient imminente.

Les différents types de traitement des margines étudiés jusqu'à présent ne résolvent qu'en partie le problème. En effet, la plupart des procédés proposés restent insuffisants et incomplets voire même limités.

- Le traitement physique ne permet qu'une simple séparation de l'eau des matières en suspension. Ce qui engendre l'apparition de boues en fin de traitement dont la gestion n'est pas tout à fait rationnelle.

- Le traitement chimique des margines demande de grandes quantités de réactifs, en raison de leur richesse en matières organiques et minérales.

- Le traitement biologique classique aérobie nécessite de fortes dilutions pour que le processus ne soit pas inhibé par les composés phénoliques toxiques. De plus, ce système aérobie demande une énergie très importante pour l'aération et le brassage du milieu.

- Le traitement biologique anaérobie est limité par des problèmes d'acidification, de toxicité et de biodégradabilité. En plus, les bactéries méthanogènes sont sensibles aux lipides résiduels contenus dans les margines (Hamdi, 1991a ; Mouncif *et al.*, 1993a ; Borja *et al.*, 1995a).

Les tendances actuelles doivent viser l'intégration de diverses technologies pour traiter les margines à faible coût. Ceci nécessite la production d'une valeur ajoutée susceptible de couvrir les charges du traitement. Les procédés biologiques innovants restent par excellence les moins coûteux, ce qui répond parfaitement à notre situation socio-économique. C'est ainsi que notre laboratoire s'est orienté vers l'usage de voies biologiques qui exploitent la flexibilité métabolique des souches adaptées à la dégradation des composés phénoliques et des technologies cellulaires nouvelles. Ce type de traitement présente au niveau des ouvrages de dépollution des margines un impact positif sur le coût de traitement. En effet, il permet l'économie de l'utilisation des produits chimiques toxiques, et d'autre part l'obtention d'une biomasse qui peut être valorisée comme aliment de bétail. L'extraction des exo-enzymes à intérêt industriel peut produire une valeur ajoutée capable de surpasser les difficultés techniques et économiques. En utilisant un tel procédé de traitement biologique, nous pourrions éliminer les composés phénoliques des effluents des huileries au meilleur rendement et à faible coût.

Le présent travail constitue l'une des premières études s'intéressant à la caractérisation physico-chimique et microbiologique des margines de la station d'évaporation naturelle de la ville de Fès. Le but de cette étude est d'évaluer l'efficacité du traitement des margines dans ces bassins, et d'y mettre en évidence les micro-organismes responsables de l'autoépuration éventuelle. Dans ce sens, nous avons procédé dans le premier chapitre à :

- Une caractérisation organique, minéralogique et métallique de la charge polluante de ces margines.
- Une caractérisation microbiologique par l'isolement et l'identification des micro-organismes capables de survivre sur cet effluent à haute toxicité.

Dans le deuxième chapitre nous avons approfondie la caractérisation et l'identification des souches de levures isolées via deux méthodes :

- Technique classique fondée sur l'étude des critères morphologiques, sexuels et physiologiques des souches.
- Technique moléculaire basée sur l'amplification par PCR des 28S et leur séquençage.

Le troisième chapitre vise en premier lieu, une sélection des souches isolées et identifiées pouvant être les plus performantes vis à vis de la dégradation des composés phénoliques, afin de cribler des souches pouvant jouer un rôle fondamental dans le traitement biologique des margines. En deuxième lieu, nous avons étudié le traitement des margines fraîches prélevées d'une huilerie industrielle via les souches sélectionnées. Ce traitement a été amélioré par une adaptation des souches à croître sur les margines à concentration croissante.

Dans le quatrième chapitre, nous avons étudié la production d'une exo-enzyme nommée tannase par une souche isolée des margines *Aspergillus niger* HA37 sur un milieu artificiel à base des tannins, et sur les margines. Cette étude a pour objectif la production d'une valeur ajoutée pouvant surpasser les difficultés des charges du traitement biologique des margines.

I. Situation oléicole mondiale

Environ 840 millions d'oliviers sont implantés en méditerranée, et 90 millions dans le reste du monde (Faostat, 2001). Les oliveraies sont de l'ordre de 10 millions d'hectares, soit une densité moyenne de 80 oliviers par hectare (COI, 2000). Les variations observées dans les densités de plantations sont liées aux conditions climatiques et topographiques et aux objectifs de production recherchés.

Plus de 70% des arbres se trouvent en Europe Méditerranéenne, 13% se situent au Proche-Orient, 13% en Afrique du nord et 3% en Amérique Latine et aux Etats Unis d'Amérique (figure 1) (Amoretti et Comet, 1985).

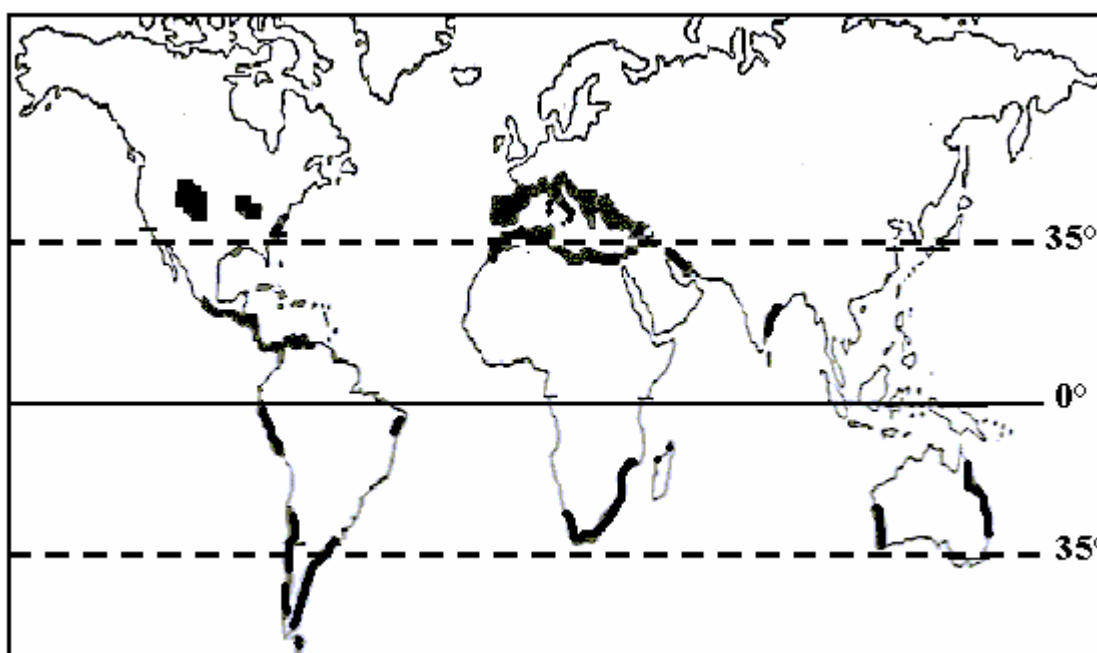


Figure 1 : Aires de répartition des oliviers au monde (Amoretti et Comet, 1985).

La culture des oliviers fait partie de la tradition méditerranéenne. C'est un symbole de civilisation chez les méditerranéens et en même temps un délice nécessaire sur leurs tables. L'oléiculture occupe une place prépondérante dans l'économie nationale de ces pays et particulièrement l'Espagne, l'Italie, la Grèce, la Turquie, la Tunisie et le Maroc (Tableau 1). L'oliveraie couvre dans ces pays 65% de la surface mondiale et produit 74%; soit 8,4 millions de tonnes d'olives annuellement (Nefzaoui, 1987).

Tableau 1 : Nombre d'oliviers et les superficies occupées par les oliveraies dans les six principaux pays méditerranéens oléicoles (Faostat, 2001).

Pays méditerranéen	Oliviers (10 ⁶)	Superficie (10 ⁶ ha)
Espagne	210	2
Italie	190	1,2
Grèce	95	0,7
Turquie	70	0,9
Tunisie	60	1,5
Maroc	62	0,55

Ces pays sont aussi les plus grands exportateurs d'huile d'olive avec un taux de production dépassant 80% en matière d'huile d'olive (Steegmans, 1995). L'Espagne se situe en premier rang avec 43% de la production mondiale suivie de l'Italie (28%), la Grèce (19%), la Turquie, la Tunisie et le Maroc.

Paradoxalement à la production d'huile d'olive, ces pays rejettent des eaux usées appelées margines qui posent actuellement un vrai problème environnemental pour toute la région méditerranéenne (Zimbalatti, 1995 ; Levis-Menzi *et al.*, 1995). En effet, plus de 30 10⁶ m³ de margines sont produits annuellement dans le bassin méditerranéen par rapport au volume mondial inférieur à 40 millions de m³/an (Fiestas Ros de Ursinos, 1981 ; Sayadi et Ellouz, 1995 ; Borja *et al.*, 1995a).

II. Secteur oléicole au Maroc

Au Maroc, l'oléiculture joue un rôle socio-économique très important. En effet, l'olivier constitue la principale espèce fruitière plantée au Maroc, avec environ 550 000 hectares. Le patrimoine oléicole représente plus de 50% de la superficie arboricole totale (Faostat, 2001), et est concentré dans trois zones principales (Achkari-Begdouri, 1994) :

- La zone sud : occupe une superficie de 114 600 ha, soit 29% de la superficie totale. Elle est représentée par les oliveraies des provinces de Marrakech, Tadla, BeniMellal, Kalaa de Sreghnae et Taroudante.
- La zone nord : couvre une surface de 107 000 ha, soit 27% de la superficie totale. Elle est représentée par les oliveraies des provinces de Chefchaoun, Ouazzan et Taounate.
- La zone centre : occupe une superficie de 86 000 ha, soit 22% du total. Elle regroupe les oliveraies des Provinces de Taza, Fès et Meknès.

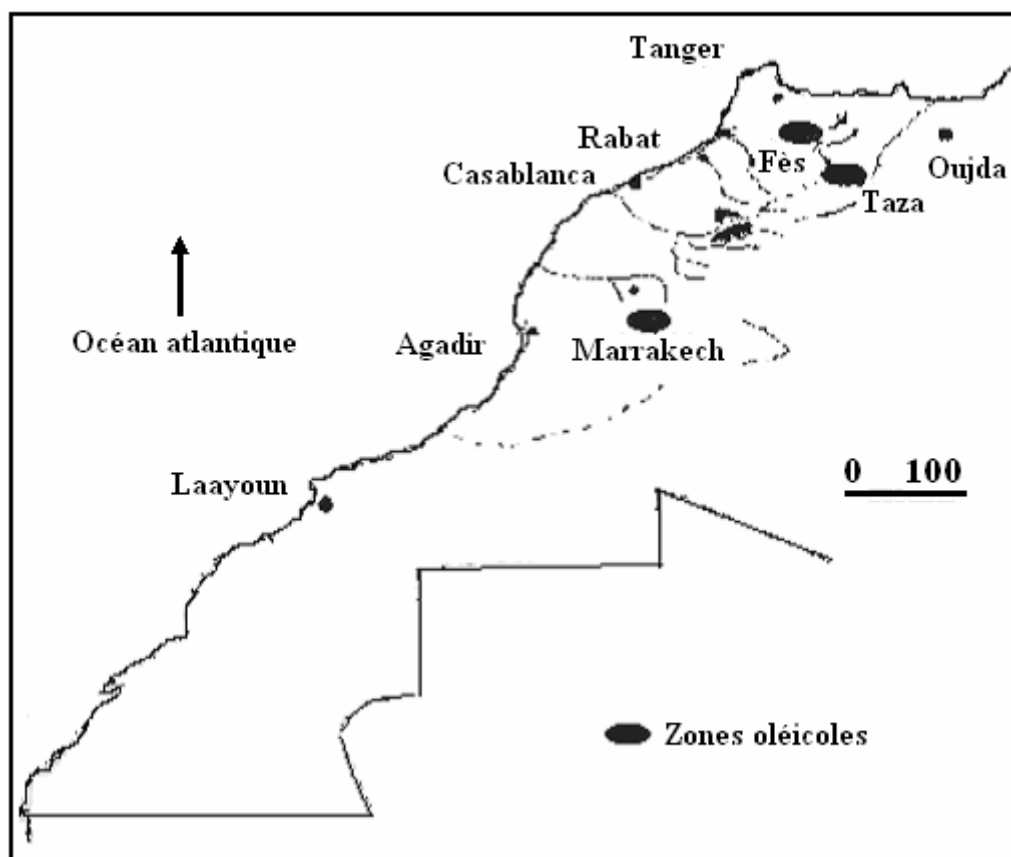


Figure 2 : Répartition géographique des principales zones oléicoles nationales.

A l'échelle nationale, l'huile d'olive est extraite par des systèmes modernes de centrifugation (unités industrielles) ou par des méthodes traditionnelles de pression faisant usage de presses mécaniques (petites maâsras). Le potentiel de trituration des olives compte 16 360 huileries réparties comme suit :

- 16 000 unités traditionnelles (Maâsras), avec une capacité de production dépassant les 50% des olives triturées annuellement.
- 360 unités industrielles avec une capacité de trituration de près de 400 000 tonnes.

La province de Fès constitue le premier pôle de production de l'huile d'olive. En effet plus de 42% des unités industrielles sont concentrées dans cette ville tandis que les unités traditionnelles (maâsras) ne présentent que 18% du nombre total des huileries. Marrakech et ses environs viennent en second lieu; avec 22,4% des unités industrielles et 11% des maâsras, puis la province de Meknès constitue le troisième centre avec un taux de 16,2% d'unités industrielles et 5% des maâsras (tableau 2).

Ces trois régions assurent environ 50% de la production nationale en huile d'olive (Samhale, 1992).

Tableau 2 : Répartition par région des principales unités industrielles et traditionnelles (Maâsras) (Achkari-Begdouri, 1994).

Province	Nombre d'unités	
	Industrielles	Traditionnelles
Fès-Taounate	72	2879
Marrakech	25	1760
Meknès	29	183
Essaouira	8	1109
Agadir	6	1351
Sidi Kacem	8	778
Beni Mellal	5	529
Azilal	2	1107
Taza	1	1815
Oujda	3	304
Nador	3	181
Errachidia	3	382

III. Synoptique de fabrication d'huile d'olives

La production d'huile d'olives a toujours été le principal objectif de la culture de l'olivier. Les méthodes d'extraction ont évolué mais, le processus d'extraction d'huile d'olives reste toujours le même. Il inclut quatre opérations principales : les opérations préliminaires, le broyage, le malaxage et la séparation des phases liquides ; huile et eau (Chimi, 1997).

III. 1. Opérations préliminaires

Elles consistent à l'effeuillage des olives qui se fait généralement par aspiration, suivi par le lavage afin d'éliminer les matières étrangères (saletés, moisissures...). Ces matières peuvent d'une part, altérer les propriétés organoleptiques de l'huile (couleur, odeur, goût) et d'autre part, user les broyeurs métalliques.

III. 2. Broyage

Cette opération consiste à la dilacération du tissu des olives pour libérer les gouttelettes d'huile contenues dans les vacuoles à l'intérieure des cellules d'olives.

III. 3. Malaxage

Il consiste en un broyage lent et continu de la pâte d'olive préalablement chauffée. Il a pour but de libérer le maximum d'huile en brisant les vacuoles qui sont restées entières durant la phase précédente et d'amasser les gouttelettes d'huile en gouttes plus grosses.

III. 4. Séparation des phases

Cette opération consiste à :

– Séparation des phases liquides-solides : Le broyage et le malaxage aboutissent à la formation d'une pâte qui contient de la matière solide et des fluides. La matière solide appelée grignon est formée de débris de noyaux, d'épiderme, de parois cellulaires...etc, alors que la partie fluide est composée d'huile et d'eau de végétation appelée margine.

– Séparation des phases liquides-liquides : La séparation entre la phase aqueuse de la phase huileuse se fait essentiellement par simple décantation ou par centrifugation. Elle est basée sur la différence de densité entre l'huile d'olive et l'eau de végétation.

IV. Procédés d'extraction d'huiles d'olives

Au Maroc et jusqu'à ces dernières décennies, le secteur oléicole n'utilisait que des techniques traditionnelles. L'extraction a été réalisée à l'aide des systèmes archaïques de pression faisant appel à la force animale à défaut de l'énergie électrique.

Avec le développement du secteur oléicole, les systèmes traditionnels ont cédé la place aux équipements modernes. Le perfectionnement de ces procédés a permis d'extraire l'huile à travers des phases successives. Auparavant, l'extraction était effectuée de manière discontinue (lavage des olives, broyage mécanique, malaxage, extraction des moûts huileuses). De même, après le développement des appareils de centrifugation, la séparation de l'huile des eaux de végétation est devenue moins onéreuse (Francesco, 1993).

IV. 1. 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.

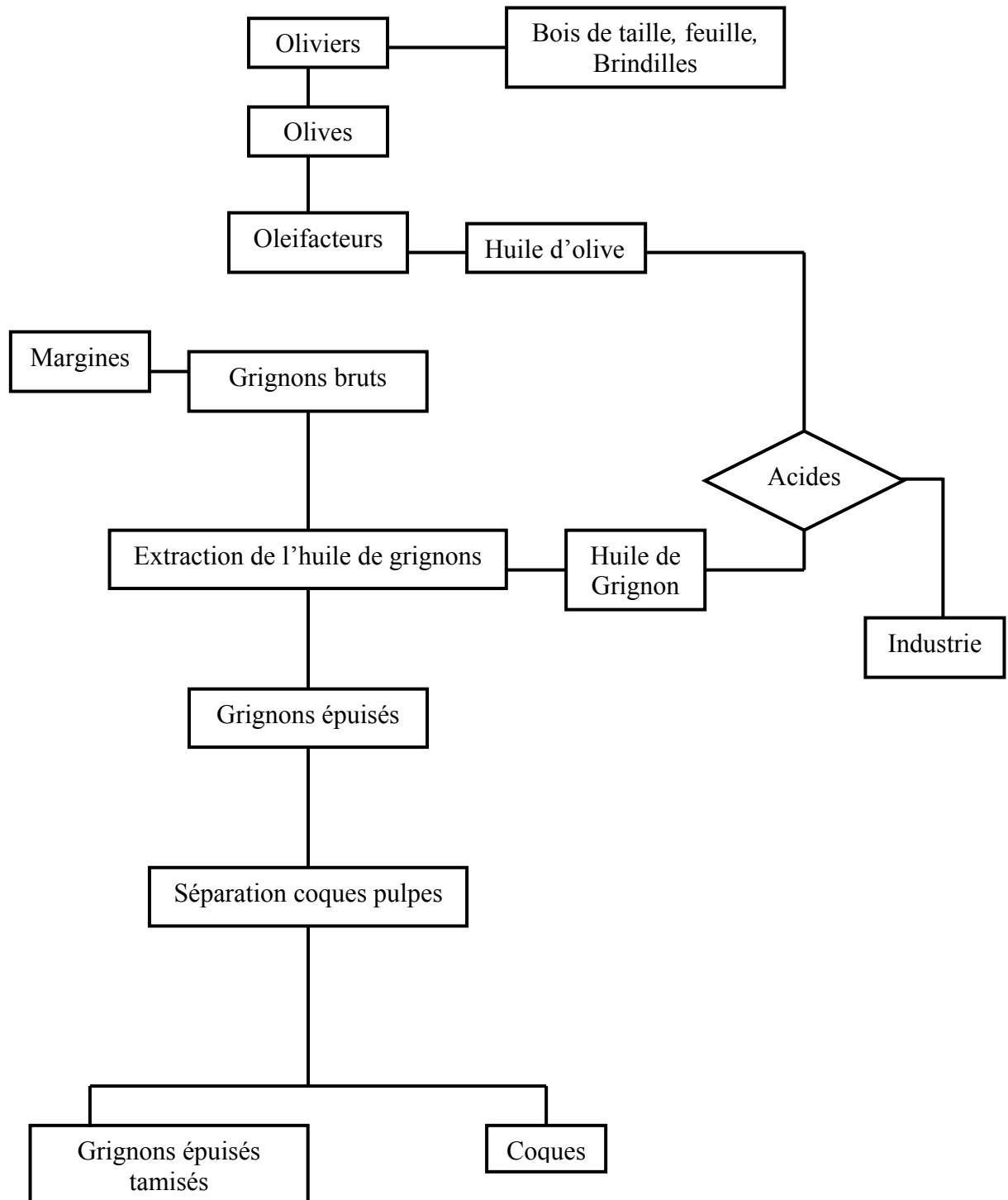


Figure 3 : Diagramme de traitement des olives par pression et nature des différents sous-produits (Nefzaoui, 1987).

IV. 2. 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.

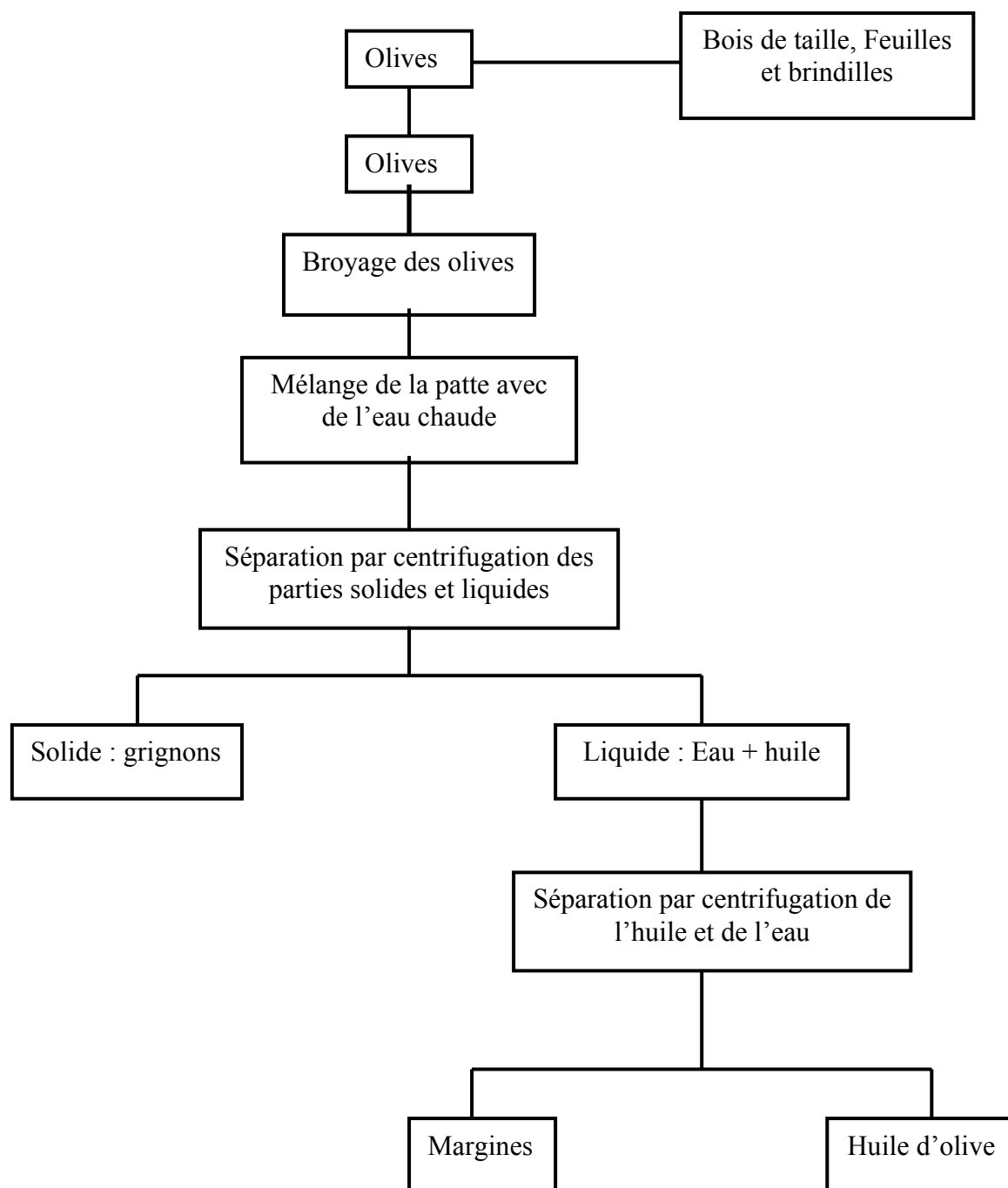


Figure 4 : Procédé d'obtention de l'huile d'olive par centrifugation et nature des différents sous-produits (Nefzaoui, 1987).

IV. 3. Comparaison entre les procédés en discontinu et en continu

La différence substantielle entre les deux procédés réside dans la durée des opérations et les rendements en terme de quantité et de qualité de l'huile par quintal d'olives traitées.

Les installations à cycle continu permettent de réduire la main d'œuvre et d'augmenter la capacité de production globale d'huile d'olive (figure 4). Néanmoins, ces installations présentent des inconvénients dus principalement à la consommation élevée d'eau chaude dont le volume peut parfois dépasser celui des olives mises en œuvre, ce qui se traduit par une production accrue de margines. Dans les systèmes traditionnels (figure 3), l'extraction se fait sans addition significative d'eau, ce qui se répercute sur la charge des margines en matières organique et en suspension (tableau 3). En effet, les margines des unités traditionnelles sont plus chargées et plus concentrées que ceux des unités modernes. Certains auteurs rapportent que la DCO des margines provenant d'un procédé d'extraction par centrifugation varie entre 20 et 200 g d'O₂.l⁻¹ de margines (Di-Giovacchino *et al.*, 1988 ; Martin *et al.*, 1991 ; Hamdi, 1993c). Celle des margines produites par les systèmes d'extraction par pression varie entre 100 et 390 g d'O₂.l⁻¹ de margines (Di-Giovacchino *et al.*, 1988 ; Mouncif *et al.*, 1993b). Dans ce sens, les usines d'oléifaction sont actuellement remises en cause en raison des effluents qu'elles produisent.

Tableau 3 : Comparaison de la charge organique des margines issues du procédé en continu et du procédé en discontinu (Ranalli, 1991a).

Paramètre	Procédé discontinu	Procédé continu
Substances organiques (g.kg ⁻¹)	94,6	55,4
Sucres réducteurs (g.l ⁻¹)	35,2	17,3
Carbone total (g.l ⁻¹)	59	37,1
DCO (g d'O ₂ .l ⁻¹)	148	85,1
DBO ₅ (g d'O ₂ .l ⁻¹)	67,1	39,8

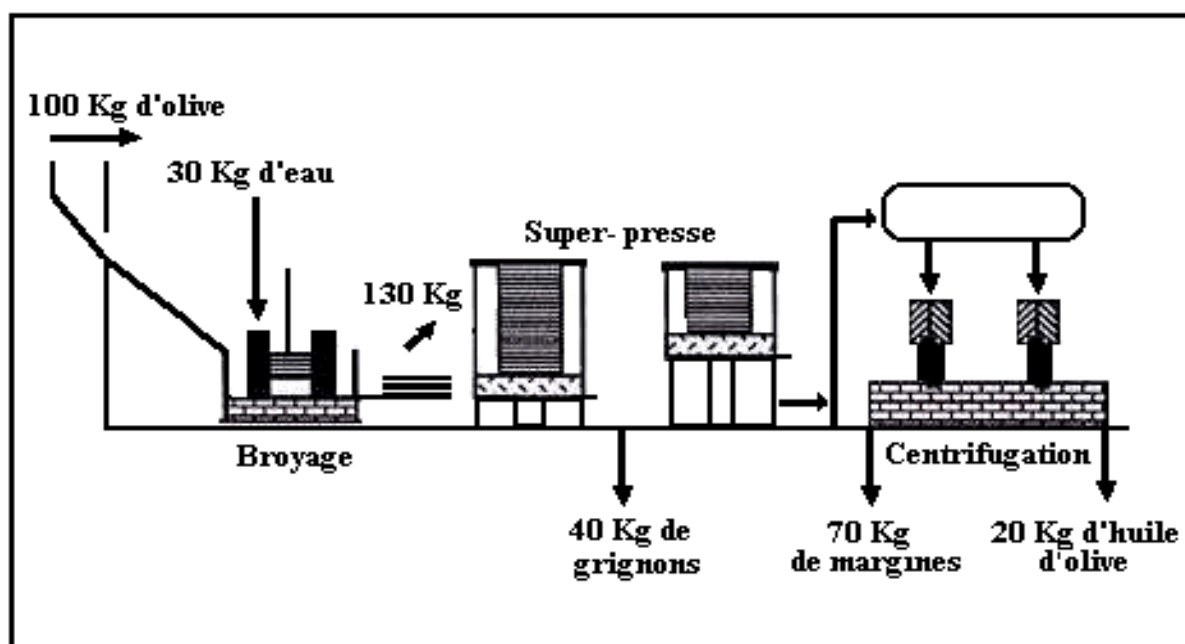


Figure 5 : Schéma descriptif du procédé super-pressé utilisé pour l'extraction d'huile d'olive avec les sous-produits engendrés.

Actuellement, les grandes usines dites également super-pressée emploient de plus en plus le procédé en continu (figure 5) dans le but d'améliorer le rendement de production d'huile d'olive sans se préoccuper des grandes quantités des margines produites.

V. Problématique environnementale générée par les margines

V. 1. Origine des margines

Le processus de trituration des olives produit principalement l'huile d'olive vierge et l'huile de grignon (huile secondaire extraite par des solvants organiques) et engendre deux résidus l'un liquide, les margines et l'autre solide, les grignons. Les olives contiennent environ 20% d'huile, 30% de grignons et 50% d'eau de végétation (Di-Giovacchino *et al.*, 1988 ; Hamdi *et al.*, 1992).

Les margines sont composées de 40 à 50% de l'eau végétal qui provient du fruit (olive) et le reste de l'eau de fabrication ajoutée lors du processus de trituration (Nefzaoui, 1987 ; Di-Giovacchino, 1996).

V. 2. Estimation du débit des margines

La quantité et la qualité des margines produites dépendent essentiellement du système d'extraction utilisé. Au Maroc, on estime que la production de 30 000 tonnes d'huile est accompagnée de 75 000 m³ de margines (Scandiaconsult, 1992). En moyenne, 100 kg d'olives produisent 50 litres de margines via la centrifugation et environ 10 litres par le système classique de pression (Martin *et al.*, 1991).

V. 3. Pollution par les margines

Les grignons ne posent pas de problèmes particuliers pour l'environnement et connaissent à l'heure actuelle diverses voies d'utilisation et de valorisation telles que : la production de charbon de bois et la possibilité éventuelle d'exploitation des éclats de bois pour la fabrication de la pâte à papier (Jardak, 1999).

En revanche, les margines constituent une source d'inquiétude au Maroc. Elles créent d'importantes nuisances et perturbations du milieu récepteur. Ces effluents sont acides et extrêmement chargés en matières organiques qui contiennent essentiellement des composés phénoliques provenant de la pulpe d'olive (Vasquez *et al.*, 1974). D'où la forte activité polluante des margines sur les eaux de surface. L'Oued de Sebou pendant la période oléicole, présente une si grande dégradation de sa qualité que l'ONEP s'est trouvé dans l'obligation d'arrêter le traitement de ses eaux avant la confluence dans 3 stations. De ce fait, la ville de Fès a connu une pénurie d'eau potable en janvier 1992, principalement pour la population résidant l'ancien médina (Scandiaconsult, 1992).

VI. Caractérisation physico-chimique des margines

Les margines se présentent comme un liquide résiduel aqueux, de couleur brune-rougeâtre à noire avec une forte odeur d'olive et un aspect trouble (Ranalli, 1991a). Leur pH est acide (4 - 5,5) avec un fort pouvoir tampon et une odeur fétide qui se développe au fur et à mesure que les margines vieillissent (Ranalli, 1991a ; Hamdi, 1993c ; Mouncif *et al.*, 1993a). Elles ont généralement une forte salinité due à l'ajout important de sel pour la conservation des olives (conductivité supérieure à 10 mS.cm⁻¹) (Zenjari *et al.*, 1999 ; Tsioulpas *et al.*, 2002).

La composition des margines a été étudiée par plusieurs chercheurs et comporte approximativement 83 à 94% d'eau, 4 à 16% de matières organiques et 0,4 à 2,5% de substances minérales (Ramos-Cormenzana, 1986 ; Ranalli, 1991a).

La caractérisation physico-chimique des margines est généralement tributaire des techniques et des systèmes retenus pour l'extraction d'huile d'olives et diffère d'un pays à l'autre.

En général, les margines présentent une composition chimique très complexe et hétérogène. Elles contiennent une variété de composés organiques et minéraux, de nature et de concentration très différentes. Cette variation est due essentiellement aux facteurs suivants (Karapinar et Worgan, 1983 ; Bambalov *et al.*, 1989) :

- Stade de maturation des olives,
- Conditions climatiques,
- Variété des oliviers,
- Système de culture,
- Situation géographique,
- Temps de stockage des olives avant la trituration,
- Techniques et lieu de stockage,
- Nature de conservation des olives,
- Procédé d'extraction d'huile d'olive qui représente l'élément le plus important (De Felice *et al.*, 1997 ; Ramos-Cormenzana, 1986 ; Annaki *et al.*, 1999b).

Les analyses menées sur les margines peuvent nous renseigner sur les intervalles de variation de leurs différents composants chimiques (Fiestas Ros de Ursinos et Borja, 1992 ; Lutwin *et al.*, 1996).

Tableau 4 : Principales composantes des margines (Lutwin *et al.*, 1996).

Composant	% en poids de la matière fraîche
Matière sèche	1,4-17
Matières minérales	10-15
Sucres divers	30-50
Graisses et huiles diverses	12-35
Composés phénoliques	5,0-25
Azote organique	<10%

VI. 1. Fraction minérale

Les margines contiennent des quantités significatives en sels minéraux (Ranalli, 1991a) dont 80% sont solubles (phosphates, sulfates et chlorures) et 20% insolubles (carbonates et silicates). D'après Fiestas Ros de Ursinos et Borja (1992), les éléments les plus représentatifs sont le potassium (47%), les carbonates (21%), les phosphates (14%) et le sodium (7%).

La fraction minérale a été analysée par Salvemini (1985). Le tableau 5 regroupe les concentrations de ces éléments.

Tableau 5 : Composition minérale des margines (Salvemini, 1985).

Elément	Concentration (mg.l ⁻¹)
Orthophosphates (PO ₄ ³⁻)	800,6
Chlorures (Cl ⁻)	270,2
Sulfate (SO ₄ ²⁻)	16,68
Sodium (Na ⁺)	5370,9
Potassium (K ⁺)	15295,5
Calcium (Ca ²⁺)	1167,6
Magnésium (Mg ²⁺)	410,3
Fer (Fe)	103,4
Aluminium (Al)	8,34
Chrome (Cr ⁻)	0,66
Nickel (N)	3,36
Cobalt (Co)	1,33
Manganèse (Mn)	1,66
Cadmium (Cd)	0,83
Oxyde de silicium (SiO ₂)	41,7
Zinc (Zn)	10,0

Ce tableau montre que les margines sont riches en phosphore, sodium, potassium et calcium. Par conséquent elles peuvent être utilisées comme fertilisants des terres agricoles (Buldini *et al.*, 2000 ; Capasso *et al.*, 2002a, 2002b).

La composition minérale des margines a été aussi étudiée par Lutwin *et al.* (1996). Le tableau 6 montre les valeurs des éléments minéraux en % du poids de la matière sèche.

Tableau 6 : Constituants minéraux des margines (Lutwin *et al.*, 1996).

Elément	Valeur en % du poids de la matière sèche
Potassium (K ₂ O)	5-15
Calcium (CaO)	0,2-2,5
Phosphore (P ₂ O ₅)	0,5
Magnésium (MgO)	3,0
Sodium (Na ₂ O)	<1%

Arienzo et Capasso (2000) ont analysé les cations métalliques et les anions inorganiques présents dans deux types de margines Italiennes (Tableau 7).

Tableau 7 : Concentrations des Cations et des Anions dans les margines issues d'un système par pression (omww₁) et d'un processus par centrifugation (omww₂).

Cation	Cations (g.l⁻¹)		Anion	Anions (g.l⁻¹)	
	omww₁	omww₂		omww₁	omww₂
K ⁺	17,10 ± 0,31	9,80 ± 0,12	Cl ⁻	1,63 ± 0,06	1,3 ± 0,02
Mg ²⁺	2,72 ± 0,13	1,65 ± 0,11	H ₂ PO ₄ ⁻	1,07 ± 0,06	0,85 ± 0,04
Ca ²⁺	2,24 ± 0,14	1,35 ± 0,10	F ⁻	0,57 ± 0,01	0,53 ± 0,01
Na ⁺	0,40 ± 0,17	0,162 ± 0,08	SO ₄ ⁻	0,53 ± 0,05	0,42 ± 0,02
Fe ²⁺	0,129 ± 0,05	0,033 ± 0,01	NO ₃ ⁻	0,023 ± 0,01	0,011 ± 0,008
Zn ²⁺	0,0630 ± 0,001	0,0301 ± 0,001			
Mn ²⁺	0,0147 ± 0,001	0,0091 ± 0,001			
Cu ²⁺	0,0086 ± 0,001	0,0098 ± 0,001			

Ces résultats montrent que les margines issues du système de centrifugation sont moins concentrées en cations et en anions. Ceci est dû à leur dilution par l'eau durant l'extraction d'huile d'olives (Arienzo et Capasso, 2000).

La composition des métaux contenus dans les polymères des margines a été étudiée par Capasso *et al.* (2002a) (Tableau 8).

Tableau 8 : Composition des métaux contenus dans les polymères.

Métal	mg 100⁻¹	mmol 100⁻¹
K ⁺	8,26	0,2100
Na ⁺	0,82	0,0360
Ca ²⁺	0,85	0,021
Mg ²⁺	0,46	0,019
Fe ³⁺	0,54	0,0097
Zn ²⁺	0,11	0,0017
Cu ²⁺	0,02	0,00031
Total	11,06	0,30

VI. 2. Fraction organique

Les margines comportent deux fractions organiques :

- Fraction insoluble constituée essentiellement de pulpes d'olives. Cette fraction représente les matières en suspension et colloïdales (Hamdi, 1991a).
- Fraction soluble dans la phase aqueuse et contient les sucres, les lipides, les acides organiques et les composés phénoliques (Hamdi, 1991a).

VI. 2. 1. Sucres

Les études effectuées sur les margines par Hamdi (1993a) ont montré que la teneur en glucides varie entre 2 et 8% du poids de la pulpe d'olive fraîche.

Les glucides rencontrés dans les margines contiennent principalement des composés lignocellulosiques et des pectines qui représentent respectivement 3% et 0,6% (Fernandez Diaz, 1983).

La présence d'autres sucres simples tel que : glucose, saccharose, mannose, arabinose, raffinose et xylose a été également signalée par Salvemini (1985).

La composition des monosaccharides contenus dans les polymères des margines a été étudiée par Capasso *et al.* (2002a) (Tableau 9).

Tableau 9 : Composition des monosaccharides contenus dans les polymères.

Monosaccharide	mg 100 ⁻¹	mmol 100 ⁻¹
Arabinose	20,90	0,13
Galactose	10,45	0,058
Glucose	9,90	0,055
Rhamnose	5,50	0,034
Acide Glucuronique	4,40	0,023
Acide Galacturonique	3,85	0,020
Total	55,00	0,32

VI. 2. 2. Composés azotés

La fraction azotée est représentée principalement par les protéines avec une concentration variant entre 1,2 et 2,4% (p/v). Presque tous les acides aminés sont présents dans les margines. Les plus abondants sont l'acide aspartique, l'acide glutamique, la proline et la glycine (Salvemini, 1985 ; Ranalli, 1991a ; Capasso *et al.*, 2002a).

Tableau 10 : Composition des acides aminés des polymères des margines (Capasso *et al.*, 2002a).

Acide aminé	mg 100 ^{-1a}	mmol 100 ^{-1a}
Asp + Asn	1,95	0,015
Glu + Gln	2,02	0,014
Cys	0,10	0,00083
Thr	0,87	0,0073
Ser	1,37	0,013
Pro	1,30	0,011
Gly	2,29	0,031
Ala	1,36	0,015
Val	1,35	0,012
Met	0,37	0,0024
Ile	0,60	0,0046
Leu	1,15	0,0088
Tyr	0,55	0,0030
Phe	0,54	0,0033
Lys	0,054	0,00037
His	0,088	0,0057
Arg	0,64	0,0037
Total	16,60	0,15

VI. 2. 3. Vitamines

Plusieurs vitamines ont été identifiées. Les plus fréquentes sont les vitamines du groupe D et la vitamine PP avec une concentration de 124 mg.kg⁻¹ de margines (Salvemini, 1985). Cette teneur peut être exploitée à l'échelle industrielle.

VI. 2. 4. Acides organiques

La proportion des acides organiques présente dans les margines varie entre 0,5 et 1,5% (p/v). Les principaux acides organiques rencontrés sont les acides fumarique, glycérique, lactique, malique et malonique (Fiestas Ros de Ursinos, 1981 ; Salvemini, 1985).

VI. 2. 5. Huiles

La concentration d'huile résiduelle contenue dans les margines est très variable selon le procédé d'extraction utilisé. Elle varie entre 0,02 et 1% (v/v) (Fiestas Ros de Ursinos et Borja, 1992). L'acide oléique est l'acide gras le plus abondant avec un pourcentage de 65% par rapport à la totalité d'huile (Ranalli, 1991a).

VI. 2. 6. Composés phénoliques

Les composés phénoliques des margines sont très divers et leur structure est très variable. Ils proviennent de l'hydrolyse enzymatique des glucides et des esters de la pulpe d'olive au cours du processus d'extraction. Leur solubilisation dans l'huile est cependant bien inférieure à celle dans les eaux de végétation, ce qui explique leur concentration élevée détectée dans les margines (Ranalli, 1991a). Les caractéristiques organoleptiques de l'huile d'olive vierge dépendent de la présence des composés phénoliques et des substances volatiles (Vazequez, 1978). La teneur en composés phénoliques dans les margines dépend du système d'extraction de l'huile d'olive (Annaki *et al.*, 1999b). En général, elle varie entre 3 et 5 g.l⁻¹ (Balice *et al.*, 1997 ; Al-Malah *et al.*, 2000 ; Oukili *et al.*, 2001 ; Garrido Hoyos *et al.*, 2002 ; Tsioulpas *et al.*, 2002 ; Casa *et al.*, 2003 ; Fenice *et al.*, 2003) et elle peut même dépasser les 9 g.l⁻¹ (Klibanov *et al.*, 1983 ; Borja *et al.*, 1992 ; Sayadi et Ellouz, 1993 ; Kissi *et al.*, 2001 ; Aissam *et al.*, 2002). Plus de 50 composés phénoliques et plusieurs alcools ont été identifiés (Saiz-Jiménez *et al.*, 1987 ; Maestro-Duran *et al.*, 1991 ; Brenes *et al.*, 1999 ; D'Annibale *et al.*, 2000 ; Casa *et al.*, 2003). La composition des margines en composés phénoliques diffère aussi selon la procédure d'extraction et la variété d'olive traitée (Ramos-Cormenzana, 1986).

VI. 2. 6. 1. Les monomères phénoliques

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

- 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 (Vazequez *et al.*, 1974 ; Borja *et al.*, 1995a).
- Acide p-coumarique (Vazequez *et al.*, 1974 ; Borja *et al.*, 1995a).
- Acide protocatéchique (Vazequez *et al.*, 1974 ; Cichelli et Solinas, 1984 ; Borja *et al.*, 1995a).
- Acide vanillique (Vazequez *et al.*, 1974 ; Balice et Cera, 1984 ; Borja *et al.*, 1995a).
- Acide 4-hydroxyphénylacétique (Cichelli et Solinas, 1984 ; Borja *et al.*, 1995a).
- Acide syringique (Cichelli et Solinas, 1984 ; Borja *et al.*, 1995a).

- Acide p-hydroxybenzoïque (Cichelli et Solinas, 1984 ; Borja *et al.*, 1995a).
- Acide vératrique (Balice et Cera, 1984 ; Martinez *et al.*, 1992).

- Alcools phénoliques

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

- 4-Hydroxyphényléthanol (Vazequez *et al.*, 1974 ; Cichelli et Solinas, 1984).
- 3,4-dihydroxyphényléthanol (Vazequez *et al.*, 1974 ; Cichelli et Solinas, 1984 ; Wagner *et al.*, 1984 ; Borja *et al.*, 1995a), appelé aussi hydroxytyrosol.
- 4-hydroxyphényléthanol (tyrosol) (Wagner *et al.*, 1984 ; Borja *et al.*, 1995a).
- Syringaldéhyde (Borja *et al.*, 1995a).

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

- Autres composés phénoliques : (Wagner *et al.*, 1984 ; Capasso, 1997)

D'autres composés phénoliques monomères ont été identifiés :

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

L'oleuropéine est très abondant dans les margines et se caractérise par un goût amer, elle peut atteindre jusqu'à 2% du poids d'olives (Wagner *et al.*, 1984).

Les composés phénoliques sont essentiellement contenus dans la fraction soluble des margines. Balice et Cera (1984) ont quantifié certains composés phénoliques des margines par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) (tableau 11).

Tableau 11 : Teneur de quelques composés phénoliques identifiés dans les margines (Balice et Cera, 1984).

Composé phénolique	Teneur en mg.l ⁻¹
- Acide vanillique	242
- Acide 4-hydroxyphénylacétique	145
- Acide syringique	710
- Acide vératrique	500
- Acide 3,4,5- triméthoxybenzoïque	80

La composition phénolique des margines d'Italie a été étudiée par chromatographie en phase gazeuse (CPG) (D'Annibale *et al.*, 2000) et par chromatographie en phase liquide (HPLC) (Casa *et al.*, 2003). Les tableaux 12 et 13 illustrent les résultats de leurs études.

Tableau 12 : Composition phénolique des margines étudiées par D'Annibale *et al.* (2000).

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

Tableau 13 : Phénols totaux, ortho-diphénol et monomères aromatiques contenus dans les margines (Casa *et al.*, 2003).

Composés phénoliques	Teneur
Phénols totaux (g.l ⁻¹)	3,7 0± 0,1
Ortho-diphénol (g.l ⁻¹)	1,20 ± 0,02
Acide 3,4-dihydroxybenzoïque (mM)	0,35 ± 0,01
Catéchol (mM)	2,28 ± 0,1
Acide 4-hydroxybenzoïque (mM)	0,12 ± 0,004
Tyrosol (mM)	2,47 ± 0,07
Acide syringique (mM)	0,196 ± 0,04
Acide caféique (mM)	1,53 ± 0,1
4-Methylcatechol (mM)	4,12 ± 0,3
Acide 3-hydroxyphénylpropionique (mM)	0,06
Acide para-coumarique (mM)	0,19
Acide vératrique (mM)	0,227 ± 0,21
Acide 3,4,5-trimethoxybenzoïque (mM)	0,03
Acide trans-cinnamique (mM)	0,33 ± 0,08

Plusieurs composés phénoliques ont été identifiés par HPLC dans des margines Espagnoles par Borja *et al.* (1995a) (tableau 14).

Tableau 14 : Composés phénoliques identifiés dans les margines (Borja *et al.*, 1995a).

Acides phénoliques	Alcools phénoliques
Acide caféique	4-hydroxyphényléthanol (tyrosol)
Acide p-coumarique	Syringaldéhyde
Acide protocatéchique	
Acide vanillique	
Acide 4-hydroxyphénylacétique	
Acide syringique	
Acide sinapique	
Acide ferulique	
Acide p-vanilline	
Acide 3,5-diméthoxy-4-hydroxycinnamique	
Acide p-hydroxybenzoïque	

La variabilité des margines influence considérablement leur contenu qualitatif et quantitatif en composés phénoliques. Toutefois, ceux-ci restent la fraction dominante de la matière organique. L'analyse qualitative des composés phénoliques par les techniques de chromatographie reste très délicate. Ceci est dû à la polymérisation des monomères phénoliques en polyphénols, et au chevauchement de certains pics dans le chromatogramme des molécules ayant des poids moléculaires et des structures très proches.

VI. 2. 6. 2. Les polymères phénoliques

Les polyphénols identifiés dans les margines sont essentiellement :

- Les anthocyanes (Tanchev *et al.*, 1980).
- Les tannins : leur structure est très complexe, leur concentration peut atteindre 12 g.l⁻¹ (Balice *et al.*, 1982). Ils sont classés conventionnellement en tanins hydrolysables et tanins condensés (Monties, 1980).

i. Les tannins hydrolysables renferment trois groupes :

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

ii. Les tanins condensés, appelés aussi flavotanins. Ils sont formés par la polymérisation de la catéchine à différents degrés. Leur poids moléculaire est compris entre 500 et 3 000. Le catécholmélaniqne est le flavotanin le plus retrouvé en quantité élevée dans les margines. Les flavotanins sont souvent associés aux anthocyanes. En milieu alcoolique et en présence de HCl 5N, ils sont dégradés avec formation de pigments anthocyaniques de coloration rouge (cyanidine).

– La lignine est un hétéropolymère formé par la polymérisation oxydative de trois types de monomères dérivés de l'alcool hydroxycinnamique : le 4-hydroxycinnamate, le 4-hydroxy 3-méthoxycinnamate (coniférylate) et le 3,5-diméthoxy-4-hydroxycinnamate (sinapylate) (Hamdi, 1991a).

VI. 2. 6. 3. Métabolisme des composés phénoliques

Les composés phénoliques des margines sont toujours susceptibles d'être dégradés par les micro-organismes (Borja *et al.*, 1992 ; Sayadi et Ellouz, 1993 ; D'annibale *et al.*, 1998 ; Garcia Garcia *et al.*, 2000 ; Garrido Hoyos *et al.*, 2002 ; Tsioulpas *et al.*, 2002 ; Fountoulakis *et al.*, 2002) ou par les enzymes d'origine microbienne (Tien et Kirk, 1984 ; Douglas *et al.*, 1990 ; Martirani *et al.*, 1996 ; D'Annibale *et al.*, 2000 ; Robles *et al.*, 2000 ; Casa *et al.*, 2003). Cependant, le temps nécessaire pour une dégradation totale peut être considérable. Un grand nombre de micro-organismes y compris les bactéries *Pseudomonas putida* (Di Gioia *et al.*, 2001a ; Bertin *et al.*, 2001), *Rhodopseudomonas satustrisand* (Rahlkar *et al.*, 1993), les champignons comme *Aspergillus niger* (Hamdi et Ellouz, 1993 ; Garcia Garcia *et al.*, 2000), *Aspergillus terreus* (Garrido Hoyos *et al.*, 2002) *Phanerochaete chrysosporium* (Sayadi et Ellouz, 1992, 1993, 1995 ; Kissi *et al.*, 2001) et les levures comme *Candida tropicalis* (chang *et al.*, 1995 ; Fadil *et al.*, 2003) a été isolé et caractérisé. Ces micro-organismes possèdent la capacité de dégrader les phénols à faible concentration. Peu d'études ont été réalisées pour améliorer la dégradation des composés phénoliques par ces micro-organismes (Chang *et al.*, 1995). Bien que plusieurs travaux aient été réalisés sur la dégradation des composés aromatiques, les informations sur leur métabolisation chez les micro-organismes restent très limitées (Middelhoven, 1993 ; Van-berkel *et al.*, 1994 ; Capasso, 1997).

VI. 2. 6. 3. 1. Dégradation aérobie des monomères aromatiques

La minéralisation des composés aromatiques naturels commence par l'hydrolyse de polymères, avec ensuite des réactions essentiellement de décarboxylation et de méthylation

qui aboutissent à des monomères aromatiques facilement clivables. Cette dégradation aérobie peut être réalisée par les bactéries, les levures, les champignons et les algues.

Les premières réactions impliquées dans la métabolisation des composés aromatiques sont les hydroxylations de l'anneau aromatique avec l'oxygène moléculaire, par l'intermédiaire d'un groupe d'enzymes appelé oxygénases (Maeda-Yorita et Massey, 1992). Ces enzymes sont divisées en deux groupes :

1- Le premier groupe est connu sous plusieurs nomenclatures, monooxygénases, hydroxylases ou oxydases à fonctions mixtes. Ces dernières fixent un atome d'oxygène aux substrats et réduisent le deuxième atome d'oxygène en eau par l'intermédiaire du cofacteur enzymatique réduit comme le montre la réaction suivante :

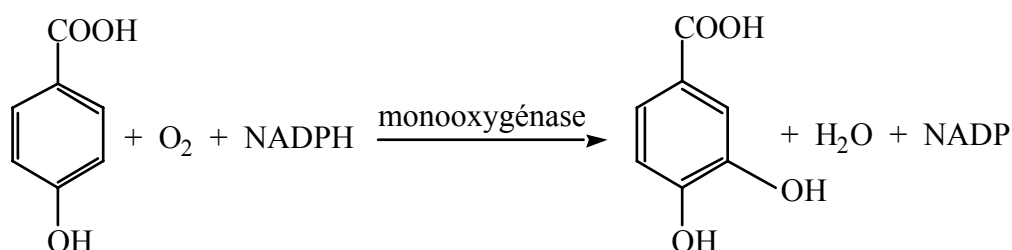


Figure 6 : Hydroxylation de l'acide parahydroxybenzoïque par la monooxygénase.

2- Le deuxième groupe comprend des oxygénases qui fixent deux atomes d'oxygène au substrat sans formation concomitante d'eau. On cite comme exemple, l'hydroxylation de l'acide benzoïque en catéchol.

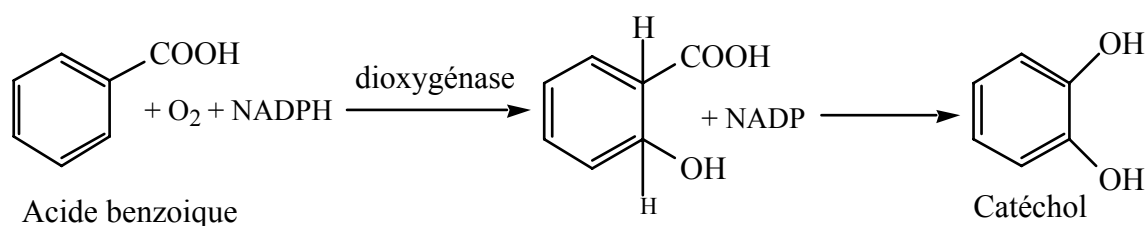


Figure 7 : Hydroxylation de l'acide benzoïque en Catéchol par la dioxygénase.

Les processus d'hydroxylation cités ci-dessus varient selon les cellules. En effet, chez les bactéries, l'hydroxylation de l'acide benzoïque par une dioxygénase conduit à la formation du benzène 1,2-dioxetane qui se réduit au cis 1,2-dihydro 1,2-dihydroxy benzène. Cependant, chez les levures et les champignons, le système implique les monooxygénases microsomiques qui dépendent du cytochrome P-450 et amène à la formation d'un époxyde qui après

hydrolyse enzymatique se transforme en trans 1,2-dihydro 1,2-dihydroxy benzène et par la suite s'oxyde en catéchol.

Dans plusieurs cas, chez les levures et les champignons, la réaction initiale de la fission de l'anneau aromatique est l'insertion de deux groupes hydroxyles en position ortho l'un par rapport à l'autre (Peelen *et al.*, 1995 ; Katayama-Hirayama *et al.*, 1994). Dans le cas où le noyau aromatique contient déjà un groupe hydroxyle, un deuxième groupe hydroxyle est introduit généralement en position ortho et après oxydation, il y a formation du catéchol. La dégradation ultérieure du catéchol ou d'acide protocatéchuique (catéchol substitué) formé par l'insertion de deux groupes hydroxyles peut avoir lieu par l'une des deux voies connues sous le nom d'ortho ou de méta clivage.

- le premier type de clivage connu sous le nom d'orthoclivage, aboutit à la formation de l'acide cis-cis muconique. Par la suite, il se transforme en acide β -cétoadipique qui dans l'étape ultime se clive en acétyl-CoA et succinyl-CoA (figure 8).

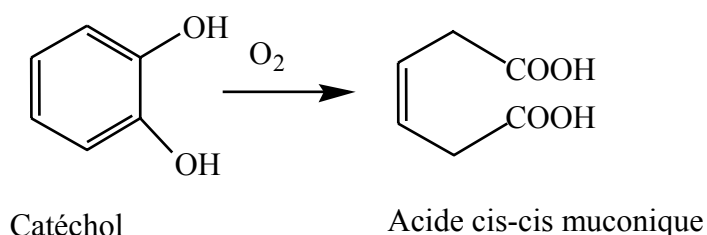


Figure 8 : Ortho-clivage du Catéchol.

Un cas similaire chez *Candida tropicalis* a été également observé par Chang *et al.* (1995) où l'activité 2-3 dioxygénase n'a pas été détectée.

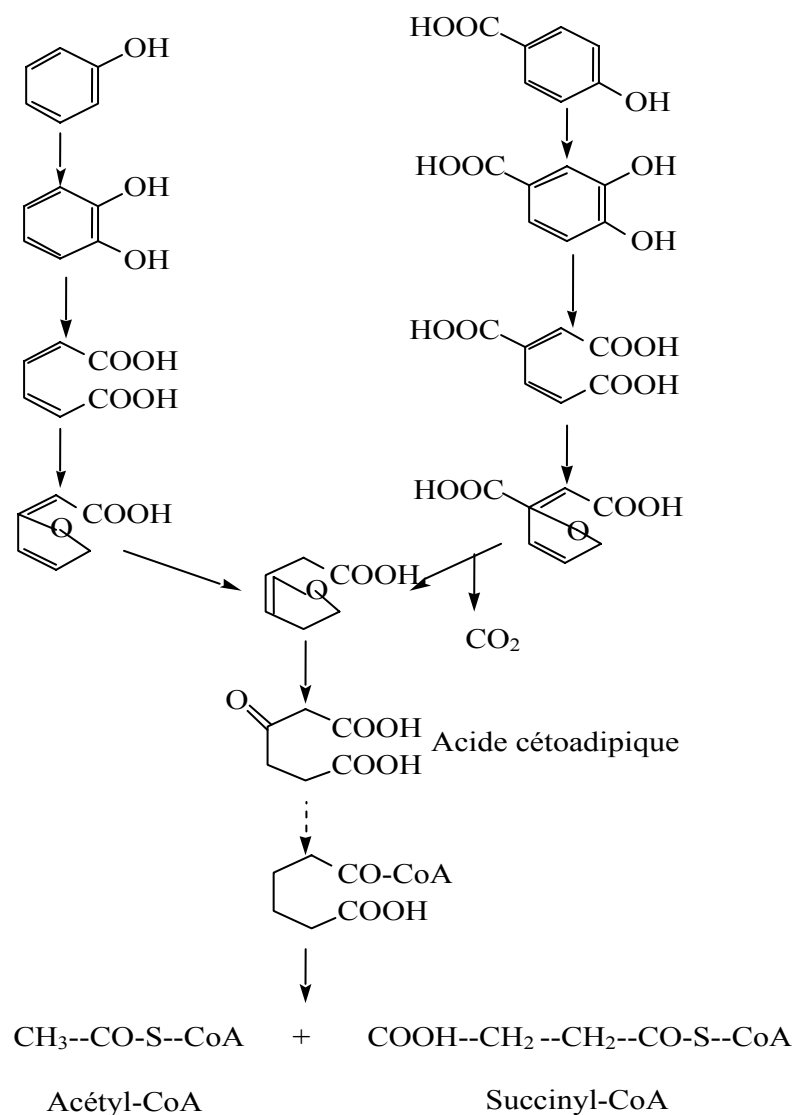


Figure 9 : Voies métaboliques de dégradation par ortho-clivage

- le deuxième type de clivage connu sous le nom de métaclivage se fait via une dioxygénase et forme l'acide 2-hydroxymuconique semi-aldéhyde (Figure 10).

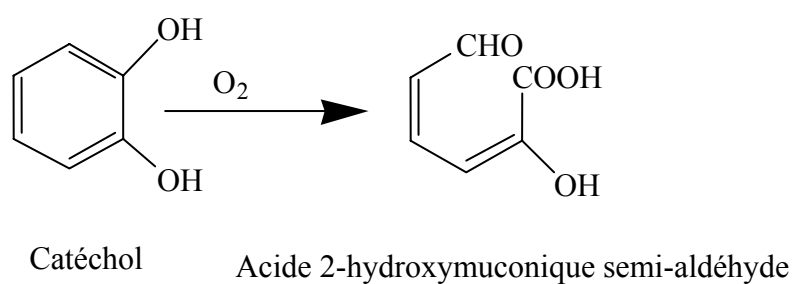


Figure 10 : Méta-clivage du Catéchol.

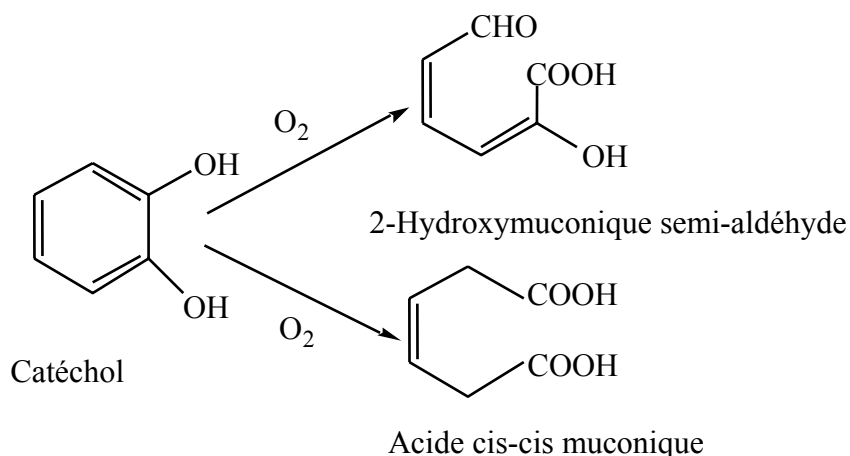


Figure 12 : Double équipements enzymatiques des bactéries du genre *Pseudomonas* impliquées dans les deux types de clivages.

Un troisième type de clivage appelé paraclivage peut être rencontré chez quelques micro-organismes. Ceci aura lieu lorsque les groupements hydroxyles sont en position para l'un par rapport à l'autre. Dans l'acide gentisique (acide 2,5-dihydroxybenzoïque), on assiste à un paraclivage oxydatif et la voie qui en découle est celle du gentisiate.

Lors de la dégradation des principaux composés aromatiques intermédiaires, le flux de carbone issu du clivage des noyaux aromatiques (dihydroxyphénols) varie selon la nature du substrat qui peut être soit le catéchol, l'acide protocatéchuique (catéchol substitué) ou l'acide gentisique comme le montre la figure 13.

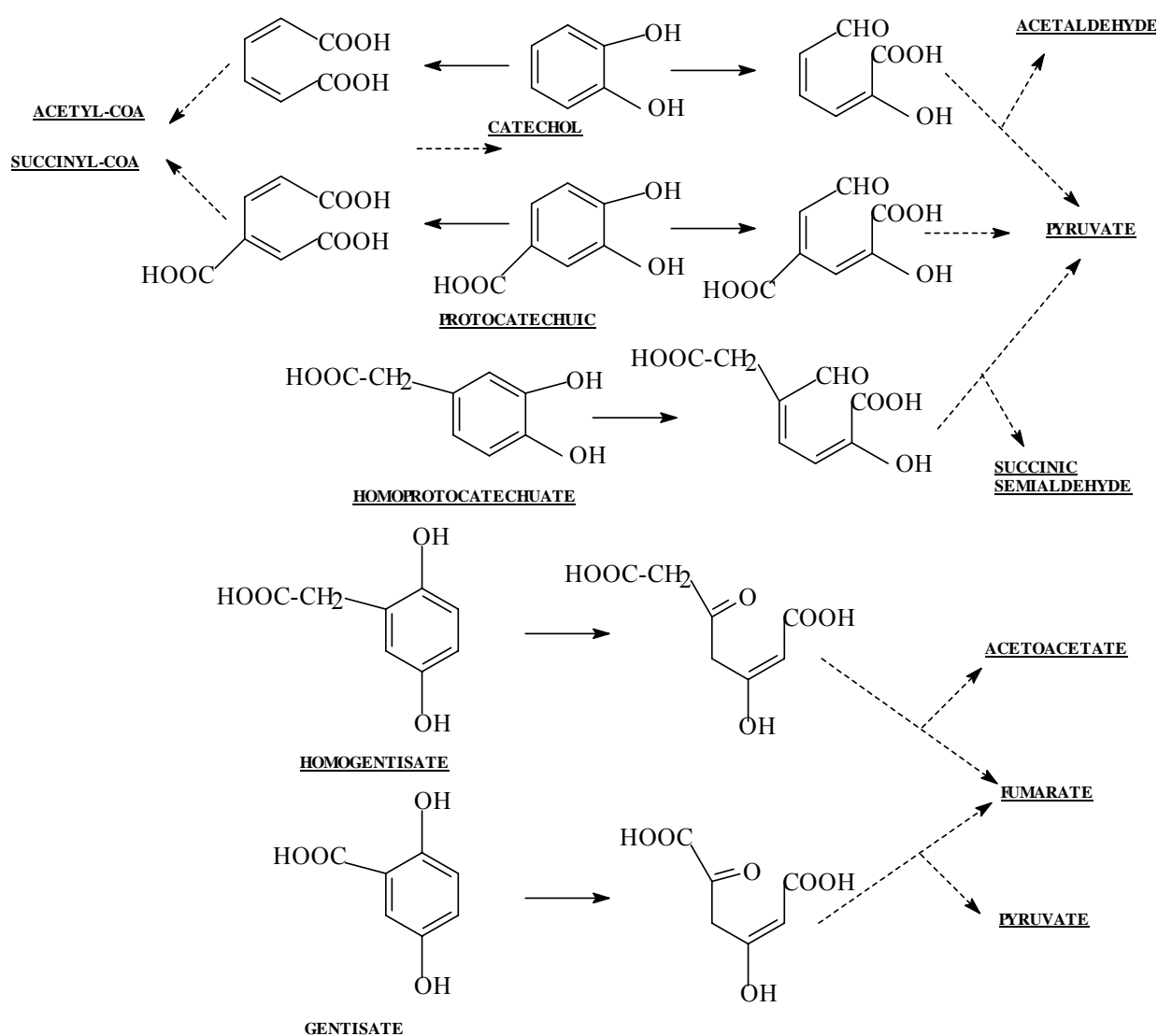


Figure 13 : Principales voies microbiennes de dégradation de plusieurs composés aromatiques rencontrés lors de la biodégradation des composés aromatiques (Dagley, 1983).

Chez les champignons, il existe d'autres voies métaboliques qui sont très diverses. Il a été démontré que chez *Trichosporon cutaneum*, le déficit en dioxygénases est compensé par l'utilisation de diverses voies métaboliques et plusieurs hydroxylases (Anderson et Dagley, 1980).

Les composés résultant du clivage des différents composés aromatiques sont ensuite complètement oxydés en CO_2 et H_2O lors de leur utilisation dans le cycle de Krebs. Durant le catabolisme aérobie des composés phénoliques, l'oxygène joue un double rôle, d'activateur au moment des hydroxylations et du clivage, et d'accepteur final des électrons issus du cycle de Krebs.

VI. 2. 6. 3. 2. Induction et répression

La concentration d'enzymes impliquées dans les voies de dégradation des composés phénoliques est contrôlée par un certain nombre de réactions d'inductions et de répressions. C'est ainsi que chez *Candida tropicalis*, la phénol hydroxylase est induite par le phénol, et elle est fortement réprimée par le glucose (chang *et al.*, 1995). Chez *Aspergillus niger*, le système enzymatique peroxysomal est fortement induit en présence des composés non glucidiques.

VI. 2. 6. 3. 3. Dégradation des lignines

Les lignines constituent 20 à 30% de bois et 5 à 15% de la plupart des produits agricoles. Un groupe de champignons basidiomycètes dégradent les lignines complètement en H₂O et CO₂ et plus rapidement que les autres groupes de micro-organismes. Plusieurs études ont montré que la lignine peroxydase et manganèse peroxydase jouent un rôle capital dans la dégradation initiale du complexe aromatique. Chez les basidiomycètes, la souche la plus étudiée est *Phanerochaete chrysosporium* (Pazzynski *et al.*, 1985 ; Sayadi et Ellouz, 1992, 1993, 1995 ; Sayadi *et al.*, 1996, 2000 ; Kahraman et Yesilada, 1999 ; Kissi *et al.*, 2001).

Les réactions catalysées par ces peroxydases en présence de H₂O₂ incluent le clivage des liaisons C-C, les hydroxylations, l'oxydation des phénols, le clivage du noyau aromatique (Sarah *et al.*, 1989) et la dépolymérisation des lignines (Hammel et Moen, 1991 ; Cullen et Kersten, 1996). Des expériences ont montré que les états excités de ces deux enzymes sont similaires à celles de la HRP (Hors Radich Peroxydase) qui sont des vraies oxygénases, mais elles sont typiques (Tien et Kirk, 1984 ; Wariishi *et al.*, 1988). Les informations fondamentales concernant la structure et la fonction de ces enzymes à l'échelle biochimique et moléculaire peuvent être orientées vers des exploitations biotechnologiques de l'environnement (Nakamoto et Machida, 1991 ; Nicell *et al.*, 1992).

VI. 2. 6. 3. 4. Distribution et rôle physiologique des oxygénases

Les oxygénases qui ont été découvertes la première fois chez les bactéries de genre *Pseudomonas* jouent un rôle ubiquiste chez les animaux, les végétaux et les microorganismes. Ce groupe d'enzymes joue un rôle important non seulement dans le métabolisme des composés aromatiques, mais aussi des composés aliphatiques simples comme les alcanes, le lactate et la lysine et la synthèse des stérols (Weete *et al.*, 1974). Thermodynamiquement, les réactions d'oxygénation apparaissent comme une perte d'énergie, cependant, elles peuvent jouer un rôle régulateur de la distribution d'énergie dans la cellule. D'ici, les oxygénases et les

hydroxylases entrent en compétition avec les systèmes cytochromes de la chaîne respiratoire pour l'oxygène.

Le clivage de certains composés aromatiques peut avoir lieu même en absence d'oxygène. Mais, la présence du groupe hydroxyle reste essentielle. El Kasmi *et al.* (1995) rapportent que l'enzyme hydroxybenzoyl-CoA réductase réduit p-hydroxybenzoyl-CoA par l'intermédiaire de deux électrons en benzoyl-CoA qui, ultérieurement sera métabolisé par la voie de dégradation des lipides.

VII. Origine de la coloration

En général, les margines sont de couleur brune-rougeâtre à noire. Cette variation de couleur est due à plusieurs facteurs (Karapinar et Worgan, 1983 ; Bambalov *et al.*, 1989W) :

- Variété et degré de maturité des olives,
- Etat de fraîcheur des margines,
- Etat de dégradation des composés phénoliques,
- Proportion relative entre les deux groupes des composés phénoliques.

Le pigment brun ou catécholamine est un polymère de nature phénolique responsable de la couleur foncée des margines. Ce polyphénol ne se trouve pas dans les olives. Il se forme au cours du broyage à partir des orthodiphénols, très abondants dans la pulpe, sous l'action des phénoloxydases. Cette enzyme est inactive dans les drupes entières (Ranalli, 1991a).

L'étude des composés phénoliques de différents échantillons de margines tunisienne a montré qu'ils contiennent pratiquement les mêmes composés phénoliques simples, mais à des concentrations variables suivant la maturité des olives et la conservation des margines (Hamdi, 1991a). Cette fraction phénolique renferme deux groupes de composés :

- Composés de poids moléculaires inférieur à $2 \cdot 10^4$ qui sont responsables de la couleur rouge violette. Ces composés correspondent aux polymères phénoliques de faibles poids moléculaires (anthocyanes, tannins). Ils renferment également une classe de composés correspondant aux monomères et oligomères phénoliques qui sont responsables de la coloration jaune masquée par la coloration rouge (Hamdi, 1993b).
- Composés phénoliques de poids moléculaire supérieur à $2 \cdot 10^4$ responsables de la coloration noire des margines. Ce sont des polymères phénoliques obtenus après

oxydation des polyphénols du premier groupe (Saez *et al.*, 1992 ; Hamdi, 1993b). Cette 2^{ème} catégorie semble constituer une forme de la lignine (pseudolignine) (Hamdi, 1993b). Donc, selon Hamdi (1993b), la couleur des margines qui varie du rouge violet foncé au noir est sous la dominance d'un groupe de composés phénoliques par rapport à l'autre. Durant le stockage des margines, il a été constaté que leur coloration devient de plus en plus noire. Ceci peut être expliqué par :

- l'oxydation des polyphénols du premier groupe qui se polymérisent et donnent les polyphénols du second groupe (Hamdi, 1993b ; Saez *et al.*, 1992).
- La biodégradation naturelle des polyphénols du premier groupe.

Ces phénomènes de biodégradation et de polymérisation des tanins et des anthocyanes ont été signalés aussi par Field et Lettinga (1991).

La décoloration des margines a été étudiée par plusieurs auteurs. Ces derniers ont constaté que le champignon *Phanerochaete chrysosporium* est capable de décolorer les margines grâce aux deux enzymes, la lignine peroxydase (LiP) et la manganèse peroxydase (MnP) (Sayadi et Ellouz, 1992, 1993, 1995 ; Sayadi *et al.*, 1996, 2000 ; Gharsallah *et al.*, 1999 ; Kahraman et Yesilada, 1999 ; Garcia Garcia *et al.*, 2000 ; Kissi *et al.*, 2001). D'autres travaux ont montré la capacité du champignon *Pleurotus ostreatus* à décolorer les margines grâce à l'enzyme phénol oxydase ou laccase (Tomati *et al.*, 1991 ; Martirani *et al.*, 1996 ; Flouri *et al.*, 1996 ; Kissi *et al.*, 2001 ; Fountoulakis *et al.*, 2002). L'effet de prétraitement des margines par *Pleurotus ostreatus* a montré ses performances lors d'un traitement anaérobie ultérieur (Fountoulakis *et al.*, 2002).

Une étude menée sur plusieurs souches de *Pleurotus sp.* a montré qu'elles sont toutes capables de croître sur les margines sans prétraitement ni ajout des nutriments (Tsioulpas *et al.*, 2002). La coloration noire des margines est devenue jaune marron avec un taux d'élimination des composés phénoliques de 76% après 15 jours d'incubation.

L'oxydation chimique représente aussi un moyen efficace pour la décoloration des margines. Flouri *et al.* (1996) ont obtenu une décoloration de 50% des margines en ajoutant 20 g.l⁻¹ du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂).

VIII. Toxicité des margines

Les margines ne sont pas toxiques pour l'homme, par contre, ces eaux paraissent avoir une certaine toxicité pour la microflore et la faune aquatique. Son indice d'inhibition relatif est de 48,1% (Ranalli, 1991a).

Les margines sont des effluents contenant plusieurs composés phénoliques qui sont responsables de leur coloration noire, et qui ont des propriétés phytotoxiques et antimicrobiens (Gonzalez, 1986 ; Moreno *et al.*, 1987 ; Ramos-Cormenzana, 1986, 1990 ; Gonzalez *et al.*, 1990 ; Capasso *et al.*, 1992 ; Sierra *et al.*, 1994 ; Pérez *et al.*, 1986, 1987, 1992, 1997 ; Ehaliotis *et al.*, 1999 ; Casa *et al.*, 2003). D'après Pérez *et al.* (1992), l'effet inhibiteur des margines est particulièrement prononcé contre la sporulation des bactéries du sol. Certains composés phénoliques comme le méthylcatéchol et le O-quinone inhibent la croissance des bactéries Gram-positives et Gram-négatives (Capasso *et al.*, 1995, Capasso, 1997), et ils agissent sur les bactéries en dénaturant leurs protéines cellulaires, en abîmant leurs membranes et en affaiblissant leur tension superficielle, ce qui augmente l'action antibactérienne (Ranalli, 1991a, 1991c).

IX. Caractérisation microbiologique des margines

Les études microbiologiques effectuées sur plusieurs échantillons de margines ont confirmé l'absence totale de micro-organismes pathogènes. Donc, ces effluents ne posent aucun problème hygiénico-sanitaire (Ranalli, 1991a). Des analyses microbiologiques ont montré que les levures et les champignons sont capables de s'y développer mieux que les bactéries (Aissam *et al.*, 2002). Ces micro-organismes supportent la salinité élevée et le pH acide caractéristiques de ces effluents, et résistent plus que les bactéries aux substances phénoliques. Parmi les levures, on trouve *Trichosporium cutaneum*, *Cryptococcus albidus* ainsi que les genres *Rhodotorula sp.*, *Candida sp.* et *Saccharomyces sp.* (Ramos-Cormenzana, 1986 ; Gharsallah, 1993 ; Aissam *et al.*, 2002 ; Fadil *et al.*, 2003). La flore fongique se compose essentiellement d'*Aspergillus flavus*, *Aspergillus candidus*, *Penicillium negricans*, et *Alternaria sp.* La flore bactérienne regroupe les bactéries qui résistent aux polyphénols particulièrement les bactéries à Gram-négatif. Le genre *Pseudomonas sp.* ainsi que *Bacillus megaterium* ont été décrits.

Une étude microbiologique menée par Mouncif *et al.* (1993a) sur les margines Marocaines a noté la présence des levures et des champignons (*Penicillium sp.*, *Aspergillus sp.*, *Geotrichum candidum*). La caractérisation microbiologique des margines de quatre

stations d'évaporation en Espagne a révélé la présence d'un nombre variable de bactéries, de levures et de champignons (Millan *et al.*, 2000).

X. Impact sur le milieu naturel

Les margines sont extrêmement chargées en matières organiques particulièrement les composés phénoliques qui exercent une activité polluante trop élevée (Saez, 1989). D'ailleurs, Ranalli (1991c) rapporte qu'un mètre cube de margines provoque une pollution égale à celle de 1 500 personnes en un jour. En effet, Ranalli (1991a) estime que le potentiel polluant de 2 litres de margines est égal à celui de 3 habitants. D'autant plus que le taux de matières en suspension est 100 fois supérieure à celui des eaux usées domestiques (Lutwin *et al.*, 1996). Cossu *et al.* (1993) ont montré également que la DCO des margines est 200 à 400 fois supérieure à celle d'une eau usée typiquement municipale. Le rejet de ces effluents dans les milieux aquatiques entraîne une diminution de la concentration en oxygène dissous. Les composés phénoliques s'oxydent facilement par l'oxygène du milieu en subissant une quinonisation, ce qui rend l'environnement irrespirable avec une asphyxie de toute vie aquatique (levis-Menzi *et al.*, 1992). Ce phénomène entraîne donc une dégradation de la qualité des eaux de surface en inhibant le développement des microorganismes spécialement les bactéries (Capasso *et al.*, 1995 ; Capasso, 1997). Par conséquent, la capacité d'autoépuration naturelle serait limitée. Une étude menée par Ranalli (1991a) a révélé que les deux espèces de poissons *Chondrostoma polylepsi* et *Ciprynus carpio* tolèrent normalement une concentration moyenne de margines à 8,8% durant 24 heures et à 6,8% durant 48 heures.

D'un autre côté, l'épandage direct des margines sur le sol est à l'origine de nuisances diverses (Fiestas Ros de Urenos, 1981). Leur pH acide, leur salinité élevée ainsi que leur abondance en composés phénoliques provoquent la destruction de la microflore du sol (Morisot et Tournier, 1986) et induisent des effets toxiques aux cultures végétales (effets herbicides). Ceci entraîne la stérilisation du sol et le déséquilibre de la symbiose entre la microflore du sol et les plantes (Dommergues, 1971 ; Morisot et Tournier, 1986).

Vu les effets toxiques des margines sur l'environnement aquatique et terrestre, des procédés d'épuration ont été adoptés afin d'éliminer ou de réduire la concentration des substances phénoliques nocives pour le milieu récepteur.

XI. Traitement 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 (Ranalli, 1991a ; Hamdi, 1993a). Plusieurs systèmes d'épuration des margines sont cités dans la littérature. Les procédés de traitement dont nous avons pris connaissance sont nombreux, et il serait difficile de les décrire dans cette synthèse bibliographique. Toutefois, les procédés de traitement envisageables pour l'élimination de la charge polluante des margines peuvent être classés selon trois catégories, et peuvent être utilisés seuls ou combinés :

- procédés physiques,
- procédés chimiques,
- procédés biologiques.

Le choix du système de traitement approprié est lié à plusieurs facteurs locaux, à savoir le système utilisé pour l'extraction d'huile, la possibilité de stockage et le rapport entre la charge produite par les huileries et la population locale (Francesco, 1993).

XI. 1. Procédés physiques

Les procédés de traitement physique des margines sont des opérations de séparation de matières minérales et organiques solubles et insolubles de leur phase aqueuse.

XI. 1. 1. Processus thermiques

XI. 1. 1. 1. Distillation

La technique de distillation des margines a été réalisée sur une installation pilote par l'office national d'assainissement de Sfax (ONAS) en 1977 après plusieurs essais au laboratoire. Le procédé adopté est celui de la distillation étagée avec une circulation naturelle pour les deux premiers étages et une circulation forcée pour le troisième. Le taux d'abattement pour les trois étages est de 90% de DCO. Cependant, le distillat est d'une DCO de 10 g d'O₂.l⁻¹ et le condensât contient des concentrations appréciables en composés volatiles. Par conséquent, un traitement complémentaire est nécessaire au distillat avant son rejet ou sa réutilisation en irrigation.

XI. 1. 1. 2. Evaporation

- *Evaporation naturelle*

L'évaporation naturelle est tributaire des conditions climatiques. En effet, elle 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 (Strom, 1989). Durant leur séjour dans les bassins d'évaporation, les margines subissent une autoépuration naturelle par une série de processus de fermentation aérobie et anaérobie. Les agents de cette biodégradation sont surtout des levures qui se trouvent à l'origine dans les olives (Aissam *et al.*, 2002). Les travaux de Cabello et Fiestas Ros de Ursinos (1981) ont montré qu'au cours de ces processus, une série de modifications est observée, elle se manifeste par :

- une faible variation des microorganismes dépendant de la température ambiante et de la profondeur des bassins,
- une diminution de la matière organique n'intervenant que pendant le premier mois du séjour,
- une légère modification du pH.

D'autres critères ont été signalés par Balice *et al.*, (1986), notamment une diminution progressive de la quantité de matières organiques solubles, tels que les tannins. Par contre, la quantité des matières en suspension décroît rapidement durant les deux premiers mois du stockage. Cependant, il s'est avéré que ce système présente plusieurs inconvénients, tels que :

- problèmes d'esthétiques et odeurs nauséabondes,
- faible biodégradation,
- formation d'une pellicule lipidique étanche à la surface qui entrave la pénétration de la lumière et limite l'évaporation naturelle,
- énorme modification du bilan hydrique de la station par une variation de la pluviométrie (Lutwin *et al.*, 1996 ; Annaki *et al.*, 1999a).

La faible biodégradation est compensée par l'augmentation de la surface des bassins d'évaporation. Cette compensation est traduite par l'occupation de grandes surfaces de terrain qui sont relativement difficiles à aménager dans les zones peuplées.

Ainsi, en essayant d'éviter une pollution hydrique, on risque d'entraîner une pollution atmosphérique par dégagement d'odeurs fétides (Hamdi, 1993a).

- *Evaporation forcée*

Pour pallier les problèmes de l'évaporation naturelle, Fiestas Ros de Ursinos et Borja (1992) ont introduit des panneaux évaporateurs dans les bassins de stockage des margines. Ainsi, elles sont pompées puis projetées par des asperseurs sur les panneaux juxtaposés, ayant une importante surface d'échange d'air. Cette installation permet de faciliter l'évaporation de la phase aqueuse des margines de 100 à 300 m²/m³ du bassin. Cette technique est basée sur la différence du potentiel hydrique entre les mailles des panneaux et l'eau. La déshydratation des margines est donc plus facile par arrosage sur un élément générateur de la surface exposé au vent. Cette méthode a l'avantage d'utiliser une superficie réduite des bassins d'évaporation et permet de multiplier par 40 à 100 fois la quantité d'eau par m³ occupé du sol. Tandis que, les huiles et les graisses sont récupérées manuellement. Parmi les inconvénients de cette méthode; le dégagement de mauvaises odeurs et l'importance du coût d'énergie dépensée.

- *Concentration thermique*

Ce procédé physique consiste à une évaporation forcée qui favorise l'élévation du taux de matière sèche des margines à environ 70% (Fiestas Ros de Ursinos et Borja, 1992).

Des études d'épuration par ce processus ont été menées par Amirante et Montervino (1996) dans une station pilote dont le débit est de 1 m³.h⁻¹. Ces essais ont confirmé la crédibilité de l'épuration des margines. L'eau distillée séparée avait une DCO moyenne égale à 1500 - 2000 ppm et le concentré obtenu avait une humidité d'environ 50 à 60% et une teneur élevée en carbone, potassium et azote.

XI. 1. 1. 3. Séchage

Le procédé décrit par Ranalli (1991b) consiste en un séchoir rotatif à axe horizontal qui utilise les noyaux broyés ou les grignons asséchés comme combustible. Le séchage est assuré par les fumées issues de la chambre de combustion. A l'aide d'un ventilateur, ces fumées sont dépoussiérées dans un cyclone puis refoulées vers une cheminée. L'ensemble est séché à environ 100°C. Ce séchage apporte un accroissement d'environ 1% de la teneur en huile.

Ce procédé a été également amélioré par d'autres techniques, notamment l'addition de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 6% au mélange (margines + grignons) suivi d'un séchage à fond et d'une extraction de l'huile par l'hexane (Vaccarino *et al.*, 1986).

XI. 1. 1. 4. Incinération

Ce procédé permet d'évaporer d'abord la phase aqueuse des margines et de brûler ensuite les matières organiques. Ces dernières forment le pouvoir calorifique et cèdent ainsi la chaleur nécessaire à l'incinération. Les margines sont nébulisées à l'aide d'une buse spéciale, et introduites dans un four où elles seront évaporées et le résidu solide sera transformé en cendres avec production de chaleur. L'énergie nécessaire au système est obtenue par combustion de grignon (Ranalli, 1991b).

Un système d'incinération a été conçu en 1981 en Italie impliquant la construction d'une usine modulaire pour traiter les margines (Baccioni, 1981). Celles-ci subissent une centrifugation, puis une incinération par des échanges thermiques à haute température s'élevant jusqu'à 750-850°C grâce à la condensation des gaz de combustion.

XI. 1. 2. Techniques membranaires

Les margines peuvent être aussi traitées par des techniques membranaires. Ces processus se basent sur l'utilisation de membranes de filtration qui permettent la séparation des substances dissoutes selon la taille des particules et la charge électrique.

XI. 1. 2. 1. Ultrafiltration

Ce procédé repose sur la filtration à travers une membrane permettant la rétention de macromolécules de masse moléculaire supérieure à 500. La séparation se fait sous l'effet d'un gradient de pression de 3 à 10 bar. C'est une technique qui est actuellement appliquée à l'échelle industrielle pour le traitement des margines. Les tests d'ultrafiltration ont donné un liquide limpide (Reimers, 1983 ; Renzo et Amirante, 1988 ; Ranalli, 1991a).

XI. 1. 2. 2. Osmose inverse

L'osmose inverse permet de séparer une solution en deux phases : l'une concentrée et l'autre diluée sous une pression allant jusqu'à 80 bar. Des essais de traitement des margines ont été réalisés par cette technique (Reimers, 1983 ; Renzo et Amirante, 1988), les margines obtenues étaient limpides et incolores (Ranalli, 1991a).

XI. 1. 2. 3. Electrodialyse

L'électrodialyse est un procédé électro-membranaire fondé sur la dissociation des molécules ionisées en les transférant à travers des membranes échangeuses d'ions sous l'effet d'un champ électrique. Cette technique est utilisée pour la récupération des composés phénoliques des margines (Ranalli, 1991a), ou pour la réduction de leur contenu en ces composés afin de faciliter le traitement biologique ultérieur (Longhi *et al.*, 2001).

L'application de ces processus membranaires présente un certain nombre d'avantages :

- une faible consommation d'énergie,
- un très haut degré de purification par une meilleure réduction via l'ultrafiltration et une diminution quasi-totale de la charge polluante par osmose inverse,
- un rétablissement de matières premières sans qu'elles soient contaminées par des agents chimiques (Buldini *et al.*, 2000),
- possibilité d'associer à l'épuration des margines, la récupération des produits d'intérêt commercial,
- une flexibilité d'exploitation.

Cependant, ces procédés de filtration présentent certains inconvénients tels que :

- insuffisance de perméabilité et entassement des membranes,
- formation d'une couche de polarisation sur la membrane qui se traduit par des difficultés de fonctionnement en continu,
- coûts élevés d'investissements et d'exploitations à cause de la forte teneur des margines en matières en suspension et de la viscosité.

Bien que le problème de traitement des margines soit partiellement résolu par les procédés physiques, certains inconvénients peuvent limiter leur utilisation; notamment l'apparition d'une forte pollution solide à la fin de cette opération et le coût élevé des installations.

XI. 2. Procédés chimiques

Le traitement chimique des margines est réalisé afin de réduire l'intensité de leur coloration (Chamrani, 1994 ; Balice *et al.*, 1997). Il peut être utilisé en tant que prétraitement ou traitement de finition après épuration biologique. Ces techniques sont basées généralement sur les phénomènes de coagulation-floculation ou d'adsorption.

XI. 2. 1. Coagulation-floculation

La coagulation est l'une des 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 type de traitement reste le plus global et certainement le moins coûteux par rapport à la masse de matières éliminées (Castillo-Rivera, 1999). Fiestas Ros de Ursinos (1958) 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% (Mendia et Procino, 1964 ; Beccari *et al.*, 1999). Ce processus peut être utilisé après traitement biologique pour éliminer les matières en suspension et les polluants résiduels (Fiestas Ros de Ursinos et Borja, 1992).

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.

XI. 2. 2. Adsorption

L'adsorbant le plus communément utilisé pour éliminer les polluants organiques des eaux résiduaires 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. D'autant plus que l'adsorption sur charbon actif est généralement limitée pour l'élimination des substances non polaires (Diamadopoulos *et al.*, 1992). Ainsi, d'autres adsorbants organiques et inorganiques de substitution ont été étudiés ces dernières années. Beccari *et al.*, (1999) ont montré que le prétraitement des margines par adsorption sur bentonites permet d'obtenir une bonne réduction de la DCO allant jusqu'à 61,6% à pH 6,5.

Oukili *et al.*, (2001) ont utilisé aussi ce processus d'adsorption sur des argiles de Fès. Ils ont obtenu après optimisation du système un taux d'abattement de la DCO de l'ordre de 86%. Ce même procédé a été réalisé par Al-Malah *et al.* (2000) sur une argile activée (bentonite jordanienne), les pourcentages d'élimination des polyphénols et de la DCO sont de l'ordre de

81% et 71% respectivement. La réalisation de ce procédé à grande échelle rencontre plusieurs difficultés, vu l'importance de la quantité d'argiles utilisée.

Vu la forte charge organique contenue dans les margines, ces procédés chimiques nécessitent généralement l'ajout de grandes quantités de réactifs. Ce qui pose le problème de la production des boues putrescibles et du coût élevé des réactifs.

XI. 3. Procédés biologiques

La biodégradation pourrait être définie comme étant la décomposition de la matière par le biais d'un agent biologique en particulier, les micro-organismes. Ces derniers jouent un rôle très important dans le processus de dépollution et permettent la réduction de la toxicité des éléments polluants engendrés par l'activité naturelle ou humaine (Ranalli, 1991a).

La dégradation biologique à l'opposé des procédés physico-chimiques est considérée comme une méthode plus saine, efficace et moins coûteuse pour la réduction des polluants (Hamdi, 1993a ; Hamdi, 1993c).

XI. 3. 1. Traitement anaérobie des margines

La fermentation anaérobie peut être utilisée comme un moyen de traitement et d'exploitation des margines (Antonacci *et al.*, 1981 ; Fiestas Ros de Ursinos *et al.*, 1982 ; Vaccarino *et al.*, 1986 ; Hamdi et Garcia, 1991 ; Martin *et al.*, 1991, 1994 ; Hamdi et Garcia, 1993 ; Hamdi et Ellouz, 1993 ; Borja *et al.*, 1993, 1994a, 1994b, 1995c ; Beccari *et al.*, 1996, 1998, 1999, 2000 ; Ergüder *et al.*, 2000 ; Fountoulakis *et al.*, 2002). 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 (Anderson *et al.*, 1977). 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.

Selon Martin *et al.* (1991), la digestion anaérobie est performante, elle permet une réduction de la DCO de l'ordre de 70% à 85%. Son rendement est proportionnel à la

concentration des micro-organismes et varie largement avec la nature du support (montmorillonite ou sepiolite) (Martin *et al.*, 1991). Di Gioia *et al.* (2001b) ont montré que la co-culture des deux bactéries *Ralstonia sp* et *Pseudomonas putida* en anaérobiose a permis la dégradation de 7 parmi 9 composés aromatiques monocycliques présents dans les margines.

Le problème majeur rencontré lors du traitement anaérobie des margines par la majorité des chercheurs est le démarrage de leurs digesteurs. En effet, la stabilité de ces derniers est très longue si les margines sont très concentrées. Ces problèmes pourraient être épargnés en diluant les margines et en ajoutant l'urée comme source d'azote (Hamdi, 1993a ; Boari *et al.*, 1984).

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

XI. 3. 1. 1. Digesteurs contact

Ils peuvent également être définis comme les boues activées anaérobies. Ils ont été testés par plusieurs auteurs (Antomacci *et al.*, 1981 ; Fiestas Ros de Ursinos *et al.*, 1982 ; Aveni, 1984). Un abattement important de la matière organique (80-85% de DCO) a été obtenu lors du traitement des margines dans une installation pilote pour un temps de rétention de 20-25 jours (Martin *et al.*, 1991). La production de méthane a été de 60-70%. L'efficacité de ce système est variable. Les résultats non satisfaisants sont dus à l'agitation mécanique excessive de la matière organique introduite dans le digesteur. Ce qui favorise le développement d'une flore acétogène à la place des bactéries méthanogènes (Boari *et al.*, 1984 ; Hamdi et Garcia, 1991).

XI. 3. 1. 2. Lit de boues à flux ascendant (UASB)

Ce processus a été développé pour la première fois en Hollande (Lettinga *et al.*, 1980). Puisque la pollution contenue dans les margines est principalement soluble et colloïdale (90%), ce procédé UASB a donné de meilleurs résultats par rapport aux autres procédés anaérobies (Boari *et al.*, 1984). Le problème principal rencontré était la formation de mousse liée à la surcharge organique des margines pendant le démarrage. Ce problème a été résolu par dilution de margines et augmentation de la teneur en azote (DCO/N de 170/1).

XI. 3. 1. 3. Lit de boues à filtre anaérobie

Le principe de ce traitement est la tendance des micro-organismes anaérobies à se fixer aux matériaux inertes en suspension (le sable, le carbone en poudre, les silicates...). Ce qui permet d'éviter la perte de micro-organismes qui peuvent atteindre des temps de résidence élevés. Ainsi, l'épuration est réalisée grâce à la forte concentration en bactéries.

Les rendements de la production du méthane obtenus avec les filtres anaérobies traitant les margines ont été très proches des valeurs théoriques (Rigoni-Stern *et al.*, 1988). En effet, la méthanisation par le filtre anaérobie permet un démarrage plus court et une meilleure stabilité que celle du processus contact-anaérobie (Hamdi et Garcia, 1991).

Malheureusement, les résultats du traitement anaérobie restent toujours non satisfaisants, puisque une fraction considérable de composés phénoliques persiste dans l'effluent traité (Borja *et al.*, 1995b ; Beccari *et al.*, 1996, 1998). Cette digestion anaérobie peut être inhibée par les acides gras à chaîne longue, notamment l'acide oléique (Koster et Cramer, 1980). De même, à partir d'une concentration de 100 mg.l⁻¹ d'acide phénolique dans les margines, les bactéries méthanogènes sont inhibées (Hamdi *et al.*, 1991b).

XI. 3. 2. Traitement aérobie des margines

Plusieurs études ont été réalisées sur le traitement aérobie des margines, par des cultures pures de micro-organismes tels que *Aspergillus niger*, *Azotobacter chroococcum*, *Azotobacter vinelandii*, *Aspergillus terreus*, *Phanerochaete chrysosporium* et *Pleurotus ostreatus* (Hamdi *et al.*, 1991b, 1991c ; Sayadi et Ellouz, 1992, 1993, 1995 ; Martirani *et al.*, 1996 ; Sayadi *et al.*, 1996, 2000 ; Fiorelli *et al.*, 1996 ; Ehaliotis *et al.*, 1999 ; Gharsallah *et al.*, 1999 ; Kahraman et Yesilada, 1999 ; Piperidou *et al.*, 2000 ; Garcia Garcia *et al.*, 2000 ; Kissi *et al.*, 2001 ; Pozo *et al.*, 2002 ; Garrido Hoyos *et al.*, 2002 ; Fountoulakis *et al.*, 2002). Les tests de toxicité réalisés sur les microtox et sur la germination de quelques plantes ont montré une diminution de la toxicité des margines traitées par ces micro-organismes (Hamdi *et al.*, 1993b ; Martirani *et al.*, 1996 ; Ehaliotis *et al.*, 1999 ; Kissi *et al.*, 2001).

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 (Borja *et al.*, 1995c).

Saiz-Jiménez *et al.* (1986) ont étudié le traitement aérobique des margines, et ils ont beaucoup insisté sur le problème de l'inhibition posé par les composés phénoliques. Ainsi, Balice *et al.* (1988) ont recommandé la dilution de l'effluent 70 fois avec de l'eau de robinet lors du traitement avec les boues activées. Durant ce traitement, un mélange de micro-organismes à l'état de floculation est soumis en culture dans les margines. Les flocs sont généralement composés de bactéries et de protozoaires dont les ciliés jouent un rôle important.

Hamdi *et al.* (1991b, 1991c) ont étudié le prétraitement des margines par *Aspergillus niger* afin de réduire leur effet inhibiteur vis-à-vis des bactéries méthanogènes. Des taux d'abattement de 60% et de 58% pour la DCO et les composés phénoliques ont été enregistrés respectivement. Les margines prétraitées ont subi ensuite une digestion anaérobie.

Martinez *et al.* (1992) ont également étudié la dégradation aérobique des composés phénoliques par *Aspergillus terreus* sur des margines filtrées, stérilisées et diluées à différentes concentrations. Cette étude a montré que l'efficacité du traitement par cette souche diminue lorsque les margines sont de plus en plus concentrées. Garrido Hoyos *et al.* (2002) ont obtenu une élimination de 65,77% de la DCO des margines traitées en aérobiose avec la même souche.

Sayadi et Ellouz (1992, 1993, 1995) ont étudié la possibilité de traiter les margines en aérobiose avec un champignon *Phanerochaete chrysosporium*. Comme les margines présentent un déficit notamment en matière azotée, ces auteurs ont procédé à l'ajout des nutriments. Après optimisation du milieu de culture (margines), cette étude a révélé que l'ajout du veratryl alcool induit l'activation du système ligninolytique qui joue un rôle principal dans la dégradation des composés phénoliques des margines. Par conséquent, ils ont obtenu environ 74% de décoloration des margines.

La biodégradabilité des margines par *Funalia troggi* permet d'éliminer 70% de la DCO et 93% des phénols, alors que *Coriolus versicolor* permet une réduction de 63% de la DCO et 90% des phénols pour une DCO initiale de 28,20 g d'O₂.l⁻¹ (Yesilada *et al.*, 1995, 1998).

Vinciguerra *et al.* (1995) ont étudié le traitement aérobique des margines par *Leutinus edodes*. Un taux d'élimination de 75% du carbone organique total (COT), une réduction de 66% des phénols totaux et une décoloration de l'ordre de 45% après 4 jours d'incubation ont été enregistrés.

Le traitement par des consortiums de bactéries aérobies obtenus par enrichissement sur les margines a permis la dégradation des composés mono-aromatiques des margines non diluées. Neuf de ces souches bactériennes ont été isolées et testées pour leur croissance et leur

capacité de dégradation des composés aromatiques. Différentes combinaisons donnent une réduction de 50% de la DCO initiale, et une dégradation de presque tous les composés aromatiques simples (Zouari et Ellouz, 1996).

Robles *et al.* (2000) ont isolé à partir des margines des souches de *Penicillium sp.* capables de dégrader les polyphénols et de produire la biomasse à partir des margines brutes (DCO : 120 g d'O₂.l⁻¹). Les résultats enregistrent un taux de réduction de la DCO qui se situent entre 61,82% et 74,75%.

La co-culture des souches de bactéries *Ralstonia sp.* et *Pseudomonas putida* a révélé leur capacité de dégrader en conditions aérobies les composés aromatiques monocycliques présents dans les margines (Di Gioia *et al.*, 2001a ; Bertin *et al.*, 2001).

Au Maroc, le traitement aérobique 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 (Zenjari *et al.*, 1999). Kissi *et al.* (2001) ont montré l'efficacité du traitement aérobique des margines par *Phanerochaete chrysosporium*. Les résultats de cette étude ont révélé des taux d'abattement de la DCO et des polyphénols de l'ordre de 73% et 83% respectivement après 12 jours d'incubation pour une DCO initiale de 50 g d'O₂.l⁻¹. Une élimination de la DCO de l'ordre de 55%, 52,5% et 62,8% a été obtenue avec des margines traitées en aérobiose par *Geotrichum sp.*, *Aspergillus sp.* et *Candida tropicalis* respectivement (Fadil *et al.*, 2003).

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 (Ranalli, 1991a). Ceci est dû en grande partie à la présence de fortes charges organiques polluantes représentées particulièrement par les composés phénoliques. Ces composés constituent des inhibiteurs de la flore microbienne responsable de la biodégradation (Borja *et al.*, 1994a ; Beccari *et al.*, 1996 ; Yesilada et Sam, 1998). Le traitement biologique des margines en plusieurs étapes s'avère nécessaire pour obtenir un meilleur rendement épuratoire (Ranalli, 1991a, 1992 ; Hamdi, 1993a).

XI. 4. Procédés combinés

Les margines ne peuvent être traitées par un simple procédé biologique, physique ou chimique. Une série de traitements s'avère nécessaire pour réduire la forte concentration en DCO et la toxicité de ces effluents. Les procédés combinés les plus importants sont les suivants :

XI. 4. 1. Procédé physique en série

Un procédé de traitement des margines par ultrafiltration et osmose inverse a été développé et breveté par Cova (1988) selon la récente législation Italienne. Les margines sont d'abord rassemblées dans de grands bassins de stockage. Après avoir éliminé les gros éléments solides, l'eau subie une ultrafiltration pour la séparation complète des particules solides de la fraction colloïdale et des molécules organiques ayant un haut poids moléculaire. Les eaux sont ensuite partiellement épurées et leur DCO est réduite de 50 à 75%. Ensuite, les eaux sont traitées par des résines échangeuses d'ions qui absorbent les composés phénoliques présents dans la solution concentrée. A la dernière étape du traitement, l'eau est soumise à une session d'osmose inverse pour avoir une eau parfaitement purifiée et décolorée. Ce procédé permet d'obtenir 70% d'eau traitée, 27% de concentré solide et 3% d'une solution concentrée de polyphénols. Cette solution pourrait être utilisée comme colorant ou comme anti-oxydant naturel.

XI. 4. 2. Procédés physiques et biologiques

Ce type de traitement a été exclusivement développé en Italie durant les années quatre-vingt. Dans la majorité des cas, les procédés de traitement biologique par boues activées ou par les champignons sont toujours appliqués dans la phase liquide récupérée après traitement physique comme la distillation, la concentration, la filtration ou l'ultrafiltration (Tableau 15).

Tableau 15 : Procédés physiques et biologiques de traitement des margines (Bastista et Giorgio, 1988).

Procédé	Constructeur	Année	Nombre d'installation
Filtration-Distillation Aérobiose	ITALIA-DEPURATORI	1987	26
Coagulation-Aérobiose	SERNAGIOTO	1980	2
Evaporation-Aérobiose	FIAT-ENGINEERING	1983	2
Distillation-Aérobiose	STILMAS	1983	2
Microaérobiose	TECHNOSIS	1986	1
Anaérobiose-Aérobiose Floculation-Sédimentation	AMENDUNI	1986	1
Ultrafiltration-Aérobiose	ENEA	1986	1
Aérobiose-Concentration Solaire	BALAFUR-ITALIA	1986	1
Ultrafiltration-Aérobiose Anaérobiose-Clarification	CONTRETAT	1986	1
Distillation-Aérobiose	MTC	1987	1
Ultrafiltration-Aérobiose	ENICHEM	1987	13
Filtration-Osmose inverse Aérobiose	METALART	1988	3

Procédé Fernando-Saro company

Les margines sont additionnées à des floculants et des coagulants en doses appropriées. Après séparation des boues, le surnageant obtenu est complété par des nutriments minéraux puis neutralisé par une solution basique. Ensuite, une fermentation aérobie et une séparation des boues par centrifugation sont réalisées. L'ultrafiltration et l'osmose inverse sont deux étapes finales du traitement (Fiestas Ros de Ursinos et Borja, 1992).

- En Espagne, Le processus réalisé par Balice *et al.*, (1997) consiste à ajouter en continu des polyélectrolytes aux margines et la solution obtenue est filtrée sous pression réduite. Après correction du pH, le filtrat est traité en aérobiose. Les taux de réduction de la DCO sont de 76% pour le traitement physique et 22,5% pour le traitement biologique. Ce traitement donne de bons résultats mais le coût d'installation est onéreux.

XI. 4. 3. Procédé biologique et physico-chimique

Plusieurs procédés appliqués dans différentes installations de traitement des margines ont été décrits par Ranalli (1991a, 1991b). Parmi lesquels, nous citons celui de Ranalli :

Procédé Ranalli : il est basé sur l'emploi de souches microbiennes sélectionnées (Ranalli, 1989). Après neutralisation du pH, les margines subissent une correction du rapport C/N/P afin d'avoir un rapport final de 100/10/2. Ensuite, les composés phénoliques sont oxydés par l'acide Caro pour réduire la DCO. Les margines sont filtrées pour éliminer leurs matières en suspension et leurs émulsions huileuses. Le traitement biologique est effectué par une culture appelée SNKD contenant 83 souches microbiennes. La flore prédominante appartient aux genres *Azotomonas*, *Bacillus*, *Bacterium*, *Candida*, *Cladosporium*, *Clostridium*, *Endomycopsis*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Saccharomyces*, *Streptomyces* et *Basidiomycètes*. Le traitement par cette culture mixte révèle un taux de réduction de 83% pour une DCO initiale de 43 g d'O₂.l⁻¹ après 14 jours d'incubation.

XI. 4. 4. Procédé physico-chimique

Oukili *et al.* (2001) ont mis au point un procédé de traitement physico-chimique des margines par technique d'adsorption et d'oxydation. Ce procédé consiste à ajouter 7% de sol argileux et 0,5% de peroxyde d'oxygène. Après 24 heures de contact, l'effluent obtenu est de couleur jaune pâle, avec des taux d'abattement de 87% des polyphénols et de 66% de la DCO.

Le tableau 16 montre une évaluation approximative du coût et de la consommation d'énergie de certains processus utilisés pour le traitement des margines.

Tableau 16 : Evaluation des processus de traitement des margines (Hamdi, 1993a).

Traitement	Coût capital (US\$ / m ³)	Energie		Concentrât cendre / boue (kg / m ³)
		Electrique (kWh / m ³)	Thermique (kWh / m ³)	
Incineration	5×10^3	8	670	2 MS
Distillation	$1,1 \times 10^4$	20	730	90 MS
Boues activées	2×10^4	30	-	30 MV
Digestion anaérobie	4×10^3	< 1	<200-240	10 MV

MS : matière sèche.

MV : matière volatile.

Le traitement des margines par incinération ou distillation est efficace mais onéreux. Le coût du traitement par boues activées est 5 fois plus élevé que celui par digestion anaérobie, en raison de la consommation élevée d'énergie mécanique (tableau 16).

XII. 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 (Fiestas Ros de Ursinos, 1981). 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 (Levis-Menzi *et al.*, 1992).

XII. 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 (Nefzaoui, 1987 ; Loulan et Thelier, 1987). Le tableau 17 résume les principaux travaux menés sur ce type de valorisation.

Tableau 17 : Performances des procédés de méthanisation appliqués aux margines.

Procédés	Volume (l)	Charge (g DCO /R-J)	Efficacité	Références
Contact	2600	1,55	70	Antonacci <i>et al.</i> , 1981
	70000	2,55	80	Fiestats Ros de Ursinos <i>et al.</i> , 1982
UASB	15	16,00	70	Boari <i>et al.</i> , 1984
	5000	16,00	70	Boari <i>et al.</i> , 1984
	20	15,40	70	Balice <i>et al.</i> , 1988
HAUSBUF	19,7	190,00	40	Tsonis et Grigoropoulos, 1988
Filtre aérobic	21	2,800	83	Rigoni-Stern <i>et al.</i> , 1988
	300	8,00	87	Rigoni-Stern <i>et al.</i> , 1988
	10	2,50	60	Rozzi <i>et al.</i> , 1989
	10	2,50	55	Rozzi <i>et al.</i> , 1989
	11	3,00	65	Rozzi <i>et al.</i> , 1989
	11	3,00	60	Rozzi <i>et al.</i> , 1989

La production de biogaz par digestion anaérobie des margines a été étudiée par Mouncif *et al.* (1993b). La réduction de la DCO et le taux de biogaz produit ont atteint respectivement 42% et 207 l.kg⁻¹ de matière organique digérée. Ergüder *et al.* (2000) ont montré que le traitement anaérobie d'un litre de margines permet un rendement élevé de l'ordre de 85,4 à 93,4% et une production de 57,1 l ($\pm 1,5$) de gaz méthanique.

XII. 2. Compostage des margines

Les margines peuvent être utilisées pour obtenir un compost fertilisant pour les sols (Papadimitriou *et al.*, 1997). Le compostage des margines a été réalisé traditionnellement en Espagne dans des bassins d'évaporation (Fiestas Ros de Ursinos, 1981 ; Fiestas Ros de Ursinos et Borja, 1992). 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 en phosphore et en potassium contrairement aux résidus solides urbains. Tomati et Galli (1992) ; Galli *et al.* (1994) ont 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. La composition du produit final obtenu est reportée dans le tableau 18.

Tableau 18 : Composition physico-chimique du compost final (Galli *et al.*, 1994).

Azote total	3,10%	Humidité	37,30%
P₂O₅	1,40%	Taux d'humidification	41,60%
K₂O₅	2,10%	Degré d'humidification	78,20%
MgO	1,30%	Index d'humidification	0,28
CaO	1,90%	Taux de rétention de l'eau	195%
Fe	0,50%	Poids spécifique	0,345 kg.dm ⁻³
Zn	200 mg.l ⁻¹	Conductivité électrique	9,56 ms.cm ⁻¹
Mn	200 mg.l ⁻¹	Index de germination	75%
Métaux lourds	< 1 mg.l ⁻¹	C/N	11,5

Piperidou *et al.* (2000) ont développé un système de biofertilisation qui exploite la capacité de la souche *Azotobacter vinelandii* à croître sur les margines et à les transformer en un liquide organique fertilisant. Des taux de rendement élevé de l'ordre de 90-96% ont été obtenus après 3-7 jours de traitement respectivement.

Capasso *et al.* (2002b) ont extrait à partir des margines des polymères contenant des ions minéraux et ont testé leur effet sur la croissance des tomates. Les résultats ont révélé que les polymères solubles et leurs dérivés ont un effet toxique et la plante se fane et se dessèche après quelques jours.

Zenjari (2000) a étudié un procédé de compostage en mélangeant les margines avec les déchets cellulotiques (la paille). Le compost obtenu est stable et riche en substances humiques, avec une réduction de 50% et 95% de la DCO et des phénols totaux respectivement.

XII. 3. Production des protéines d'organismes unicellulaires (POU)

Grâce à leur richesse en matières organiques, les margines représentent un substrat nutritif pour la production des POU qui peuvent être transformées en fourrage. Yazsioglu *et al.* (1978) ont prouvé que de nombreux micro-organismes donnent des taux en protéines non négligeables sur les margines (tableau 19).

Tableau 19 : Micro-organismes utilisés pour la production des POU sur les margines (Yazcioglu et Celikkol, 1978).

Micro-organisme	Biomasse (g.l⁻¹)	Protéines (g.l⁻¹)
<i>T. magnoliac</i>	31	11,6
<i>R. glutinis</i>	21	8,84
<i>F. manoliiforma M4</i>	21	8,36
<i>T. utilis</i>	21	7,18
<i>M. pusilis</i>	17	6,6

Fiestas Ros De Ursinos (1961, 1966, 1981) a étudié la croissance de *Torulopsis utilis* sur les margines à l'échelle industrielle en vue de produire des POU. Il a démontré que cette levure est capable d'assimiler une grande variété de composés renfermant du carbone et de l'azote. De ce fait, ce type de traitement permet non seulement une production des POU mais aussi une réduction considérable des substances organiques initiales.

La culture aérobie de levures sur les margines pour la production des POU a été testée en raison de la facilité de leur culture et de leur teneur élevée en protéines. Les principaux travaux de production de levures-aliments sont reportés dans le tableau 20.

Tableau 20 : Utilisation des levures pour la production de POU à partir des margines.

Souche	Biomasse (g.l ⁻¹)	Référence
<i>Torulopsis utilis</i>	13	Fiestas Ros de Ursinos, 1981
<i>Saccharomyces lipolitica</i>	18-26	Ercoli et Ertola, 1983
<i>Saccharomyces</i> et <i>Candida</i>	20-26	Giulietti <i>et al.</i> , 1984
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30	Loulan et Thelie, 1987

Gharsallah (1993) a étudié la production des POU sur les margines par trois souches de levures *Candida krusei*, *Saccharomyces chevalerie* et *Saccharomyces rouxii*. Une concentration en protéines de 3,35 g.l⁻¹ et un rendement de 0,45 g de biomasse par g de glucose sont obtenus par *Saccharomyces rouxii*.

Florenzano et Balloni (1983) ont utilisé les margines comme substrat pour la croissance de *Candida utilis* avec une production de levures contenant 40% des protéines, *Candida tropicalis*, des bactéries photosynthétiques (*Ehodospiralles*) et des cyanobactéries.

Les champignons *Aspergillus sp.* et *Geotrichum candidum* ont été également testés (Vaccarino *et al.*, 1986). Les résultats ont révélé que la biomasse obtenue est très digestible, présentant une teneur en protéine brute de l'ordre de 30% potentiellement utilisable pour l'alimentation des ruminants.

Parmi les germes utilisés pour la production des POU, les champignons semblent les meilleurs (Gharsallah, 1993). La synthèse des protéines est limitée chez les levures à cause de la fixation des composés phénoliques sur la biomasse (Amat *et al.*, 1986).

XII. 4. Production d'enzymes

Les margines peuvent servir aussi comme milieu favorable pour la production d'enzymes par des micro-organismes. La culture de *Cryptococcus albidus* sur les margines pendant 48 heures élimine un taux important de la matière organique tout en produisant de la

biomasse et des enzymes (13 UV.ml^{-1}). Cette production peut atteindre $29,5 \text{ UV.ml}^{-1}$ si on élimine les polyphénols par floculation-clarification (Francesco, 1993). L'addition de 2 litres d'une solution de ces enzymes concentrées par ultrafiltration (90 UV/ml) pendant un cycle de broyage augmente le rendement de l'huile de 84,3 à 90,7% (Petrucchioli et al., 1988).

La production de l'enzyme laccase par la culture de deux champignons *Coriolus versicolor* et *Funalia troglia* sur les margines a été étudiée (Kahraman et Yesilada, 2001). Cette étude a montré que l'addition des tiges du coton augmente significativement l'activité laccase (phénol oxydase).

XII. 5. Epandage

La valorisation des margines par épandage a été largement étudiée par plusieurs auteurs (Morisot, 1979 ; Morisot et Tournier, 1986 ; Pérez *et al.*, 1986 ; Saiz-Jemenez *et al.*, 1987 ; Lombardo *et al.*, 1988 ; Ranalli, 1991a ; Levis-Menzi *et al.*, 1992 ; Tomati et Galli, 1992). Les margines peuvent être utilisées dans l'irrigation en raison de leur richesse en eau et en minéraux nutritifs (Fiestas Ros de Ursinos, 1986). Un mètre cube de margines apporte 3,5 à 11 kg de K_2O ; 0,6 à 2 kg de P_2O_5 et 0,15 à 0,5 kg de MgO par hectare de terrain irrigué.

Cependant, cette technique présente certains inconvénients :

- Problèmes du stockage vu que la période oléicole coïncide avec la période pluviale (Ranalli, 1991a).
- Colmatage du sol (Proietti *et al.*, 1988 ; Ranalli, 1991a)
- L'acidité et la salinité élevées peuvent provoquer des brûlures sur les plantes (Morisot, 1979 ; Sierra *et al.*, 1994).
- Contamination des eaux souterraines (Fiestas ros de Ursinos, 1977 ; Ranalli, 1991a).
- Inhibition de la germination due à l'effet phytotoxique exercé par les composés phénoliques sur les plantes (Morisot, 1979 ; Pérez *et al.*, 1980, 1986 ; Ranalli, 1991a ; Ehaliotis *et al.*, 1999 ; Casa *et al.*, 2003).
- Modification de la composition de la flore du sol (Parades *et al.*, 1986 ; Pérez *et al.*, 1987, 1992).
- Modification des caractéristiques physico-chimiques du sol (Proietti *et al.*, 1988 ; Sierra *et al.*, 2001 ; Zenjari et Nejmeddine, 2001).

- 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, Buldini *et al.* (2000) 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.

XII. 6. Utilisation en alimentation animale

Les margines ont été utilisées directement comme aliment pour le bétail (Ercoli et Ertola, 1983). 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 l'eau potable (Fedeli, 1977). 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 (Salvemini et Cera, 1984 ; Salvemini, 1985). Le procédé Dalmolive décrit par Martillotti (1993) 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 21.

Tableau 21 : Composition chimique de la pâte des margines obtenue par le procédé Dalmolive (Martilotti, 1993).

Composant	Valeur (% de la matière sèche totale)
Matière azotée totale	21,6
Matière grasse	4,0
Cellulose brute	13,1
Matière minérale	8,9
Extrait non azoté	52,5
Matière azotée digestible	17,2

Malgré les multiples procédés testés pour le traitement et la valorisation des margines, seulement quelques-uns sont appliqués à l'échelle industrielle en raison du coût élevé des installations. En plus, les résultats obtenus montrent pour la plupart des procédés, que le coût et l'énergie consommée étaient trop élevés par rapport au rendement d'épuration obtenu. Ceci est lié essentiellement à la grande quantité des margines produites annuellement et à leur forte et complexe charge polluante.

I. INTRODUCTION

Dans le cadre de l'étude du traitement biologique des effluents d'industries agro-alimentaires de la ville de Fès, nous avons réalisé la présente étude sur les effluents des huileries de cette ville. En effet, les huileries représentent l'activité industrielle la plus dominante dans la ville de Fès après les tanneries. Ainsi, avant d'entamer toute étude de traitement ou de valorisation, il nous a paru intéressant de déterminer la quantité et la qualité de la charge polluante engendrée par le rejet des effluents des huileries.

Le présent travail, est l'une des premières études qui se sont intéressées à la caractérisation physico-chimique et microbiologique des margines de la station d'évaporation naturelle de la ville de Fès. Le but de ce travail est d'évaluer l'efficacité du traitement des margines dans les bassins de cette station et de mettre en évidence les micro-organismes responsables de l'autoépuration éventuelle.

II. MATERIEL ET METHODES

II. 1. Echantillonnage

Cette étude a porté sur les margines de la station d'évaporation naturelle localisée au nord-ouest de la ville de Fès. Les prélèvements d'échantillons ont été effectués chaque mois durant la campagne oléicole (Novembre 2000 - Mars 2001). La station est constituée de deux bassins de séchage, recouvrant une superficie de l'ordre de 14 000 m² qui correspond à une capacité de réception de 40 000 tonnes. Seulement 30% des rejets des huileries de la ville de Fès produits dans les campagnes oléicoles sont évacués dans ces bassins (Ministère des travaux publics, 1997).

Les échantillons prélevés ont été mis dans des flacons de 2 litres pour les dosages physico-chimiques. Ceux qui sont destinés aux analyses microbiologiques ont été prélevés dans des flacons stériles puis transportés rapidement au laboratoire. Les échantillons des margines sont conservés à – 20°C pour une utilisation ultérieure.

II. 2. Etude physico-chimique des margines

La caractérisation physico-chimique et minéralogique a été basée sur l'étude des paramètres suivants : Acidité (pH), matières en suspension (MES), matière sèche (MS), matière volatile (MV), demande chimique en oxygène (DCO), composés phénoliques, sucres

totaux, matière grasse, conductivité, azote total, ions ammoniums, orthophosphates, chlorures, calcium, magnésium, sodium et potassium.

Avant de procéder au dosage des différents paramètres physico-chimiques, les échantillons de margines sont centrifugés ($8000 \times g$) dans une centrifugeuse Sigma 2K15. Pour la détermination des MES, MS et MV, les échantillons des margines sont utilisés sans centrifugation.

II. 2. 1. Détermination des paramètres organiques

II. 2. 1. 1. Acidité (pH)

Le pH a été mesuré à l'aide d'un pH-mètre type ORION modèle 230A.

II. 2. 1. 2. Matières en suspension (MES)

Les MES sont déterminées par centrifugation d'un volume de 20 ml d'échantillon à $8\,000 \times g$ pendant 20 minutes. Le culot est mis dans une coupelle en porcelaine préalablement pesée puis séché à l'étuve à 105°C pendant 24 heures. La différence entre le poids de l'échantillon séché et celui de la coupelle détermine le taux de MES. Il est exprimé en g.l^{-1} .

II. 2. 1. 3. Matière sèche (MS) et matière volatile (MV)

La matière sèche est constituée par l'ensemble des substances organiques et inorganiques, en solution ou en suspension, contenues dans les margines. La MS est déterminée par évaporation d'un échantillon de 20 ml dans une capsule en porcelaine à 105°C pendant 24 heures. Elle est exprimée en g.l^{-1} par rapport au poids frais.

La matière volatile est déterminée en faisant la différence entre la matière sèche obtenue par évaporation à 105°C et les résidus de cendres issues de la calcination à 550°C pendant 2 heures. Elle est exprimée en g.l^{-1} par rapport au poids sec.

II. 2. 1. 4. Demande chimique en oxygène (DCO)

La DCO correspond à la consommation d'oxygène nécessaire à l'oxydation complète de la matière organique des margines. Elle est exprimée en gramme d'oxygène par litre d'échantillon. Le DCOmètre utilisé pour l'oxydation de la matière organique à chaud est de type RECORD T5A FUSES.

La détermination de la DCO est effectuée par la méthode de dichromate de potassium. Le principe de cette méthode est basé sur une oxydation à ébullition (150°C pendant 2 heures)

des matières réductrices par un excès de dichromate de potassium en milieu acide (H_2SO_4), et en présence du sulfate d'argent comme catalyseur et du sulfate de mercure comme complexant des chlorures. En fin de la réaction, la DCO est évaluée par prise d'un échantillon convenablement dilué avant l'oxydation. La densité optique de l'échantillon est obtenue par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 585 nm. Les valeurs de la DCO sont mesurées à l'aide d'un spectrophotomètre type UV/Visible de marque Jenway 6 105.

II. 2. 1. 5. Composés phénoliques

Les composés phénoliques contenus dans les margines sont déterminés en utilisant la méthode à l'amino-4-antipyrine par spectrophotométrie d'absorption moléculaire. Cette méthode avec distillation préalable et extraction, demande un temps considérable, mais elle est sensible et particulièrement bien adaptée pour des teneurs inférieures à 1 mg.l^{-1} . Elle permet le dosage du phénol et des composés substitués en ortho et en méta. Les composés substitués en para avec les groupes carboxyl, méthoxyl, halogène pourront être dosés dans des conditions particulières de pH.

- **Principe** : Les phénols donnent avec l'amino-4-antipyrine en milieu alcalin et en présence de ferricyanure de potassium, une coloration extractible par le chloroforme, susceptible d'un dosage spectrophotométrique à une longueur d'onde de 510 nm.

- **Expression des résultats** : Pour une prise d'essai de 50 ml, la courbe de la gamme d'étalon donne directement la teneur en phénol exprimée en milligramme par litre d'eau.

II. 2. 1. 6. Sucres totaux

La méthode utilisée est celle décrite par Dubois *et al.* (1956). Les sucres simples, oligosaccharides, polysaccharides et leurs dérivés réagissent avec le phénol et l'acide sulfurique concentré et donnent une coloration jaune-orange. La réaction est sensible, et la coloration reste stable pendant plusieurs heures. La densité optique est lue à une longueur d'onde de 490 nm. La concentration des sucres totaux est déterminée à partir d'une courbe d'étalonnage d'une solution de glucose à des concentrations allant de 10 à 100 mg.l^{-1} .

II. 2. 1. 7. Matière grasse

A 100 ml de margines, 75 ml de chloroforme et 100 ml du méthanol sont ajoutés. Après agitation suivie d'une décantation, le mélange est divisé en deux phases. La phase supérieure

constituée de margines et de méthanol est éliminée, alors que la phase inférieure contenant le chloroforme et les lipides soluble est évaporée dans un rotavapeur. Le chloroforme s'évapore et les lipides sont récupérés. Le volume de lipides obtenu est évalué en pourcentage par rapport au volume de margines utilisé (v/v).

II. 2. 2. Détermination des paramètres minéraux

II. 2. 2. 1. Conductivité électrique

La conductivité électrique est mesurée par un conductimètre de type WTW modèle LF 318/SET, elle est exprimée en mS.cm^{-1} .

II. 2. 2. 2. Orthophosphates

Les orthophosphates sont dosés selon 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 882 nm. Une courbe étalon est réalisée à partir d'une solution de KH_2PO_4 à des concentrations comprises entre 5 et 10 mg de $\text{PO}_4^{3-}.\text{l}^{-1}$.

II. 2. 2. 3. Azote total

Les composés azotés présents dans les margines sont oxydés en nitrates par une solution alcaline de persulfate à l'autoclave (120°C). Ensuite, les nitrates sont dosés par la méthode de salicylate de sodium, ils donnent du paranitro-salicylate de sodium coloré en jaune et susceptible d'un dosage colorimétrique à une longueur d'onde de 415 nm. La concentration de l'azote total est déterminée à partir d'une gamme étalon de KNO_3 à des concentrations comprises entre 0,5 et 5 mg de $\text{NO}_3^-. \text{l}^{-1}$.

II. 2. 2. 4. Ions ammoniums

Les ions ammoniums sont dosés par la méthode d'indophénol. En milieu alcalin et en présence de nitroprussiate de sodium comme catalyseur, ils réagissent avec le phénol et l'hypochlorite de sodium, et forment le bleu d'indophénol susceptible d'un dosage colorimétrique. La lecture de la densité optique au spectrophotomètre se fait à une longueur

d'onde de 630 nm. La concentration des ions ammoniums est déduite à partir d'une gamme étalon d'une solution de NH_4Cl à des concentrations comprises entre 1 et 10 mg de $\text{NH}_4^+.\text{l}^{-1}$.

II. 2. 2. 5. Calcium et magnésium

Le calcium et le magnésium présents dans les margines sont complexés par l'éthylène diamine tétra-acétate disodique (EDTA) en milieu tamponné. Le noir erichrome T (NET), qui donne une couleur rouge foncée ou violette en présence des ions Mg^{++} et Ca^{++} est utilisé comme indicateur coloré pour la détermination de la dureté totale.

Les ions Ca^{++} sont dosés par l'EDTA en milieu alcalin (pH 12) et en présence d'indicateur coloré. Les ions Mg^{++} sont précipités puis déterminés par différence entre la dureté totale et le calcium. Les deux sont exprimés en g.l^{-1} .

II. 2. 2. 6. Sodium et potassium

Les ions Na^+ et K^+ sont dosés directement dans les échantillons de margines filtrés et dilués avec de l'eau distillée au spectrophotomètre à flamme de type PHF 90 D ; ISA Biologie. Ils sont exprimés en g.l^{-1} .

II. 2. 2. 7. Chlorures

Les chlorures sont dosés par la méthode de Mohr, en milieu neutre par une solution titrée de nitrate d'argent et en présence du chromate de potassium. La fin de la réaction est indiquée par l'apparition de la teinte rouge caractéristique du chromate d'argent.

Le dosage colorimétrique des composés phénoliques, sucres totaux, azote total, ions ammoniums, orthophosphates a été effectué par un spectrophotomètre de type **CWF** modèle 12/13. Les résultats sont exprimés en g.l^{-1} .

Les méthodes utilisées pour le dosage de la conductivité, MES, MVES, MS, MV, DCO, composés phénoliques, azote total, ions ammoniums, chlorures, calcium, magnésium, sodium et potassium sont celles décrites par Rodier (1996).

Tous les essais ont été réalisés en triple. Les valeurs représentées sur les tableaux sont la moyenne des mesures effectuées.

II. 2. 3. Détermination des paramètres métalliques

II. 2. 3. 1. Minéralisation des métaux lourds

La minéralisation des métaux lourds est réalisée selon la méthode décrite par Auger (1989). Des volumes de 50 ml de margines sont mis dans des creusets en porcelaine et placés dans une étuve à 80°C pendant 24 heures jusqu'à séchage total. Des échantillons de 0,5 g du résidu obtenu sont mis dans des bombes à digestion en Téflon contenant chacune 4 ml d'acide nitrique (65%), puis laissés pendant une nuit à une température ambiante pour qu'ils subissent une prédigestion. Ensuite, ils sont mis dans un bain de sable à forte température (120°C) pendant 4 heures pour subir la digestion proprement dite qui permet de détruire toute la matière organique. Après refroidissement, les échantillons sont renversés dans des flacons en polyéthylène et complétés jusqu'à 50 ml par de l'eau bidistillée.

II. 2. 3. 2. Dosage des métaux lourds

Les métaux lourds choisis dans cette étude sont le cadmium (Cd), le chrome (Cr), le cuivre (Cu), le fer (Fe) et le zinc (Zn). Le dosage de ces métaux est effectué par spectrophotométrie d'absorption atomique (S.A.A) de type Varian A-A 20 muni d'un four à graphique.

II. 3. Etude microbiologique des margines

Les analyses microbiologiques des margines ont porté dans un premier temps sur le dénombrement de la flore mésophile aérobie totale (FMAT), des coliformes totaux (CT), coliformes fécaux (CF), des streptocoques fécaux (SF), des levures et des champignons. Dans un second temps, l'isolement, la purification et l'identification de ces micro-organismes ont été réalisés.

II. 3. 1. Dénombrement

L'analyse microbiologique des échantillons a été réalisée dès réception au laboratoire, afin d'éviter toute modification éventuelle de la concentration microbienne initiale.

Après homogénéisation des margines, une série de dilutions dans de l'eau physiologique stérile est réalisée (NaCl à 0,9%). Un volume de 0,1 ml de la dilution appropriée est étalé sur des boîtes de Pétri contenant le milieu gélosé convenable à raison de trois boîtes par dilution.

Flore mésophile aérobie totale (FMAT) :

Le milieu de culture utilisé est la gélose nutritive à pH 7, l'incubation des boîtes étalées est effectuée à 37°C pendant 24 heures.

Coliformes totaux et fécaux :

C'est le milieu gélose lactosé au tergitol et au TTC (Chlorure de Triphényl Tetrazolium) qui est utilisé. Les boîtes étalées sont incubées à 44°C pour les CF et à 37°C pour les CT pendant 24 heures.

Streptocoques fécaux (SF) :

Le milieu de culture utilisé est Slanetz et Bartely additionné du TTC. L'incubation des boîtes est effectuée à 37°C pendant 24 à 48 heures.

Champignons :

Le milieu de culture YM est utilisé, l'incubation des boîtesensemencées est effectuée à 30°C pendant 3 à 7 jours.

Levures :

Le milieu de culture utilisé est YPG, auquel est ajouté le chloramphénicol (25 µg.ml⁻¹) et l'ampicilline (50 µg.ml⁻¹) comme antibiotiques afin d'inhiber toute croissance bactérienne. L'incubation est réalisée à 30°C pendant 48 à 72 heures.

II. 3. 2. Purification

Les souches de bactéries et de champignons sont isolées sur les mêmes milieux utilisés pour leur dénombrement. Alors que pour les souches de levures, l'isolement est effectué sur milieu gélosé additionné aux margines diluées dans de l'eau de robinet (v/v) (25%, 50%, 75% et 100%).

Une fois isolées, les souches sont purifiées par repiquages successifs sur le milieu d'isolement convenable. Ensuite, les souches de champignons sont stockées sur gélose inclinée (2% de l'extrait de malt et 2% d'agar) à 4°C. Celles des bactéries et des levures sont conservées dans du glycérol (40% pour les levures et 20% pour les bactéries) à - 20°C.

II. 3. 3. Identification

- Les bactéries :

Les colonies de bactéries isolées et purifiées sont ensemencées sur des milieux de culture sélectifs (King A, King B, Endo, Chapman, Slanetz et Bartely). Ensuite, l'identification est effectuée par le système des plaques API 20 NE (Biomérieux, SA, France). Elle est basée sur l'assimilation de 12 sources de carbone et l'utilisation de 8 tests biochimiques par des bactéries à Gram-négatif et non entériques. Le profil de l'identité de la souches obtenue est comparé avec celui des données du catalogue analytique API 20 NE.

- Les champignons :

L'identification des champignons isolés est effectuée par l'étude de leurs critères morphologiques tels que la forme du mycélium, du sporange et celle des spores (Robert *et al.*, 1981). Les champignons sont ensemencés sur le milieu Czapek-agar et sur l'extrait de malt-agar à 2%, et incubés à 25°C pendant une semaine. La croissance sur l'extrait de malt permet d'étudier la forme du mycélium et du sporange sous microscope, alors que sur milieu Czapek les caractéristiques morphologiques des spores sont évaluées.

- Les levures :

L'identification est basée sur l'analyse des caractères morphologiques et sexuels, et sur l'étude de certains critères physiologiques. Cette détermination systématique est réalisée conformément aux clés Kreger-Van Rij (1987) et Barnett *et al.* (1990).

Pour s'assurer de la position taxonomique de ces souches, nous avons fait appel à une autre méthode d'identification moléculaire. Elle se base sur l'amplification cyclique par PCR (Polymerase Chain Reaction) de l'ADN ribosomal 28S avec les amorces spécifiques des régions conservées. Les produits PCR des souches testées sont visualisés par le bromure d'éthidium après électrophorèse en gel d'agarose, puis ils sont séquencés par un séquenceur automatique. Les séquences obtenues sont comparées à la banque de données pour déduire la position taxonomique (White *et al.*, 1990 ; Fell, 1993).

L'identification de ces souches a été réalisée dans notre Laboratoire de Microbiologie de l'Environnement à la Faculté des Sciences Dhar El Mehraz en collaboration avec l'équipe F. BARRAS, Laboratoire de Chimie Bactérienne de l'Institut de Biologie Structurale et Microbiologie CNRS - Marseille, France.

III. RESULTATS ET DISCUSSION

III. 1. Caractérisation physico-chimique

Les margines présentent un rejet fortement pollué sous forme de liquide résiduel dont la composition est variable. Cette variabilité dépend du type d'olives, du degré de leur maturation, 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 (De Felice *et al.*, 1997). Les margines se caractérisent aussi par une odeur nauséabonde qui s'accroît au fur et à mesure de leur stockage.

Au cours de notre étude effectuée durant la période oléicole (Novembre 2000 - Mars 2001), les résultats obtenus des analyses de différents échantillons des margines n'ont montré presque aucun changement pour tous les paramètres étudiés. Les tableaux (22, 23 et 24) représentent les moyennes des valeurs obtenues des échantillons prélevés chaque mois durant toute la période oléicole (5 mois).

III. 1. 1. Caractérisation organique

III. 1. 1. 1. Acidité (pH)

La mesure du pH effectuée en plusieurs manipulations 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. En plus, l'acidité des margines augmente avec la durée de leur stockage dans la station d'évaporation naturelle. Ceci peut être expliqué par des réactions d'auto-oxydation et de polymérisation qui transforment les alcools phénoliques en acides phénoliques (Hamdi, 1991a). Ces réactions se manifestent par un changement de la coloration initiale des margines vers un noir très sombre (Assas *et al.*, 2002). En effet, nos margines sont caractérisées par une coloration très foncée.

III. 1. 1. 2. Matières en suspension (MES)

Les margines sont très riches en matières en suspension, leur teneur est de l'ordre de 18 g.l⁻¹. Cette valeur est similaire à celles rapportées par d'autres auteurs dans les margines industrielles (Balice *et al.*, 1997 ; Al-Malah *et al.*, 2000 ; Assas *et al.*, 2002). Bien que dans les bassins, les MES des margines baissent sous l'effet de la décantation, la valeur moyenne

enregistrée au cours de notre étude est élevée. Ceci est probablement dû à l'effet du vent et/ou de l'agitation provoquée au moment du déchargement des margines.

III. 1. 1. 3. Matière sèche (MS) et matière volatile (MV)

Les teneurs moyennes des margines en matière sèche et en matière volatile sont de l'ordre de 98 g.l⁻¹ et de 86 g.l⁻¹ respectivement. La MV représente 90% de la MS, ce qui montre la nature organique des margines. Ce pourcentage est proche de celui observé par plusieurs auteurs (Hamdi, 1991a ; Garcia Garcia *et al.*, 2000 ; Assas *et al.*, 2002 ; Fountoulakis *et al.*, 2002 ; Fadil *et al.*, 2003).

III. 1. 1. 4. Demande chimique en oxygène (DCO)

La teneur moyenne en matières organiques exprimée en DCO est de l'ordre de 154 g d'O₂.l⁻¹. Ceci montre la forte demande en oxygène pour l'oxydation complète de la matière organique contenue dans cet effluent. Cette teneur en DCO est très élevée par rapport à celle enregistrée dans d'autres types de rejets. En effet, la DCO ne dépasse pas 4,02 g d'O₂.l⁻¹ dans les effluents d'abattoir qui sont considérés comme les principaux rejets à caractère organique dominant (Aissam *et al.*, 2001). Toutefois, notre valeur reste comparable à celles obtenues par plusieurs auteurs dans des margines issues du système de centrifugation (Martinez *et al.*, 1992 ; Annaki *et al.*, 1999a ; Ergüder *et al.*, 2000 ; Tsioulpas *et al.*, 2002).

III. 1. 1. 5. Composés phénoliques

Ces rejets sont aussi caractérisés par la prédominance de substances toxiques notamment les composés phénoliques (9.7 g.l⁻¹) qui leur confèrent un pouvoir anti-microbien (Ranalli, 1991a, Capasso *et al.*, 1995 ; Capasso, 1997). Cette concentration élevée pourrait limiter toute biodégradation naturelle, et par conséquent pourrait entraîner une perturbation plus ou moins profonde de tout l'écosystème. Néanmoins, elle est proche de celle citée dans la bibliographie (Borja *et al.*, 1992 ; Kissi *et al.*, 2001 ; Fountoulakis *et al.*, 2002).

III. 1. 1. 6. Sucres totaux

La présence de faible concentration en sucres (0,28 g.l⁻¹), montre que les micro-organismes dans les margines utilisent pour leur métabolisme les produits de dégradation des composés phénoliques, plutôt que celle des sources glucidiques. Donc, ces micro-organismes empruntent des voies métaboliques secondaires pour produire le pouvoir réducteur (NADH et

NADPH) et l'énergie (ATP) qui assure leur maintenance cellulaire sous les conditions drastiques de cette station. Sous microscope, les levures isolées directement des margines sont rarement observées en plein bourgeonnement. Ce qui nous laisse déduire qu'il n'y a pas une croissance de la plupart des micro-organismes dans les margines mais seulement une survie. Cette concentration des sucres obtenue dans notre étude reste bien inférieure à celles reportées par d'autres auteurs (Sayadi et Ellouz, 1993 ; Martin *et al.*, 1994 ; Kahraman et Yesilada, 1999). Ceci pourrait être expliqué par le stockage des margines dans les bassins, puisque la présence des sucres indique l'état de fraîcheur des margines. Pendant leur stockage, les sucres sont fermentés en acides organiques (Hamdi, 1992).

III. 1. 1. 7. Matière grasse

La quantité en matières grasses résiduelles présente dans les margines, dépend du système d'extraction d'huile d'olive. Le processus de centrifugation permet d'obtenir des taux faibles par rapport au processus traditionnel (Zimbalatti, 1995).

Les margines étudiées dans notre cas présentent un aspect visqueux lié à la présence de la fraction huileuse qui représente 1% (v/v). Elle forme une couche lipidique à la surface des margines au niveau des bassins, ce qui pourrait limiter l'évaporation naturelle.

Tableau 22 : Composition organique des margines collectées à partir de la station d'évaporation naturelle de Fès.

Paramètre	Valeur moyenne
PH	4,5
Matières en suspension (MES) (g.l ⁻¹)	18
Matière sèche (g.l ⁻¹)	98
Matière volatile (g.l ⁻¹)	86
Demande chimique en oxygène (DCO) (g d'O ₂ .l ⁻¹)	154
Composés phénoliques (g.l ⁻¹)	9,7
Sucres totaux (g.l ⁻¹)	0,28
Matière grasse (%)	1

III. 1. 2. Caractérisation minéralogique

En ce qui concerne la composition minérale, tous les ions minéraux sont détectés (Tableau 23).

III. 1. 2. 1. Conductivité

Les margines étudiées ont une conductivité électrique trop élevée de l'ordre de 36 mS.cm^{-1} . Cette valeur reflète 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.

III. 1. 2. 2. Calcium, magnésium, potassium et sodium

Les margines sont riches en Ca^{++} , Mg^{++} , K^+ et Na^+ qui sont de l'ordre 2 g.l^{-1} ; $1,3 \text{ g.l}^{-1}$; $4,37 \text{ g.l}^{-1}$ et $2,78 \text{ g.l}^{-1}$ respectivement. Le K^+ représente le métal cationique le plus prédominant, ce résultat est similaire à ceux cités dans la littérature (Arienzo et Capasso, 2000 ; Capasso *et al.*, 2002a, 2002b). Cette teneur en K^+ est proche de celle trouvée par Arienzo et Capasso (2000) qui est de l'ordre de $3,68 \text{ g.l}^{-1}$.

La teneur moyenne des margines en Na^+ ($2,78 \text{ g.l}^{-1}$) est plus élevée que celles enregistrées dans la littérature. En effet, elles ne dépassent pas $0,7 \text{ g.l}^{-1}$ (Sayadi et Ellouz, 1993 ; Cabrera *et al.*, 1996 ; Arienzo et Capasso, 2000). Toutefois, la concentration obtenue dans notre étude reste inférieure à celle observée dans les margines de petites maâsras où la conservation des olives dans le sel s'impose par défaut de capacité des usines.

C'est cette richesse en éléments minéraux qui a poussé beaucoup de chercheurs d'orienter le traitement des margines vers leur valorisation en composte ou en fertilisant des terres agricoles (Tomati et Galli, 1992 ; Galli *et al.*, 1994 ; Papadimitriou *et al.*, 1997 ; Piperidou *et al.*, 2000 ; Capasso *et al.*, 2002b).

III. 1. 2. 3. Chlorures

La concentration moyenne des chlorures dans les margines est élevée (5 g.l^{-1}). Elle est due à l'ajout du sel en quantité importante pour la conservation des olives. Cet élément a un effet néfaste sur les cultures. En effet, il a un pouvoir bio-oxydant sur la plupart des micro-organismes, lorsque sa concentration dépasse 10 g.l^{-1} .

III. 1. 2. 4. Orthophosphates et azote total

Les margines présentent également des teneurs élevées en orthophosphates ($0,12 \text{ g.l}^{-1}$) et en azote total ($0,14 \text{ g.l}^{-1}$). Toutefois, les concentrations en phosphate et en azote restent plus faibles par rapport à celle du carbone (DCO). Ceci pourrait être l'une des causes qui entrave l'épuration des margines par voies biologiques. Dans ce sens, Bechac *et al.* (1984) recommandent un rapport DCO/N/P d'environ 100/5/1 pour assurer un développement optimum des micro-organismes aérobies. Tandis que, Ranalli (1992) recommande un rapport DCO/N/P de l'ordre de 100/16/1. Ce qui nécessite une correction de la teneur en azote et en phosphore lors d'un éventuel traitement biologique des margines.

III. 1. 2. 5. Ions ammoniums

Pour évaluer le degré d'auto-épuration, des échantillons de margines sont incubés à température ambiante pendant un mois. Des prélèvements tous les trois jours sont effectués pour le dosage des ammoniums. Les résultats ont montré que leur concentration est assez faible ($0,01 \text{ g.l}^{-1}$) et surtout très stable durant toutes les mesures effectuées dans les mêmes échantillons de différentes margines. Ce résultat suggère que la biodégradation de ces effluents est très limitée.

Tableau 23 : Composition minérale des margines étudiées.

Paramètre	Valeur moyenne
Conductivité (mS.cm^{-1})	36
Calcium (g.l^{-1})	2
Magnésium (g.l^{-1})	1,3
Potassium (g.l^{-1})	4,37
Sodium (g.l^{-1})	2,78
Chlorures (g.l^{-1})	5
Orthophosphates (g.l^{-1})	0,12
Azote total (g.l^{-1})	0,14
Ammoniums (g.l^{-1})	0,01

III. 1. 3. Caractérisation métallique

Les résultats du dosage des métaux lourds dans les margines sont présentés dans le tableau 24. L'analyse de ces résultats montre que les margines contiennent des teneurs non négligeables en métaux surtout en fer ($7300 \mu\text{g.l}^{-1}$). Le Zn, le Cu et le Fe ayant comme origine, entre autres, le fruit lui-même. En effet, ces métaux sont des oligo-éléments essentiels

qui entrent dans la constitution minéralogique des olives. Par contre, le Cr et le Cd ont une origine exogène. Ils proviennent probablement de l'eau d'irrigation, des engrais phosphatés et de certains produits phytosanitaires de traitement des olives. Donc la composition métallique des margines dépend de la qualité des olives triturées surtout pour le Zn, Cu et le Fe.

Les résultats de cette caractérisation métallique sont comparables à ceux obtenus par Zenjari (2000).

Tableau 24 : Composition métallique des margines collectées à partir de la station d'évaporation naturelle de Fès.

Paramètre ($\mu\text{g.l}^{-1}$)	Valeur moyenne
Cadmium	4
Chrome	30
Cuivre	23
Fer	7300
Zinc	180

III. 2. Caractérisation microbiologique

Jusqu'à présent, peu de travaux ont été réalisés sur la caractérisation microbiologique des margines. Ceci est probablement dû à l'intérêt accordé aux matières organiques des margines, sans se soucier de leur contenu microbien. C'est pour cela que nous avons jugé utile de faire une étude microbiologique des margines de la station d'évaporation naturelle de la ville de Fès, dans le but de mettre en évidence les micro-organismes qui se développent ou survivent sur ces effluents.

III. 2. 1. Dénombrement des micro-organismes

Les résultats du dénombrement des germes présentés dans le tableau 26 montrent que les levures et les champignons représentent la flore majoritaire des margines de cette station. Ils sont d'environ $7,6 \cdot 10^3$ UFC.ml⁻¹ et $4 \cdot 10^2$ UFC.ml⁻¹ respectivement. Ce résultat est comparable à ceux obtenus par plusieurs auteurs qui ont montré que les champignons et les levures sont capables de se développer plus que les bactéries dans les margines (Mouncif *et al.*, 1993a ; Millan *et al.*, 2000). En effet, ils semblent être les mieux adaptés à l'acidité et à la salinité élevées des margines, et ils résistent plus que les bactéries à la toxicité des substances phénoliques.

La charge microbienne totale est évaluée par le dénombrement de la flore mésophile aérobie totale (FMAT). Elle est relativement faible ($8,4 \cdot 10^3$ UFC.ml⁻¹) par rapport à celle

enregistrée dans les effluents d'abattoir ($1,23 \cdot 10^6$ UFC.ml⁻¹) (Aissam *et al.*, 2001). Ceci peut être lié aussi aux caractéristiques physico-chimiques des margines qui gênent la croissance des micro-organismes notamment la présence des substances antimicrobiennes (composés phénoliques, tanins, acides gras).

Pour vérifier s'il y a une éventuelle contamination par les germes fécaux, nous avons procédé à la recherche des coliformes totaux (CT), des coliformes fécaux (CF) et des streptocoques fécaux (SF). Les résultats ont montré l'absence totale de ces germes dans les margines. Des résultats similaires ont été obtenus pour les margines de Taza et Marrakech (Mouncif *et al.*, 1993a). Une étude microbiologique est effectuée sur des olives crues a montré la présence d'une flore très diversifiée (Asehrou, 1993). Les coliformes fécaux sont présents et leur concentration peut atteindre $2,8 \cdot 10^4$ UFC.g⁻¹ d'olive. Cette flore pourrait provenir en grande partie du sol, des insectes volants tels que les coléoptères et les lymnoptères (Mundt, 1970) ou des mains des ouvriers lors de la récolte. Par conséquent, l'absence totale de ces germes dans les margines ne pourrait être expliquée que par une inhibition de leur croissance par les composés phénoliques (polyphénols, tannins, acides gras...) (Ranalli, 1991a).

Tableau 25 : Caractérisation microbiologique des margines de la station d'évaporation naturelle.

Flore microbienne	UFC.ml ⁻¹
FMAT	$8,4 \cdot 10^3$
Champignons	$4,0 \cdot 10^2$
Levures	$7,6 \cdot 10^3$
Coliformes totaux	0
Coliformes fécaux	0
Streptocoques fécaux	0

III. 2. 2. Identification des micro-organismes

III. 2. 2. 1. Bactéries

Toutes les souches sélectionnées sont des bactéries à gram négatif et capables de croître sur milieux King A et B. Les résultats de l'identification des souches étudiées, par la galerie API 20 NE montrent qu'elles appartiennent toutes à une seule espèce du genre *Pseudomonas sp.* Ce sont les seules bactéries capables de résister à la toxicité des composés phénoliques. Selon la bibliographie, les bactéries de ce genre disposent d'un métabolisme spécial qui leur permet de résister aux composés phénoliques. En effet, elles possèdent des

plasmides cataboliques (plasmide Tol) qui facilitent l'assimilation des hydrocarbures aromatiques (Benlemlih *et al.*, 1991).

Garcia-Ribera *et al.* (2001) ont transformé la souche *Pseudomonas putida* par le plasmide pSK2665 contenant 3 gènes codant pour l'enzyme PHA synthase. Cette enzyme catalyse l'anabolisme du PHA (Polyhydroxyalkanoate) à partir des composés phénoliques qui est utilisé comme précurseur dans la synthèse du plastique. Cette souche hébergeant le plasmide devient capable de croître sur les margines à haute concentration avec le stockage des granules du PHA.

III. 2. 2. 2. Champignons

Deux espèces ont été identifiées dans notre étude :

- **Espèce 1 : *Aspergillus niger***

Elle est caractérisée par un mycélium cloisonné, avec conidiophore à tête globulaire.

Sur milieu Czapek-agar à 25°C, la croissance du champignon est lente. Les colonies peuvent atteindre un diamètre de 4 à 5 cm après une semaine d'incubation. Elles sont constituées par un mycélium rompant à la surface de la gélose avec des conidiophores noirs. Parfois, nous observons un mycélium intramatriciel sur des cultures âgées. Les têtes conidiennes prennent une position radiale tendant à se morceler en colonnes avec l'âge. Sous microscope, les conidiophores sont lisses et ont généralement une coloration brune. Les conidies ont une forme globuleuse d'un diamètre de 3,5 à 5 µm, elles présentent des ornements rugueux en forme d'épine.

Sur l'extrait de malt-agar, les colonies sont minces, mais la sporulation est très dense.

La partie apicale du conidiophore renflée permet de situer cette espèce dans le genre *Aspergillus*. La forme des spores donne à la souche le nom d'*Aspergillus niger*.

- **Espèce 2 : *Penicillium sp.***

Elle est caractérisée par un mycélium lâche, aérien, cloisonné et à sporange vert. Les phialides sont courts, les conidiophores sont en pinceau et les colonies sont généralement bleu-verdâtres.

Sur milieu Czapek, les colonies présentent une croissance faible, elles n'atteignent que 1 à 1,5 cm de diamètre après une semaine d'incubation. Les conidiophores sont denses et ressemblent à une peau bleu-verdâtre. Sous microscope, les conidies sont globuleuses ou

subglobuleuses et se présentent sous forme d'une chaîne sur le mycélium. Ces conidies sont produites à partir d'une cellule spéciale (conidiogène) appelée phialide en forme de bouteille.

Sur l'extrait de malt, les colonies présentent une croissance plus rapide et moins dense.

Toutes ces caractéristiques sont conformes à celles du genre *Penicillium sp.*

Ce résultat est conforme à celui obtenu par Mouncif *et al.* (1993a) sur des margines Marocaines de Taza et Marrakech. Les espèces appartenant à ces deux genres semblent être les champignons les plus adaptés à survivre dans cet effluent à haute toxicité.

Le nombre de champignons isolé dans notre échantillon marocain reste inférieur à celui trouvé en Espagne par Millan *et al.* (2000). Celui-ci a trouvé 12 souches de champignons appartenant aux genres : *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Chalara*, *Fusarium*, *Lecytophora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phoma*, *Phycomyces*, *Rhinochadiella* et *Scopulariopsis*. Cette différence peut être expliquée par la toxicité spécifique de nos margines marocaines issues des unités industrielles qui utilisent des technologies classiques dans la trituration des olives (Annaki *et al.*, 1999b).

III. 2. 2. 3. Levures

Dans le but de cribler des souches de levures performantes capables de croître sur ce type de rejet; nous avons isolé et purifié sur milieu YPG, 71 colonies de levures appartenant à 40 espèces différentes avec la prédominance du genre *Candida* (Aissam *et al.*, 2002). Les 71 colonies sont testées pour leur capacité de se développer sur des margines diluées (25, 50, 75 et 100%). Les colonies qui ont poussé sur milieu de culture solide à base des margines à 25% sont étalées sur un autre à base des margines à 50%. Cette présélection nous a permis d'isoler 48 types de colonies. Cependant, seulement 12 colonies ont pu survivre sur le milieu gélosé contenant les margines brutes (100%). Ces 12 souches ont été identifiées par une méthode classique (Kreger-van Rij, 1987 ; Barnett *et al.*, 1990) et les résultats ont révélé qu'elles appartiennent à 8 espèces de levures (tableau 26). Les résultats de l'identification par approche moléculaire (séquences des 28S) sont comparables à ceux obtenus par la technique classique.

Tableau 26 : Liste des souches de levures identifiées à partir des margines.

Espèce identifiée	Nombre de souches
<i>Candida boidinii</i>	3
<i>Candida diddensiae</i>	2
<i>Candida wickerhamii</i>	1
<i>Geotrichum terrestre</i>	1
<i>Pichia kluyveri</i>	1
<i>Pichia membranaefaciens</i>	2
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1
<i>Zygosaccharomyces fermentati</i>	1

Ces 8 souches de levures peuvent être considérées comme les souches les plus adaptées à la toxicité de ces rejets.

Le nombre des souches de levures isolées sur milieu riche (YPG) est supérieur à celui des souches qui se sont développées sur milieu à base de margine à 100%. Ceci peut être expliqué par le fait que toutes les espèces n'existent pas seulement sous forme végétative dans la station d'évaporation naturelle, mais aussi sous une forme de résistance telle que les spores. Le milieu à base de margine simule d'une manière approximative la composition des margines dans la station d'évaporation naturelle. Ce qui explique le nombre réduit des souches capables de croître sur ce milieu, mais ceci donne une idée immaculée sur la majorité des micro-organismes adaptés génétiquement à cette niche écologique. Nous pouvons donc dire que les 8 souches de levures qui se sont développées sur ce milieu à base de margine, pourraient être les plus performantes vis à vis de la dégradation des composés majeurs des margines de nature phénoliques et lipidiques. Cette dégradation est étroitement liée aux capacités métaboliques typiques de ces souches (Horiguchi *et al.*, 2001b). Sous ces conditions physiologiques, la majorité de ces espèces forment des peroxyosomes de grande taille qui jouent un rôle important dans la dégradation et la métabolisation des composés phénoliques et lipidiques. Plusieurs enzymes participent au métabolisme peroxyosomal, parmi lesquelles on trouve la catalase. Cette enzyme joue un rôle majeur non spécifique dans l'adaptation de ces souches de levures dans les conditions drastiques (Aissam *et al.*, 2002). Elle protège la cellule contre les molécules agressives et les dérivés toxiques de l'oxygène formées en grande quantité au moment de la métabolisation des composés non glucidiques (Wang *et al.*, 1999 ; Horiguchi *et al.*, 2001a). En effet, le métabolisme des composés phénoliques fait intervenir une première étape d'oxydation par une oxydase non spécifique. Cette transformation est accompagnée par la formation d'eau oxygénée qui est rapidement dégradée par une catalase spécifique, dont l'activité est plus élevée dans les cellules cultivées sur milieu contenant les

composés phénoliques que sur celui contenant le glucose (Aissam *et al.*, 2002). Cette induction élevée de l'activité catalase démontre l'effet de la flexibilité métabolique sur l'adaptation des souches dans les margines de la station d'évaporation naturelle.

Il est connu dans la littérature que plusieurs peroxysomes sont présents dans les cellules de levures cultivées sur les composés phénoliques. Leur nombre est corrélé avec l'augmentation de l'activité catalase dans les cellules. Ces peroxysomes ne contiennent pas seulement la catalase, mais aussi d'autres enzymes. L'action symbiotique de ces enzymes protège les levures contre l'oxygène activé formé en grande quantité au moment de l'assimilation des composés non glucidiques (Horiguchi *et al.*, 2001a).

IV. CONCLUSION

D'après cette étude microbiologique nous pouvons dire que les margines de la station d'évaporation naturelle renferme une charge microbienne assez basse par rapport à celle trouvée dans d'autres effluents. L'étude physico-chimique effectuée sur ces margines a montré qu'elles sont caractérisées par une forte pollution organique évaluée en terme de DCO ($154 \text{ g d'O}_2\text{.l}^{-1}$). Ceci montre que cet effluent n'a pas été épuré par biodégradation naturelle. L'activité et la croissance des micro-organismes sont probablement altérées par la présence des composés phénoliques à forte concentration ($9,7 \text{ g.l}^{-1}$). Par conséquent, l'autoépuration naturelle des margines dans ces bassins serait très limitée.

Notre étude a été effectuée pendant la période oléicole qui se caractérise par une pluviométrie élevée. Nous pouvons exclure toute concentration des margines liée à une évaporation naturelle. En plus, l'étude du suivi de l'évolution des paramètres physico-chimiques des margines de cette station a été réalisée durant toute l'année (résultats non encore publiés). Ces résultats ont montré que ces paramètres restaient très stables avec quelques variations non significatives. Ceci nous laisse déduire que les margines n'avaient subi qu'une faible évaporation. Le bilan hydrique de la station est perturbé par les fluctuations thermiques et pluviométriques. En effet, la présence d'une pellicule étanche formée de lipides résiduels à la surface des margines rendrait l'évaporation naturelle limitée.

L'ensemble de ce travail montre que le traitement des margines par des bassins d'évaporation naturelle est inefficace. Ce traitement ne permet qu'une partielle évaporation et une faible autoépuration naturelle, puisque la plupart des micro-organismes sont à l'état de survie et non de croissance dans ces rejets. De ce fait, ces bassins d'évaporation ne permettent que d'éviter le rejet direct des margines dans les égouts et les rivières.

Les microorganismes isolés de ces margines peuvent être considérés comme les plus adaptés à la toxicité de ces rejets. Ils peuvent être testés pour leur capacité à dégrader les composés phénoliques dans le but de les utiliser dans un procédé innovant de traitement biologique des margines. Ceci fera l'objectif du 3^{ème}, 4^{ème} chapitres.

I. INTRODUCTION

L'identification des souches de levures a été effectuée par deux techniques : classique et moléculaire.

La méthode classique est basée sur l'analyse des caractères morphologiques et sexuels, et sur l'étude de certains critères d'ordre physiologique et biochimique. Cette méthode a été réalisée conformément à la clé de Kreger-Van Rij (1987) et de Barnett *et al.* (1990).

La description standard de Kreger-van Rij des espèces donne les caractéristiques avec lesquelles elles sont reconnues. Ces caractéristiques sont en général similaires pour les espèces y compris la morphologie, la physiologie, la biochimie et parfois l'écologie. Pour les espèces sporogènes, les caractéristiques du cycle sexuel sont aussi incluses. La valeur taxonomique des caractères décrits dépend de leur capacité à différencier entre les espèces. Les caractéristiques qui sont bien corrélées avec la nature des espèces, sont considérées comme les indicateurs utiles et clés pour la caractérisation des espèces.

Les conditions des tests sont strictement standardisées puisqu'elles pourraient influencer les résultats d'identification. Ceci ne concerne pas seulement les propriétés physiologiques et biochimiques, mais aussi les caractéristiques morphologiques pouvant varier avec la croissance du mycélium.

Au cours des années, les méthodes d'identification changent et le nombre de caractères à étudier augmente considérablement. Par exemple, le milieu liquide utilisé pour les tests d'assimilation prenait la place de la méthode oxanographique (Wickerham et Burton, 1948). Wickerham (1951) a étendu le nombre des composés organiques de 5 à 31 qui contribue à bien identifier l'espèce.

L'identification des souches de levures via cette méthode standard est un travail fastidieux sur le plan pratique, et peut durer plusieurs mois. En plus, les souches peuvent subir des mutations tout au long des générations pour assurer une meilleure adaptation aux conditions drastiques des milieux naturels. Ce qui rend leur identification dure et pénible. Pour pallier ce problème dans notre étude, nous avons insisté sur le fait que les caractères cités dans la clé d'identification soient identiques à ceux de chaque souche étudiée.

Ces problèmes techniques sont la cause majeure de la rareté des travaux effectués sur l'identification biochimique et physiologique des souches de levures isolées à partir des margines. La plupart des chercheurs font recours à l'identification moléculaire.

L'identification par techniques moléculaires est considérée avoir une importance fondamentale. Elle a un grand effet sur la taxonomie, non seulement dans la séparation entre les genres, mais aussi pour les espèces.

L'identification par approche moléculaire des levures a fait aussi l'objectif de notre travail. Cette étude a été effectuée dans le but de s'assurer de la position taxonomique de chaque espèce.

II. MATERIEL ET METHODES

II. 1. Identification classique des souches de levures

II. 1. 1. Etude des caractères morphologiques

II. 1. 1. 1. Etude du mode de reproduction végétative

La reproduction végétative chez les levures se fait par trois modes : Bourgeonnement, fission ou par cloisonnement du mycélium (anse d'anastomose). Le mode de reproduction par bourgeonnement est largement répandu chez les levures. La reproduction par fission et par cloisonnement du mycélium semble spécifique à un nombre restreint de genres de levures. Les souches à examiner sont mises en culture en milieu YM et incubées à 25°C pendant 3 jours. L'observation microscopique portera sur la forme et la taille des cellules, et sur le mode de reproduction asexuée.

II. 1. 1. 2. Etude du mycélium

La croissance des souches sur milieu PDA permet de mettre en évidence la présence d'un pseudomycélium ou d'un vrai mycélium. L'observation microscopique est réalisée après 10 jours d'incubation à 25°C. La forme du mycélium est une caractéristique importante pour la détermination systématique des souches.

II. 1. 1. 3. Etude de la sporulation

Le mode de reproduction sexuée est l'un des principaux critères dans la classification systématique des levures. En effet, il permet de les situer au sein de trois grands groupes de champignons :

- Levures ascosporegènes, rattachées aux ascomycètes dont la reproduction est assurée par des ascospores qui sont des endospores.

– Levures ballistosporogènes, apparentées aux basidiomycètes dont la reproduction est assurée par des basidiospores qui sont des exospores.

– Levures imparfaits, rattachées aux deuteromycètes dont aucun mode de reproduction sexuée n'est défini. Ce groupe a les deux affinités ascomycètes et basidiomycètes.

La forme des spores est évaluée par la culture des souches sur des milieux spécifiques (milieu Mac Calary, milieu d'Adams). L'incubation se fait à 25°C pendant un mois. Les trois formes de sporulation sont mises en évidence à l'aide des observations microscopiques après coloration des spores avec le vert de malachite.

II. 1. 2. Etude des caractères physiologiques

II. 1. 2. 1. Fermentation des sucres

Les souches ont été testées pour leur capacité à fermenter le glucose, galactose, saccharose, maltose, lactose et le tréhalose selon la méthode de Durham. Le milieu comporte 0,45% d'extrait de levures, 0,75% de peptone et 2% de sucre approprié. Après ensemencement, les tubes sont incubés à 25°C et examinés quotidiennement pendant un mois. La mesure de la partie vide dans la cloche de Durham donne une estimation du volume du gaz formé par fermentation.

II. 1. 2. 2. Assimilation des sources de carbone

Il s'agit de l'un des principaux tests physiologiques utilisés pour la détermination taxonomique des levures. Le milieu de base (Yeast Nitrogen Base : YNB) est celui défini par Wikerham (1951), auquel est ajouté la source carbonée sous forme de sucres en C₆, C₁₂, C₁₈, méthyle de pentose, des polymères d'alcool, d'acides organiques et des polysaccharides à une concentration de 0,5%. Dans notre étude nous avons utilisé 26 sources de carbone. L'assimilation d'un composé organique se traduit par une croissance de la souche dans le milieu après 3 à 7 jours à 28°C. Comme témoins, nous avons utilisé le milieu minimum contenant le glucose (témoin positif), et le même milieu exempt de source de carbone (témoin négatif).

Les tubes sont examinés aussi pour la présence de pellicule à la surface des milieux, et la possibilité de sécrétion de quantités visibles en riboflavines qui sont produits par certaines souches.

II. 1. 2. 3. Assimilation des nitrates

L'assimilation des nitrates comme seule source d'azote représente un critère taxonomique très important. Il représente un caractère d'ordre générique. Nous avons utilisé le milieu YNB-glucose (Yeast Nitrogen Base) additionné au nitrate de potassium comme seule source d'azote. L'incubation est réalisée à 28°C pendant 3 à 7 jours.

II. 1. 2. 4. Croissance sur milieu sans vitamine

Les levures varient quant à leurs exigences en vitamine. Alors que certaines espèces semblent autotrophes, d'autres sont auxotrophes vis-à-vis de plusieurs facteurs de croissance. Ce test estime la capacité des levures à croître sur un milieu dépourvu de vitamines. Le milieu complet standard YNB-glucose sur lequel poussent les espèces auxotrophes ou hétérotrophes, comprend neuf vitamines : la biotine, le pantothénate de calcium, l'acide folique, l'inositol, la nicotinamide, l'acide para-amino-benzoïque, le chlorhydrate de pyridoxine, la flavine et la thiamine. Ces dernières sont absentes dans le milieu sans vitamine. Au cours de la réalisation de ce test, nous avons effectué des purges successives dans des tubes de cultures à partir d'un ensemencement très faible afin d'éliminer les erreurs dues à l'apport de vitamines endogènes. L'incubation est réalisée à 25°C pendant 7 jours.

II. 1. 2. 5. Croissance à 37°C et 42°C

Les levures sont testées pour leur capacité à croître à des températures de 37°C et de 42°C. Les souches de levures sont inoculées dans le milieu de culture YNB-glucose et les tubes sont ensuite incubés à 37°C ou à 42°C pendant 7 jours.

II. 1. 2. 6. Test de l'uréase

Le milieu christensen permet la mise en évidence de l'activité uréase chez les levures étudiées. Cette enzyme transforme l'urée en ammoniac, ce qui provoque l'augmentation de pH qui vire l'indicateur coloré. Une réaction positive se traduit par l'apparition d'une coloration rose à violette vive dans le milieu de culture après 3 à 7 jours d'incubation à 25°C.

II. 1. 2. 7. Résistance au cycloheximide

Au milieu synthétique complet YNB-glucose est ajouté 0,1 et 1 mg.l⁻¹ de cycloheximide (Fluka). Ce test est utilisé pour mettre en évidence la résistance des souches de

levures à cet inhibiteur qui bloque la traduction chez les cellules eucaryotes. L'incubation des boîtes se fait à 25°C pendant 3 semaines.

II. 2. Identification moléculaire des souches de levures

II. 2. 1. PCR

Les levures isolées sont identifiées après amplification et séquençage des ADNr 28S. L'amplification par PCR (Polymerase chain reaction) est réalisée en utilisant les primers V3-1 et V3-2. Ensuite le séquençage du domaine variable V3 de l'ADNr (28S) de la grande sous-unité des ribosomes est effectué. Au début, seulement la région variable V3 est séquencée. Cependant, quand cette séquence est insuffisante pour établir l'identification, les régions ITS sont aussi séquencées.

Pour réaliser la PCR, un aliquote de 500 µl d'une culture de nuit est centrifugé, le culot est repris dans 50 µl d'eau bidistillée stérile. La suspension est congelée à – 20°C pendant 10 minutes, puis chauffée à 94°C pendant 5 minutes. Ceci est réalisé 2 fois pour faire éclater les cellules. Après centrifugation, 2 µl du surnageant contenant l'ADN sont utilisés pour la réaction PCR.

II. 2. 2. Conditions de la PCR

La région variable V3 5' terminale de l'ADNr 28S est amplifiée avec les amorces fongiques universelles (Fell, 1993) :

❖ V3-1 (5'GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG3')

❖ V3-2 (5'GGTCCGTGTTTCAAGACGG3')

Les concentrations des réactifs sont de l'ordre de 0,2 µM pour les amorces V3-1 et V3-2 ; 2,5 mM de MgCl₂, 200 µM pour chacun des quatre désoxynucléosides triphosphates (dNTP) et 1,25 U de Taq ADN polymérase (PROMEGA) pour 50 µl du mélange réactionnel. L'amplification est performée par 30 cycles dont chacun est composé d'une étape de dénaturation à 94°C pendant 1 min, une étape d'hybridation à 60°C pendant 1 min et une étape d'élongation à 72°C pendant 1 min.

Les régions ITS sont amplifiées en utilisant les amorces fongiques universelles (White *et al.*, 1990) :

❖ ITS-1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG3')

❖ ITS-4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC3')

Les concentrations des réactifs du PCR sont identiques à celles utilisées pour V3-1 et V3-2, avec l'exception de 0,25 µM pour les amorces ITS-1 et ITS-4 et 1,5 mM pour MgCl₂. L'amplification est performée par 35 cycles avec dénaturation à 94°C pendant 1 min., hybridation à 56°C pendant 1 min. et élongation à 72°C pendant 1 min.

Les produits amplifiés sont purifiés en utilisant un kit de purification des produits PCR QIAquick (Qiagen).

II. 2. 3. Visualisation des produits de PCR par électrophorèse

Les produits de PCR amplifiés sont visualisés par électrophorèse sur gel d'agarose en utilisant un système de gel horizontal. L'agarose (Gibco BRL Life Technologies) est utilisé à une concentration de 0,8% (p/v). L'électrophorèse est réalisée dans le tampon TBE (5,4 g de tris base, 2,75 g d'acide borique et 2 ml de 0,5 M EDTA [pH 8,0] dans 1 litre d'eau distillée) à 10 v/cm. Le marqueur de taille utilisé est le 1kb⁺ ADN ladder (Gibco BRL). L'ADN est visualisé par le bromure d'éthidium et photographié sous la lampe UV en utilisant un Transilluminateur GelDoc2000 (Bio-Rad).

II. 2. 4. Séquençage des ADN amplifiés

Les deux brins des produits amplifiés par PCR sont séquencés par la boîte Genome express (France) en utilisant les primers de la PCR.

III. RESULTATS ET DISCUSSION

III. 1. Identification classique

III. 1. 1. Identification du genre

Pour situer les souches de levures sur le plan taxonomique au niveau du genre, nous avons fait appel à trois tests critiques : la morphologie de l'appareil végétal (mycélium ou pseudomycélium), le mode de reproduction (l'organe de fructification ascospores, basidiospores) et un test physiologique basé sur l'assimilation des nitrates. La formation de pellicules peut être aussi un critère générique important.

* ***Pichia*** : (souches 1, 4 et 6)

La reproduction végétative s'effectue par bourgeonnement multilatéral au niveau de la base étroite des cellules. Quelques espèces de ce genre peuvent former des arthrospores. Les cellules sont généralement sphériques, ellipsoïdales, ou allongées et parfois effilées.

Ce genre peut présenter un pseudomycélium ou un vrai mycélium abondant. Les asques sont généralement déhiscentes et rarement persistants, ils produisent 1 à 4 ascospores sous forme de chapeau, hémisphérique, saturne ou sphérique avec une surface lisse. Les asques ne se conjuguent pas habituellement, mais si la conjugaison doit avoir lieu elle s'effectuera entre le bourgeonnement et la cellule parentale ou entre les cellules singulières. Le septum du mycélium ne contient pas de dolipores. Les ascospores ne sont pas formées uniquement et exclusivement sur le mycélium. On note toujours la présence de la forme bourgeonnante même s'il y a présence d'un vrai mycélium. Les espèces du genre *Pichia* sont homothalliques ou hétérothalliques. Les sucres peuvent être ou non fermentés et les nitrates ne sont pas assimilés.

* ***Zygosaccharomyces*** : (souche 8)

La reproduction végétative se fait par bourgeonnement multilatéral. Les cellules végétatives ont une forme globulaire, ellipsoïdale ou cylindrique. Le pseudomycélium peut être formé avec absence du septum. La phase végétative prédominante est la phase haploïde. La conjugaison se fait habituellement entre les cellules singulières, et parfois entre la cellule mère et son bourgeonnement. Cette conjugaison se fait juste avant la formation des asques persistants. Les ascospores ont plusieurs formes, ils sont globulaires à ellipsoïdales avec 1 à 4 par asque. Ce genre est caractérisé aussi par une fermentation très importante et la non assimilation des nitrates. On note aussi une formation tardive de pellicules.

* ***Saccharomyces*** : (souche 9)

La reproduction végétative se fait par bourgeonnement multilatéral. Les cellules ont une forme globulaire, ellipsoïdale ou cylindrique. Le pseudomycélium peut être formé avec absence du septum. La phase végétative prédominante est la phase diploïde (rarement polyploïdes), et les ascospores diploïdes peuvent être formés. La conjugaison aura lieu après la germination des ascospores qui sont de petite taille globulaire ou ellipsoïdale avec une paroi lisse. Les asques sont persistants contenant généralement 1 à 4 spores mais rarement plus. Les espèces de *Saccharomyces* fermentent vigoureusement les sucres et n'assimilent pas les nitrates.

* ***Candida*** : (souches 2, 3, 5, 7, 10 et 12)

Le genre *Candida* est très hétérogène (morphologie, reproduction à l'échelle du genre et de l'espèce). C'est pour cela que le manuel d'identification Kreger-van Rij (1987) a donné une clé spécifique pour classer les espèces appartenant à ce genre.

Le genre *Candida* est caractérisé par une reproduction par bourgeonnement multilatéral. La forme végétative est globulaire, ovoïde, cylindrique, allongée, et rarement triangulaire. Le pseudomycélium peut être absent, rudimentaire ou bien développé, mais le vrai mycélium n'est présent que chez quelques espèces. Les ascospores, les teliospores, les ballistospores, les basidiospores, les blastospores (sous forme d'aiguille) et les arthrospores sont absents, alors que les chlamydospores peuvent être présents. Les polysaccharides extracellulaires peuvent être formés et peuvent donner une coloration verte à violette sous réaction avec l'iode. L'assimilation de l'inositol est variable selon les espèces, les souches qui l'assimilent forment un pseudomycélium. La fermentation des sucres peut être positive ou négative.

Puisque un nombre très élevé d'espèces sont inclus dans ce genre *candida*, celui-ci est subdivisé en 10 groupes en se basant sur des propriétés physiologiques. Le premier groupe inclut seulement les basidiomycètes anamorphes. En général, les basidiomycètes donnent une coloration rouge foncé en présence du réactif : Diazonium Blue B (DBB). Les espèces du groupe 1 sont donc DBB (+). Après vérification dans la clé de ce groupe, aucune de nos souches n'y appartient. Donc, elles sont DBB (-).

La classification des autres groupes qui sont DBB (-), a été basée sur l'utilisation des tests physiologiques suivants : Inositol, nitrates, erythritol, raffinose, maltose, mannitol et galactose.

Nos souches appartiennent aux groupes 3 et 5.

- Groupe 3 : DBB (-), inositol (-), nitrate (+).
- Groupe 5 : DBB (-), inositol (-), nitrate (-), erythritol (+), raffinose (+).

* ***Trichosporon*** : (souche 11)

La reproduction végétative s'effectue par formation d'un vrai mycélium, par arthrospores et par bourgeonnement multilatéral. Les cellules bourgeonnantes présentent plusieurs formes, le pseudomycélium peut être réduit ou bien développé. Le mycélium cloisonné et les arthrospores sont toujours présents et généralement très abondants. Il n'y a production ni d'ascospores, ni de basidiospores, ni de ballistospores et ni de teliospores. Par contre, les endospores asexuelles peuvent être formées. La fermentation peut être positive ou

négative, et la pellicule est généralement formée sur milieu liquide. Chez les espèces de ce genre, il n'y a pas formation d'agglomération cellulaire.

Le genre *Trichosporon* est très hétérogène selon plusieurs auteurs, car il regroupe des espèces à tendance ascomycètes et basidiomycètes. L'état parfait des espèces ascomycètes peut être présent chez plusieurs genres. Cette situation a incité les chercheurs à reclasser les espèces appartenant à ce genre. Pour se faire, ils se sont basés sur l'utilisation des tests supplémentaires d'assimilation des aminoacides et sur l'application de la taxonomie numérique (Dupont et Hedrick, 1971). Depuis, plusieurs espèces ont été transférées vers d'autres genres. Ainsi, Weijman (1979) a classé *Trichosporon* terrestre dans le genre *Geotrichum*. C'est pour cette raison que le «taxonome» doit être vigilant lors de l'utilisation des clés d'identification.

III. 1. 2. Description de l'espèce

*** *Zygosaccharomyces fermentati* : (souche 8)**

Les cellules sont cylindriques, singulières ou en paires. Les colonies sont lisses, brillantes et de couleur blanche avec bordures entières. Le pseudomycélium est absent. La conjugaison se fait généralement entre les cellules singulières et précède la formation des asques. On trouve 2 à 4 ascospores par asque, ils sont globulaires et lisses. Les cultures en bouillon forment souvent des agglutinations.

Zygosaccharomyces fermentati est caractérisée par l'assimilation du cellulose, saccharose, raffinose, galactose, tandis que le lactose, amidon, ribose, rhamnose et l'acide citrique ne sont pas assimilés par cette souche. Elle est aussi caractérisée par la croissance à une température de 37°C.

*** *Saccharomyces cerevisiae* : (souche 9)**

Les cellules sont cylindriques, singulières ou en paires. Les colonies sont de couleur crème légèrement convexes et lisses avec striation lumineuses brillantes. Le pseudomycélium n'est pas formé. Les cellules végétatives sont directement transformées en asques contenant 1 à 4 ascospores petites et globulaires.

Saccharomyces cerevisiae n'assimile ni la cellulose ni le xylose, alors que le saccharose, le galactose et l'amidon sont bien assimilés. Elle est caractérisée aussi par l'absence de pellicule.

*** *Pichia kluyveri* : (souche 4)**

Les cellules sont ovoïdes à allongées, et elles sont sous forme singulière ou en paires. La croissance sur milieu liquide présente une coloration jaune bronzée avec toujours présence de pellicule. Les colonies sont ternes avec bordures entières. Un nombre de 2 à 4 ascospores sous forme de chapeau sont produites dans chaque asque. Le pseudomycélium n'est pas formé.

Pichia kluyveri n'assimile pas la cellulose, le raffinose, le maltose, le xylose et elle est incapable de croître sur un milieu non vitaminé. Elle ne fermente pas le maltose et elle est caractérisée par une fermentation rapide du glucose.

*** *Pichia membranaefaciens* : (souches 1 et 6)**

Les cellules sont ovoïdes à allongées, elles se présentent sous forme singulière ou en paires. La croissance sur milieu liquide présente une coloration jaunâtre bronzée accompagnée par la formation d'une pellicule. Les colonies sont blanche-jaunâtre, mates, lisses à rides avec bordures irrégulières. Nous n'avons pas observé la formation de pseudomycélium. Les asques peuvent ne pas se conjuguer ou montrent des conjugaisons entre les cellules indépendantes ou entre la cellule mère et son bourgeonnement. Généralement, 1 à 4 spores sont formées par asque. Dans notre cas nous avons noté la présence même de 6 spores par asque. Les spores peuvent être sphériques ou hémisphériques et avec ou sans bordure.

Pichia membranaefaciens n'assimile pas la cellulose, le raffinose et le mannose. Elle se caractérise aussi par une croissance sur milieu sans vitamines et une fermentation très lente du glucose.

*** *Candida boidinii* : (souches 2, 3 et 10)**

Cette espèce appartient au groupe 3 : DBB (-), inositol (-), nitrate (+).

Les cellules sont allongées, ovoïdes à sphériques. Une couche de pellicule en poudre est toujours présente. Les colonies sont colorées en crème, ternes et rugueuses. Les gros pseudomycéliums montrent des ramifications. Les courts pseudomycéliums sont arrangés en forme d'arbre. Les blastospores sont ovoïdes et se présentent en amas.

Candida boidinii est caractérisée par la fermentation du glucose et l'assimilation de l'erythritol. La cellulose et le rhamnose ne sont pas assimilés.

* ***Candida diddensiae*** : (souches 5 et 7)

Cette espèce appartient aussi au groupe 3.

Les cellules sont généralement ovales, et sont singulières ou en paires. Elles peuvent être présentées aussi sous forme triangulaire, allongée à filamenteuse. Les colonies sont blanchâtres à crème, rugueuses, peuvent apparaître plate, ronde et creusées au centre.

Le pseudomycélium est formé et présente des branches de chaînes de cellules allongées avec un amas de blastospores dont les bordures apparaissent ondulées.

Candida diddensiae est caractérisée par la fermentation du glucose et l'assimilation du maltose et du galactose. Elle n'assimile ni le rhamnose ni le lactose, et elle peut croître à une température de 37°C.

* ***Candida wickerhamii*** : (souche 12)

Cette souche appartient au groupe 5 : DBB (-), inositol (-), nitrate (-), erythritol (+), raffinose (+).

Les cellules sont sphériques. Les colonies sont jaune-grisâtres, ternes à brillantes, molles et lisses. Le pseudomycélium n'est pas formé.

Candida wickerhamii assimile la cellulose, galactose et le xylose, alors que le maltose n'est pas assimilé. Elle est caractérisée aussi par la fermentation du glucose et la croissance à une température de 37°C.

* ***Trichosporon terrestre* ou *Geotrichum terrestre*** : (Souche 11)

Trichosporon terrestre et le synonyme de *Geotrichum terrestre* (Weijman, 1979).

Le mycélium cloisonné formé est très abondant. Les arthrospores et quelques pseudomycéliums sont aussi présents. Les cellules bourgeonnantes détachées sont petites ovales à allongées. Les colonies sont de couleur crème, sèches, molles, bombées et délicatement ridées avec des bordures lobées. Les blastospores sont présents sur le mycélium à côté des septums et entre eux. Les blastospores peuvent être seules, en chaînes ou parfois en amas. Les arthrospores varient en longueur, et peuvent être très petites et sphériques. Le septum contient des plasmodemes arrangés de façon aléatoire.

Trichosporon terrestre est caractérisée par la croissance à 37°C et par l'assimilation des nitrates. Elle est la seule espèce ascomycètes qui assimile les nitrates.

Les résultats de la caractérisation morphologique, physiologique et biochimique des souches étudiées sont représentés dans le tableau 27.

Tableau 27 : Caractérisation morphologique, physiologique et biochimique des souches isolées des margines.

	Souches identifiées							
	1, 6	2, 3, 10	4	5, 7	8	9	11	12
Croissance à 37°C	+	-	+	(+)	(+)	+	(+)	(-)
Croissance à 42°C	-	-	-	-	-	-	-	-
Pellicule	(+)	+	(+)	-	-	(-)	+	-
Mycélium	-	+	-	+	-	-	+	-
Spores	Asco-spores	Blasto-spores	Asco-spores	Blasto-spores	Asco-spores	Asco-spores	Blasto et Arthro-spores	Blasto-spores
Urease	+	-	+	-	+	+	-	-
Assimilation de NO ₃ ⁻	-	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
Milieu sans vitamines	(+)	+	(-)	±	-	±	+	+
Présence de cycloheximide	-	+	-	-	+	-	+	+
Fermentation des sucres								
Glucose	(+)	(+)	(+)	(+)	+	+	+	(+)
Galactose	-	-	-	-	+	+	-	-
Saccharose	-	-	-	-	+	+	-	+
Maltose	-	+	(-)	-	+	+	-	-
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-
Tréhalose	-	-	-	+	+	+	-	-
Assimilation du composé carbonique								
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	-	-	-	(+)	(+)	(+)	+	(+)
Saccharose	-	+	+	+	(+)	(+)	+	+
Maltose	-	-	(-)	(+)	-	-	+	(-)
Cellobiose	(-)	(-)	(-)	+	(+)	(-)	±	(+)
Trehalose	+	+	+	+	+	-	+	-
Lactose	-	-	-	(-)	(-)	-	-	-
Raffinose	(-)	-	(-)	(-)	(+)	±	+	±
Amidon	-	-	-	-	(-)	(+)	-	-
Xylose	-	+	(-)	-	-	(-)	+	(+)
Arabinose	-	+	-	+	-	-	+	-
Ribose	-	+	-	±	(-)	-	+	-
Rhamnose	+	(-)	+	(-)	(-)	-	+	-
Erythritol	-	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	+	-
Ribitol	-	+	-	+	-	-	+	-
Mannitol	-	+	-	+	-	-	+	-
Acide succinique	+	+	+	+	+	-	+	-
Acide citrique	+	+	+	-	(-)	+	+	+
Inositol	-	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	-	(-)
Melzitose	-	±	-	+	-	-	+	-
Inulin	-	+	-	±	+	-	+	-
Arbutine	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannose	(-)	+	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	-	+	-	-	-	-	+	-
Dextran	-	±	±	-	-	-	+	-
Méthyle glucoside	-	+	-	-	-	-	+	-

(-), (+) : Les caractéristiques clés de chaque souche.

III. 2. Identification moléculaire

Pour s'assurer de la position taxonomique des souches étudiées, nous avons fait appel à une méthode d'identification moléculaire. Cette technique compare les séquences nucléotidiques des ADNr 28S à des séquences de la banque des données.

Selon la phylogénie des levures, il y a une évolution des séquences typiques et spécifiques à l'échelle du genre et de l'espèce.

L'amplification par PCR de la région V3 de l'ADNr 28S des 12 souches de levures a été réalisée, la figure 14 illustre les résultats obtenus.

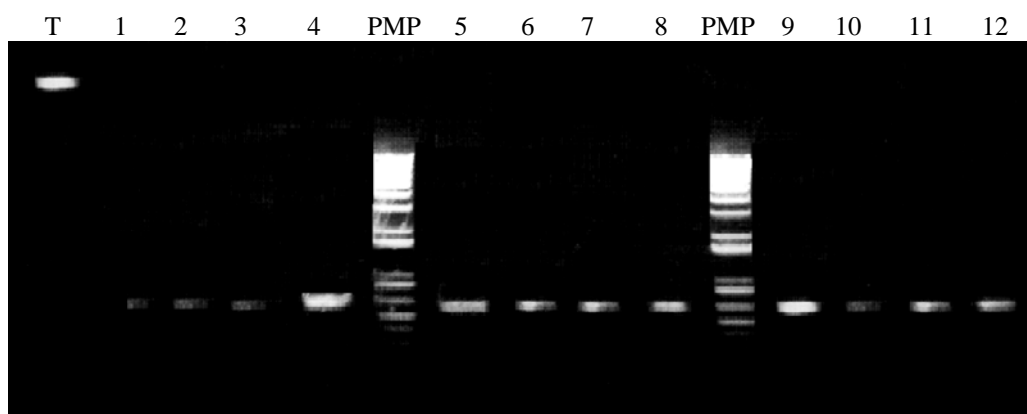


Figure 14 : Electrophorèse en gel d'agarose des produits PCR en utilisant les primers V3-1 et V3-2 des souches de levures.

T : témoin (*E. coli*),

1-12 : produit PCR à partir des souche de levure,

MPM : marqueur de poids moléculaire d'ADN (1kb⁺ ladder).

La figure 14, montre l'amplification d'un fragment PCR de 500 pb, alors qu'aucune amplification n'a été observée dans le témoin négatif contenant l'ADN d'*E. coli* comme matrice. Ceci prouve que nos souches appartiennent à la famille des levures.

Les produits PCR ont été par la suite purifiés par le kit "PCR Wizard" et 3 µl ont été déposés sur gel d'agarose (figure 15).

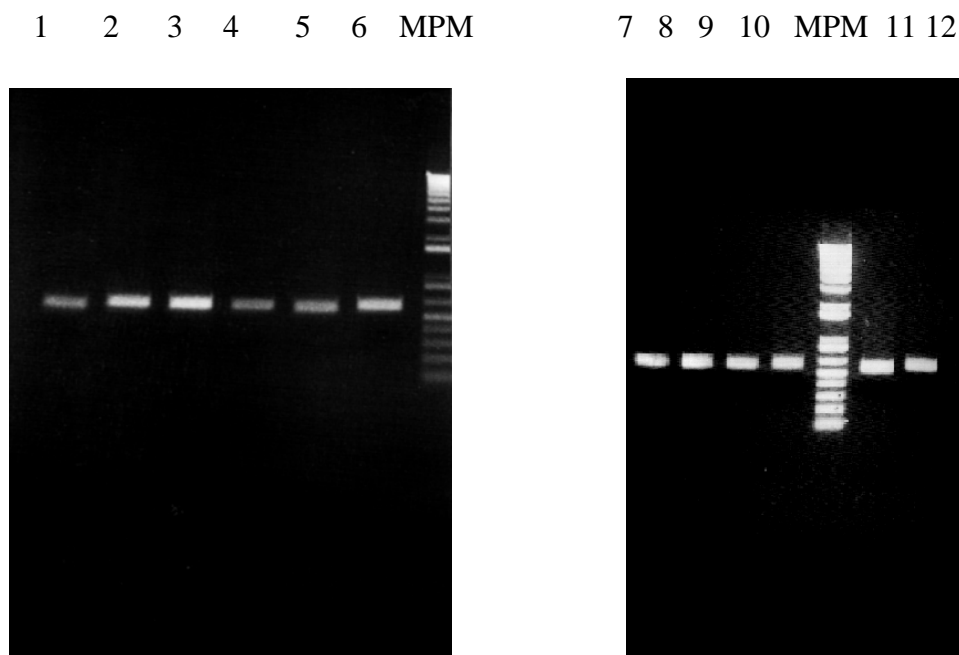


Figure 15 : Electrophorèse en gel d'agarose des produits PCR après purification des souches de levures.

Nous constatons que les solutions PCR ont été concentrées et les bandes deviennent nettes. Ensuite, les produits ont été séquencés, et les séquences obtenues ont été comparées à la banque des données pour déduire leur position taxonomique. Les résultats sont sous forme d'un pourcentage d'identité entre nos séquences d'ADNr et les séquences disponibles dans la banque des données. Seuls les résultats avec un pourcentage d'identité supérieur à 99,5% ont été retenus.

Les séquences de la région V3 amplifiée des souches 1 et 6 sont identiques, de même pour les souches 2, 3 et 10 d'une part et les souches 5 et 7 d'autre part. Ces résultats confirment ceux obtenus par méthode classique.

Les résultats de la comparaison des séquences sont comme suit :

*** Souches 1 et 6 : *Pichia galeiformis* ou *Pichia mandshurica***

La séquence amplifiée est identique à l'ADNr de *Pichia galeiformis* et *Pichia mandshurica* avec un pourcentage de 99,9%.

Dans la clé Kreger-van Rij (1987), *Pichia galeiformis* n'est pas présente. Cependant *Pichia mandshurica* et *Pichia membranaefaciens* sont synonymes d'après Saito (1914). Selon Kodama, Kyono et Kodama (1955), il existe une souche *Pichia membranaefaciens* variété *mandshurica*. Dans la clé d'identification de Barnett *et al.* (1990), *Pichia galeiformis* et *Pichia membranaefaciens* sont synonymes selon Goto *et al.* (1987).

Les résultats de l'identification classique et moléculaire sont compatibles et nous avons gardé le nom de *Pichia membranaefaciens* pour les souches 1 et 6.

*** Souches 5 et 7 : *Candida naeodendra* ou *Candida diddensiae***

La séquence amplifiée est identique à l'ADNr de *Candida naeodendra* et *Candida diddensiae* avec un pourcentage de 99,9%.

C. naeodendra assimile le rhamnose et l'amidon, alors que notre souche ne les assimile pas et *C. diddensiae* est caractérisée dans la clé d'identification par la non assimilation du rhamnose. Cette souche n'est que *Candida diddensiae*. Dans ce cas c'est l'identification classique qui nous a permis de trancher entre les deux espèces trouvées par la méthode moléculaire.

*** Souches 2, 3 et 10 : *Candida boidinii* et *Candida ootensis***

Dans la clé d'identification Kreger-van Rij (1987), la souche *Candida ootensis* n'est pas présente. Dans la clé de Barnett *et al.* (1990), ces deux souches sont presque identiques. La différence réside dans le fait que *C. boidinii* est caractérisée par l'assimilation des nitrates alors que *C. ootensis* ne l'est pas. Il y a aussi une remarquable différence qui réside dans leur habitat. *C. ootensis* se trouve dans les boues visqueuses au Japon (Barnett *et al.*, 1990). *C. boidinii* est rencontrée dans les effluents de tanneries, sol, olives, mer, les boissons non alcoolisées et le vin (Barnett *et al.*, 1990).

Puisque notre souche assimile le nitrate et son origine est l'olive, elle ne peut être que *Candida boidinii*.

*** Souche 4 : *Pichia kluyveri* ou *Pichia fermentans***

Ces deux souches sont très proches, la seule différence réside dans l'assimilation du xylose. Notre souche n'assimile pas le xylose et *Pichia kluyveri* est caractérisée selon la clé de Kreger-van Rij (1987) par la non assimilation de ce sucre, par conséquent notre souche ne peut être que *Pichia kluyveri*.

*** Souche 8 : *Zygosaccharomyces fermentati***

Dans ce cas, l'approche moléculaire donne une seule espèce sans ambiguïté. Ce résultat est identique à celui de l'approche classique.

Notre souche est donc *Zygosaccharomyces fermentati*.

*** Souche 9 : *Saccharomyces cerevisiae* ou *Saccharomyces ellipsoideus***

Dans la clé Kreger-van Rij (1987), des auteurs comme Hansen (1883) considèrent ces deux espèces comme synonymes. Il existe aussi la souche *Saccharomyces cerevisiae* variété *ellipsoideus* selon Stelling-Dekker (1931). Donc, nous avons gardé le nom de *Saccharomyces cerevisiae* pour notre souche.

*** Souche 11 : *Galactomyces sp.***

Dans ce cas, l'interrogation de la banque des données a donné comme résultat le genre *Galactomyces*. Donc, nous avons pris en considération les résultats de l'identification classique. Puisque dans la clé de Kreger-van Rij (1987), les espèces *Trichosporon terrestre* et *Geotrichum terrestre* sont considérées comme synonymes, nous avons gardé le nom de *Geotrichum terrestre* pour notre souche.

*** Souche 12 : *Candida wickerhamii***

Pour la souche 12, l'approche moléculaire confirme sans ambiguïté les résultats de l'identification par approche classique.

IV. CONCLUSION

L'identification classique des souches de levures a permis de déduire la position taxonomique de chaque souche au niveau de l'espèce. Mais, le temps de cette étude est considérable surtout que tous les tests sont effectués en double et en triple afin de minimiser

l'erreur. Cependant, l'avantage de cette méthode est qu'elle permet de bien connaître les caractéristiques biochimiques et physiologiques propres aux souches testées. Ce qui nous permettrait de sélectionner des souches à intérêt biotechnologique sur le plan environnemental et industriel et de découvrir des espèces nouvelles.

Cette étude met en œuvre le rôle important que joue la méthode classique dans l'identification des levures.

En revanche, la technique d'identification moléculaire est très rapide, mais nécessite la consommation des réactifs coûteux et l'utilisation des appareils sophistiqués.

Dans notre cas, l'amplification et le séquençage de la région V3 de l'ADNr donnent parfois le choix entre 2 souches très proches dans leur structure génomique et parfois, n'indique la position taxonomique qu'au niveau du genre ou de l'ordre (cas de la souche 11). Ceci peut être pallié par l'amplification et le séquençage d'autres régions très spécifiques.

Néanmoins, l'utilisation des tests morphologiques, biochimiques ou physiologiques qui présentent les caractéristiques clés de chaque souche reste complémentaire au test moléculaire.

La méthode moléculaire reste fiable aussi pour des souches rencontrées dans le domaine médical comme les souches pathogènes (*Candida albicans*, *Candida glabrata*, ...). Elle joue aussi un rôle important en industrie; en permettant la différenciation entre la souche employée (*Saccharomyces cerevisiae*) et les autres souches pouvant contaminer les cycles de fermentation.

En guise de conclusion, cette partie de travail montre qu'à la fois la méthode classique et la méthode moléculaire par amplification de V3 de l'ADNr sont complémentaires et concordantes de point vu résultats de la situation taxonomique des souches identifiées.

I. INTRODUCTION

Vu la forte charge organique et les quantités produites annuellement, le rejet des margines constitue actuellement un problème environnemental majeur particulièrement pour les pays du bassin méditerranéen.

Le problème fondamental rencontré lors de l'application de différents procédés de traitement des margines, est la hausse des charges financières. C'est ainsi que notre laboratoire s'est orienté vers l'usage de voies biologiques qui exploitent la flexibilité métabolique des souches adaptées à la dégradation des composés phénoliques. Ce type de traitement des margines présente des retombés économiques sur le coût de traitement.

D'après l'étude de la première partie de ce travail, nous disposons d'une collection importante de micro-organismes isolée des margines. Ces souches pourront jouer un rôle considérable dans la décomposition de la matière organique et en particulier les composés phénoliques des margines.

Avant de commencer l'étude du traitement biologique des margines par ces souches, nous avons jugé intéressant de faire une étude préliminaire pour sélectionner celles qui peuvent être efficaces pour l'épuration des margines.

Dans ce chapitre, nous avons étudié le traitement des margines par les souches sélectionnées. Le traitement aérobie via des souches pures a été l'objectif de plusieurs travaux de recherche. Cependant, la présente étude constitue l'une des premières à tester l'effet de l'adaptation des micro-organismes à croître sur des concentrations croissantes en margines sur le traitement des margines brutes.

II. MATERIEL ET METHODES

II. 1. Echantillonnage

Cette étude a porté sur des margines fraîches provenant d'une huilerie industrielle située à Doukkarat dans la ville de Fès, durant la campagne oléicole 2001-2002.

Les prélèvements sont effectués dans des flacons stérilisés au préalable, puis transportés rapidement au laboratoire dans des glacières à une température de 4°C. Ensuite, ils sont stockés à - 20°C pour une utilisation ultérieure.

Les caractéristiques physico-chimiques des margines à traiter sont présentées dans le tableau 28.

Tableau 28 : Composition physico-chimique des margines fraîches.

Paramètres	Teneur
PH	5
DCO (g d'O ₂ . l ⁻¹)	82
Composés phénoliques (g.l ⁻¹)	3,2
MES (g.l ⁻¹)	2,8
MS (g.l ⁻¹)	20
MV (g.l ⁻¹)	18

II. 2. Choix des souches pour cette étude

Dans le but de sélectionner des souches capables de traiter les margines, nous avons choisi les micro-organismes isolés et identifiés durant la 1^{ère} partie de ce travail. Ces souches vont être testées pour leur capacité à dégrader les composés phénoliques. Elles sont les suivants :

- Huit espèces de levures : *Candida boidinii*, *Candida diddensiae*, *Candida wickerhamii*, *Pichia kluyveri*, *Pichia membranaefaciens*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Geotrichum terrestre* et *Zygosaccharomyces fermentati*.
- Deux espèces de champignons : *Penicillium sp.* et *Aspergillus niger*.
- Une bactérie : *Pseudomonas sp.*

II. 3. Sélection des souches choisies

Cette recherche est basée sur l'étude de la croissance des onze souches choisies sur différents milieux de cultures. Le milieu de base est le milieu minimum Yeast Nitrogen Base agar (YNB-agar) défini par Wikerham (1951), auquel est ajouté la source carbonée sous forme d'acide tannique, d'acide oléique, d'acide gallique, de pyrogallol, de phénol ou de catéchol à une concentration de 0,5%. Les composés phénoliques extraits des margines ont été ajoutés aussi comme source de carbone à ce milieu. L'assimilation d'un composé organique se traduit par une croissance de la souche testée dans le milieu gélosé à 30°C pendant 3 à 7 jours d'incubation. Le milieu YNB-agar contenant le glucose à 0,5% est utilisé comme témoin positif. Le même milieu exempt de source de carbone représente le témoin négatif.

II. 4. Biotraitement

Deux espèces de levures *Candida boidinii* et *Geotrichum terrestre* et deux espèce de champignons *Penicillium sp.* et *Aspergillus niger* sont sélectionnées pour le traitement des

margines. Ces souches ont été mises en conservation « adaptative » dans un milieu gélosé contenant 25% de margines diluées dans de l'eau de robinet, 0,1% d'extrait de levure, 0,5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,4 % de KH_2PO_4 , 0,05% MgSO_4 , 0,05% NaCl et 2% d'agar. Le milieu de culture est stérilisé à l'autoclave à 120°C pendant 20 minutes. Les boîtes de Pétri sont ensuite ensemencées par les 4 souches choisies et mises en incubation dans une étuve à 30°C pendant 48 heures pour les levures et 72 heures pour les champignons. Leur conservation est effectuée à 4°C. La culture des souches est renouvelée tous les 15 jours.

II. 4. 1. Préparation de la préculture

Pour le traitement des margines, la préparation de l'inoculum est nécessaire. Ainsi, des volumes de 100 ml d'un milieu de culture liquide sont mis dans des Erlenmeyers de 250 ml. Ce milieu est composé de margines à 25% additionnées de sels appropriés (voir composition ci-dessus), et le pH est ajusté à 5. Ces Erlenmeyers sont stérilisés par autoclavage à une température de 120°C pendant 20 minutes. Ensuite, ces milieux sont inoculés par une biomasse importante préalablement adaptée à croître sur le même milieu gélosé. Comme la taille de l'inoculum influence d'une manière critique le taux de croissance et de dégradation des composés phénoliques (Sayadi et Ellouz, 1992), les Erlenmeyers sont inoculés avec une biomasse de levures correspondant à 10^9 cellules.ml⁻¹, et une concentration optimale de 10^7 spores.ml⁻¹ pour les champignons. Les cultures sont mises en incubation à l'obscurité pendant 18 heures à 30°C sous agitation horizontale. Au bout de ce temps, la biomasse récoltée après centrifugation est utilisée pour inoculer le premier milieu contenant une concentration de 25% des margines.

- **Enumération des levures** : Une série de dilutions de la biomasse prélevée des boîtes dans de l'eau physiologique (NaCl à 0,9%) est effectuée. Le comptage des levures est réalisé à l'aide d'une cellule de thomas.

- **Enumération des spores des champignons** : La biomasse prélevée des boîtes est mise dans un tube Eppendorf contenant des billes de verre et de l'eau physiologique. Le tube est mélangé à l'aide d'un vortex pour que les sporanges s'éclatent et libèrent les spores. Le comptage des spores est effectué aussi par cellule de thomas.

II. 4. 2. Mise en culture

- Préparation des milieux de culture :

Les cultures liquides sont faites en duplicata dans des Erlenmeyers de 250 ml contenant 100 ml d'une solution de margines. Celle-ci est composée de 25%, 50%, 75% ou de 100% (v/v) des margines diluées dans de l'eau de robinet. Les milieux sont additionnés d'une source d'azote (0,35% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) et de phosphate (0,065% de KH_2PO_4) nécessaires à l'assimilation des composés phénoliques par les micro-organismes et à la production de la biomasse. Tous les milieux sont stérilisés à l'autoclave à 120°C pendant 20 minutes.

- Inoculation des milieux de cultures :

La biomasse de la préculture déjà préparée est utilisée pour inoculer le milieu de margines à 25% à traiter. Après incubation à 30°C sous agitation pendant 36 heures, un échantillon de 5 ml est prélevé et centrifugé. Le culot sert à évaluer la biomasse produite, le surnageant est utilisé pour doser les composés phénoliques et la DCO soluble. Le reste de la culture est centrifugé et le culot est utilisé pour ensemercer le milieu contenant les margines à 50%. Le même protocole est suivi pour inoculer les margines à 75% et 100% (figure 16). Pour le dernier milieu à 100%, une fois le prélèvement de 36 heures est effectué, l'incubation est réalisée pendant un mois. Un suivi tous les 3 jours de l'évolution des composés phénoliques, de la DCO soluble, de la biomasse produite et du pH est effectué. En parallèle, un essai témoin est réalisé avec des margines brutes, stériles et nonensemencées.

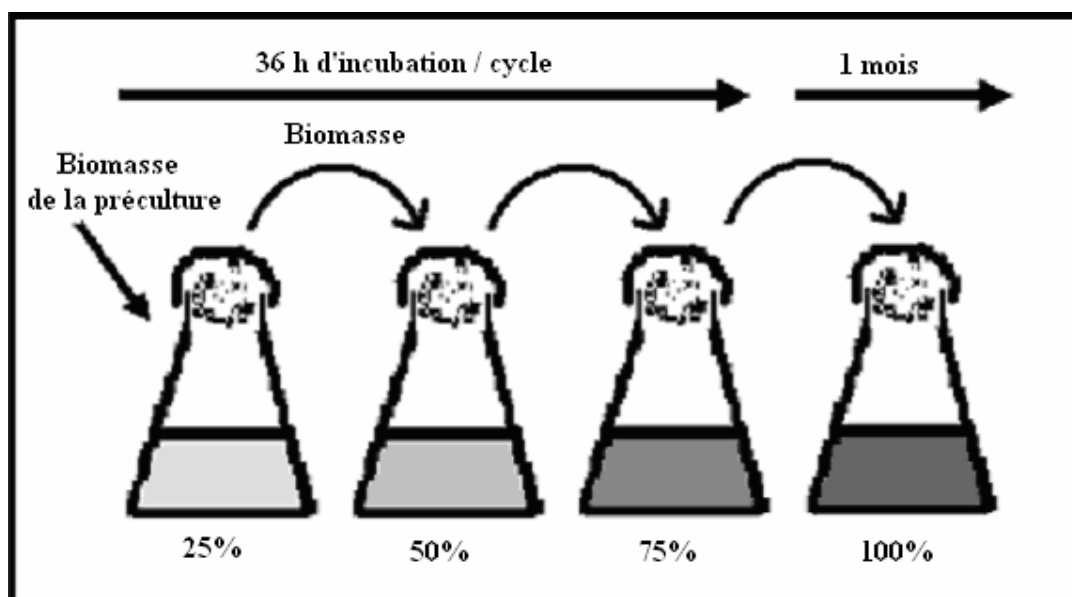


Figure 16 : Schéma synoptique du traitement en cascade des margines avec les souches étudiées.

II. 5. Analyses physico-chimiques

Le pH, la DCO, les MES, la MS et la MV sont effectués selon les méthodes décrites dans le premier chapitre (Rodier, 1996).

Les composés phénoliques sont déterminés par la méthode spectrophotométrique élaborée par Maestro-Duran *et al.* (1991). Elle est basée sur la réduction d'un mélange d'acide phosphotungstique (Réactif de Folin-Dennis). Les monophénols et les polyphénols réduisent ce réactif à un mélange bleu d'oxyde de tungstène et de molybdène. La coloration produite présente un maximum d'absorption à 600 nm. Les résultats sont exprimés en équivalent de gramme d'acide tannique par litre d'échantillon utilisé dans la gamme étalon.

L'extraction des composés phénoliques des margines est effectuée par la technique décrite par Macheix *et al.* (1990). A 20 ml de margines préalablement acidifiées par l'acide métaphosphorique à 2% (1/10 ; v/v) pour empêcher l'oxydation des composés phénoliques, un volume égal (v/v) de sulfate d'ammonium à 40% est ajouté afin d'augmenter la force ionique du milieu. Le mélange subit ensuite 3 fois une délipidation par le même volume de l'hexane. L'extraction des composés phénoliques est effectuée par l'acétate d'éthyle pur (3v). Après évaporation de la phase supérieure, le résidu est repris dans le méthanol.

La biomasse sèche est déterminée par centrifugation d'un volume de 5 ml du milieu de culture. Le culot est séché à 105°C pendant 24 heures. La différence entre le poids du tube vide et séché donne la biomasse sèche en g.l⁻¹. Le surnageant est soumis aux analyses de composés phénoliques, de la DCO soluble et du pH.

Tous les essais ont été réalisés en triples. Les résultats portés sur les figures et les tableaux sont les moyennes des mesures effectuées.

III. RESULTATS ET DISCUSSION

III. 1. Caractérisation des souches de levures et des champignons

Le stockage des margines dans les bassins de la station d'évaporation naturelle pendant plusieurs mois entraîne la polymérisation des composés phénoliques (Assas *et al.*, 2002). Ce qui rendrait difficile leur biodégradation. Pour cela, et dans le but d'étudier le traitement des margines par nos souches, nous avons choisi les margines fraîches provenant d'une huilerie industrielle. L'étude physico-chimique de ces margines a montré qu'elles sont caractérisées par une DCO de l'ordre de 80 g d'O₂.l⁻¹ et renferment une teneur en composés phénoliques de 3,2 g.l⁻¹.

Avant d'entamer le traitement biologique de ces margines, nous avons opté pour une sélection des souches capables d'assimiler les composés phénoliques. Pour ceci, nous avons testé la croissance des onze souches sur milieu minimum (YNB) auquel est ajouté plusieurs sources de carbone telles que : l'acide tannique, l'acide oléique, l'acide gallique, le pyrogallol, le catéchol, le phénol ou les composés phénoliques extraits des margines. Ces composés organiques testés donnent une idée sur le métabolisme des composés phénoliques et lipidiques. Les résultats de cette étude sont présentés dans le tableau 29.

Tableau 29 : Etude de la croissance des micro-organismes isolés des margines sur les différentes sources de carbone.

	Acide oléique	Acide tannique	Acide gallique	Catéchol	Pyrogallol	Phénol	Composés phénoliques
<i>Pseudomonas sp.</i>	±	-	-	-	-	-	-
<i>C. boidinii</i>	+++	++	++	++	++	+	+
<i>C. diddensiae</i>	++	-	+	+	±	±	+
<i>C. wickerhamii</i>	±	-	-	+	-	-	+
<i>G. terrestre</i>	+++	+	+	+	+	+	+
<i>P. kluyveri</i>	±	±	+	±	-	±	±
<i>P. membranaefaciens</i>	+	±	-	+	±	-	+
<i>S. cerevisiae</i>	±	-	-	±	-	-	±
<i>Z. fermentati</i>	±	-	-	±	±	-	±
<i>A. niger</i>	©	©	©	©	++	+++	+++
<i>Penicillium sp.</i>	©	+++	+++	+	+	+	+

- : Pas de croissance
- ± : Survie
- +
- ++ : Croissance importante
- +++ : Croissance très importante
- © : Présence d'auréole de dégradation.

D'après le tableau 29, nous remarquons que les souches qui se sont développées sur toutes les sources de carbone étudiées sont *Candida boidinii*, *Geotrichum terrestre*, *Penicillium sp.* et *Aspergillus niger*. Les résultats de l'assimilation de ces composés phénoliques testés démontrent bien la flexibilité métabolique dont disposent ces souches.

L'assimilation du catéchol est un bon indicateur des voies métaboliques de la dégradation des composés phénoliques. Ce composé est un métabolite intermédiaire carrefour de la biodégradation des composés phénoliques monocycliques et polycycliques.

L'assimilation de l'acide tannique et de l'acide gallique montre bien l'équipement enzymatique impliqué dans la dégradation des tannins.

L'acide oléique est testé pour cribler les souches capables de métaboliser les huiles résiduelles qui flottent à la surface des margines et forment une pellicule étanche. Ce film lipidique empêche la pénétration de la lumière et par conséquent l'évaporation naturelle des margines. D'ailleurs, la formation de cette couche lipidique est l'inconvénient majeur qui limite l'utilisation du traitement des margines par la technologie d'évaporation naturelle.

A travers ces sources de carbone testées, nous avons sélectionné des souches ayant un métabolisme alternatif très efficace vis à vis de la dégradation des composés phénoliques et lipidiques. De ce fait, nous pouvons dire que les souches *C. boidinii*, *G. terrestre*, *Penicillium sp.* et *A. niger* sont les plus performantes dans la dégradation des composés phénoliques à faible concentration (tableau 29). Nous pouvons donc les choisir pour étudier le biotraitement des margines. Comme celles-ci contiennent de fortes concentrations en composés phénoliques (3,2 g.l⁻¹), nous avons pensé à réaliser une adaptation de ces souches à croître sur des concentrations croissantes en margines avant de les traiter à l'état brute.

III. 2. Traitement des margines en cascade à différentes concentrations par les quatre souches sélectionnées

Une étude préliminaire du traitement biologique des margines à 100% et à 75% par les quatre souches sélectionnées a montré des résultats non satisfaisants.

Dans le but d'améliorer le rendement du traitement biologique, une adaptation des souches à croître sur des milieux à concentrations croissantes en margines a été réalisée. Pour cela, nous avons comparé la capacité des souches *Candida boidinii*, *Geotrichum terrestre*, *Penicillium sp.* et *Aspergillus niger* à traiter, en cultures discontinues (en batch), les margines à 25%, 50%, 75% et à 100%.

III. 2. 1. Dégradation des composés phénoliques

Le taux d'abattement des composés phénoliques par les souches étudiées dans les milieux de culture contenant différentes concentrations en margines est illustré dans la figure 17.

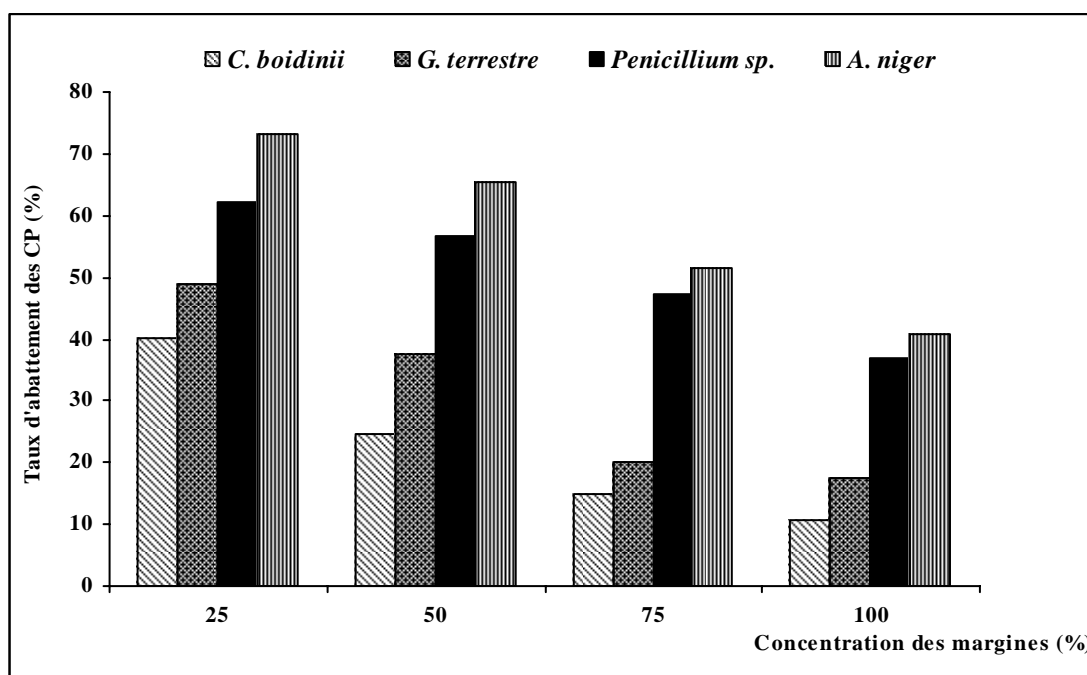


Figure 17 : Taux d'abattement des composés phénoliques (CP) par les quatre souches en fonction de la concentration initiale en margines après 36 h d'incubation.

D'après les résultats rapportés dans la figure 17, on constate que la réduction des composés phénoliques est influencée par la concentration des margines. Plus la concentration est élevée, plus le taux d'abattement des composés phénoliques est faible. Dans les margines à 25%, les taux d'abattement obtenus sont de l'ordre de 40,2% ; 48,8% ; 62,2% et 73,2% en présence de *C. boidinii*, *G. terrestre*, *Penicillium sp.* et *A. niger* respectivement. Par contre dans les margines brutes, le pourcentage de la réduction des composés phénoliques ne dépasse pas 10,6% ; 17,5% ; 36,9% et 40,9% en présence de *C. boidinii*, *G. terrestre*, *Penicillium sp.* et *A. niger* respectivement.

III. 2. 2. Dégradation de la matière organique

Le dosage de la matière organique est exprimé en terme de DCO. La figure 18 représente le taux d'élimination de la DCO par les souches étudiées dans les milieux à différentes concentrations en margines.

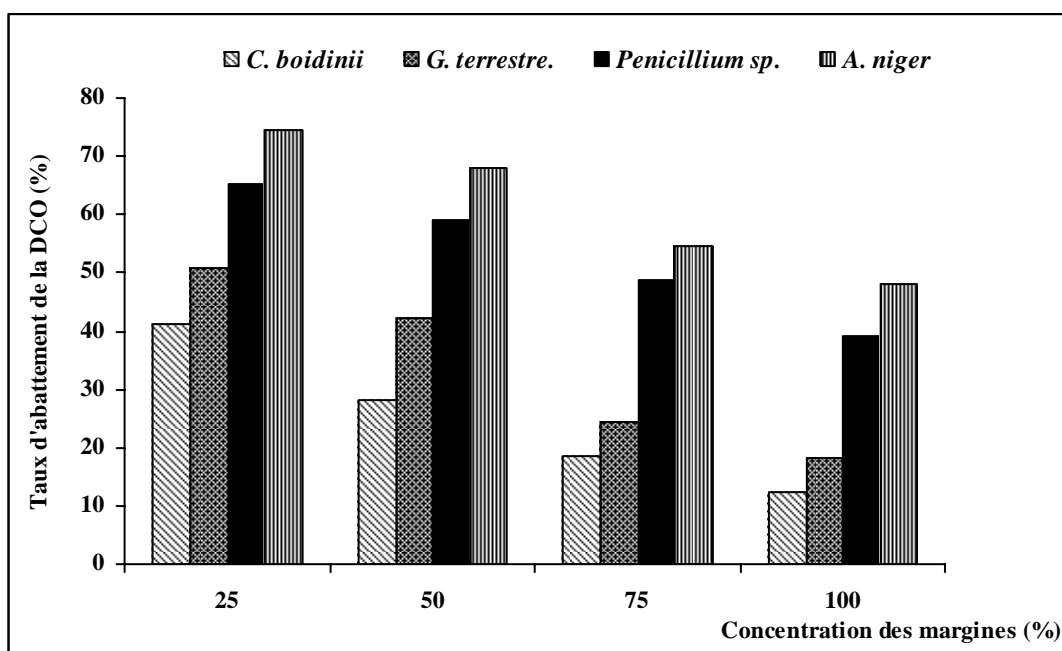


Figure 18 : Taux d'abattement de la DCO soluble en fonction de la concentration initiale en margines par les quatre souches après 36 h d'incubation.

L'analyse des résultats de la figure 18 montre que le pourcentage d'abattement de la matière organique exprimée en terme de DCO décroît avec la diminution de la dilution des margines comme pour les composés phénoliques.

Dans les margines brutes, malgré l'apport d'inoculum déjà adapté à croître sur margines à 75%, la capacité de *C. boidinii* ou *G. terrestre* à éliminer la DCO est faible. Ainsi après 36 heures d'incubation, environ 12,5% et 18,1% de réduction de la DCO sont obtenus respectivement. Par contre en présence des souches *Penicillium sp.* et *A. niger*, cette réduction atteint 35,6% et 48,1% respectivement.

En revanche, le maximum de la diminution de la DCO est observé dans les margines diluées à 25% comme dans le cas des composés phénoliques. Ainsi, des taux d'abattement qui sont de l'ordre de 41,4% ; 50,9% ; 65,1% et 74,5% sont obtenus chez *C. boidinii*, *G. terrestre*, *Penicillium sp.* et *A. niger* respectivement.

III. 2. 3. Dosage de la biomasse produite

Le dosage de la biomasse produite (exprimée en gramme de poids sec par litre) par les souches étudiées dans les milieux à différentes concentrations en margines est illustré dans le tableau 30.

Tableau 30 : Dosage de la biomasse produite dans les margines à différentes concentrations après 36 h d'incubation.

	Biomasse produite (g de poids sec.l ⁻¹)				
	Biomasse de la préculture	25%	50%	75%	100%
<i>C. boidinii</i>	1,7	2,2	2,86	3,4	4,05
<i>G. terrestre</i>	1,9	2,5	3,32	3,91	4,62
<i>Penicillium sp.</i>	2,4	3,2	4,56	5,89	6,8
<i>A. niger</i>	2,2	3	4,24	6,01	7,36

D'après ce tableau, on remarque qu'il y a une production de la biomasse dans les différentes concentrations en margines même à 100%. Ceci suggère que la croissance des souches n'était pas inhibée sur les margines brutes. La biomasse produite atteint 4,05 ; 4,62 ; 6,8 et 7,36 g de poids sec.l⁻¹ sur les margines brutes en présence de *C. boidinii*, *G. terrestre*, *Penicillium sp.* et *A. niger* respectivement.

III. 2. 4. Discussion

D'après les figures (17 et 18) et le tableau 30, on note l'action bénéfique d'un traitement en cascade. Tous les micro-organismes testés sont capables de croître sur les margines à différentes concentrations. L'avantage de cette étude en cascade est l'adaptation des micro-organismes à croître sur les margines et par conséquent à dégrader leur matières organiques.

Puisque la concentration des composés phénoliques est faible sur les margines diluées à 25%, les souches testées arrivent à s'y développer facilement. La biomasse produite sur ce milieu est inoculée sur un autre contenant les margines plus concentrées. L'équipement enzymatique des cellules se trouve déjà stimulé et prêt à dégrader à nouveau d'autres composés phénoliques. En plus, le nombre de cellules est élevé permettant ainsi de réduire davantage la matière organique et de produire une nouvelle biomasse. En présence des margines brutes, malgré que le rendement de la dégradation des composés phénoliques et de la matière organique est faible, nous assistons toujours à une croissance de tous les micro-organismes testés. Cette croissance est évaluée par la biomasse produite (tableau 30).

L'élimination des composés phénoliques et de la DCO est optimale dans les margines diluées à 25% en présence des quatre souches étudiées. L'effet des micro-organismes sur la dégradation de la matière organique est alors affecté par l'élévation de la concentration des margines. Yesilada *et al.* (1998), ont observé que la capacité de *Coriolus versicolor* et *Funalia*

trogii à réduire la DCO et les phénols diminue avec l'augmentation de la concentration initiale des margines. Des résultats similaires ont été observés dans les deux types de biotraitement des margines; la fermentation aérobie (Benitez *et al.*, 1997 ; Fadil *et al.*, 2003) et la digestion anaérobie (Hamdi et Garcia, 1993 ; Gharsallah, 1994).

Les taux d'abattement des composés phénoliques et de la DCO sont donc augmentés par la dilution des margines. Assas *et al.* (2000) ont montré que la décoloration des margines par *Geotrichum candidum* est réduite dans les margines concentrées. Sayadi et Ellouz, (1992) ont trouvé le même résultat pour *Phanerochaete chrysosporium*. Martirani *et al.* (1996) ont reporté que la croissance de *Pleurotus ostreatus* est inhibée dans les margines plus concentré de 20%.

Les résultats obtenus suggèrent que les margines concentrées diminuent l'activité des micro-organismes. Ceci pourrait être expliqué par une réduction de l'activité des micro-organismes par un excès de substrat.

L'inoculation directe de margines brutes par nos souches sans adaptation préalable donne des résultats insatisfaisants voire même négatifs (pas de croissance). Ceci est probablement dû à la nature des margines fortement chargées en polluants organiques, en particulier la présence en grandes concentrations des composés toxiques comme les tannins et les composés phénoliques simples. Certains de ces composés pourraient avoir un effet antimicrobien qui se manifeste par l'altération des membranes cellulaires (Capasso *et al.*, 1995 ; Capasso, 1997). Cependant, après avoir adapté nos souches sur des margines à concentrations croissantes, nous avons constaté qu'il y a un abattement à la fois de la DCO et des composés phénoliques des margines brutes accompagné d'une croissance cellulaire.

En présence des composés phénoliques, le système enzymatique du métabolisme alternatif est activé. Certaines espèces forment des peroxysomes de grande taille qui jouent un rôle important dans la dégradation et la métabolisation des composés phénoliques et lipidiques (Horiguchi *et al.*, 2001b). Plusieurs enzymes participent au métabolisme peroxysomal chez les levures et les champignons. L'action coopérative de ces enzymes aboutit à la dégradation de ces composés et protège les micro-organismes contre l'oxygène activé formé en grande quantité au moment de l'assimilation des composés non glucidiques (Wang *et al.*, 1999 ; Horiguchi *et al.*, 2001a ; Aissam *et al.*, 2002). L'efficacité du métabolisme alternatif réside dans la production d'une gamme d'enzymes à spécificité large. Ceci permet la dégradation de plusieurs composés à structure similaire ou variable en même temps. Donc, certains micro-organismes peuvent dégrader facilement les composés

phénoliques à faibles concentrations grâce à leur équipement enzymatique. Cependant, en présence de fortes concentrations, la majorité des composés phénoliques pourrait se fixer sur les enzymes. Ainsi, l'activité enzymatique serait altérée et les cellules seraient privées de métabolites intermédiaires, d'énergie et du pouvoir réducteur. Et par conséquent la plupart des cellules meurent. Les composés phénoliques à forte concentration agissent aussi sur les structures membranaires. Ils peuvent altérer les macromolécules telles que les protéines. Cette caractéristique est exploitée dans beaucoup de protocoles pour l'extraction de certaines molécules. En effet, le phénol est très utilisé pour éliminer les protéines histones afin d'extraire l'ADN (Sambrook *et al.*, 1989), et les tannins sont utilisés pour précipiter les protéines (Hagerman *et al.*, 1992).

Les résultats montrent également que la capacité d'*A. niger* à assimiler les composés phénoliques est plus élevée que celle des autres micro-organismes. 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 (Seng, 1988). *A. niger* est capable à la fois de dégrader des polymères aromatiques comme les tannins et les anthocyanes et des monomères aromatiques (Kieslich, 1976). En plus, le catéchol qui est un intermédiaire important du catabolisme aérobie des composés aromatiques, est facilement dégradé par *A. niger* grâce à sa catéchol 1,2-dioxygénase (Nninnekar et Vaidyanathan, 1981). La dégradation des huiles est assurée grâce à sa lipase et son système de β -oxydation des acides gras à longue chaîne.

Donc, tous les micro-organismes étudiés sont capables de croître dans les margines. Cette croissance se manifeste par la production de biomasse et la diminution de la charge organique. La dégradation de la matière organique est parallèle à celle des composés phénoliques. Les résultats du traitement des margines à différentes concentrations par les micro-organismes montrent que *Aspergillus niger* est la plus performante suivie de *Penicillium sp.*, de *Geotrichum terrestre* et de *Candida boidinii*.

A la lumière de ces résultats, nous pouvons constater que l'adaptation progressive des souches à croître sur des concentrations croissantes en margines a un effet positif sur le traitement des margines. En effet, sous ces conditions, les souches testées ont permis la dégradation de la matière organique et des composés phénoliques, et la production de la biomasse sur les margines brutes. Néanmoins, le taux d'élimination de la DCO et des composés phénoliques reste faible par rapport à celui enregistré dans les margines diluées. Le rendement pourrait être amélioré par augmentation de la durée de fermentation. Pour cela, nous avons suivi le traitement des margines brutes par ces souches durant un mois.

III. 3. Suivi du traitement des margines brutes durant un mois

A des intervalles de temps bien déterminés (3 jours), des échantillons sont prélevés dans des conditions stériles pour effectuer le dosage des composés phénoliques, de la DCO soluble et de la biomasse produite.

Les résultats du suivi du traitement des margines brutes par les quatre souches sont donnés par les figures 19 et 20.

III. 3. 1. Evolution des composés phénoliques

Les résultats de l'évolution des composés phénoliques pendant un mois (figure 19) montrent qu'en absence de micro-organismes (témoin), la dégradation des composés phénoliques est absente. Ceci suggère que ces composés ne subissent guère une dégradation chimique.

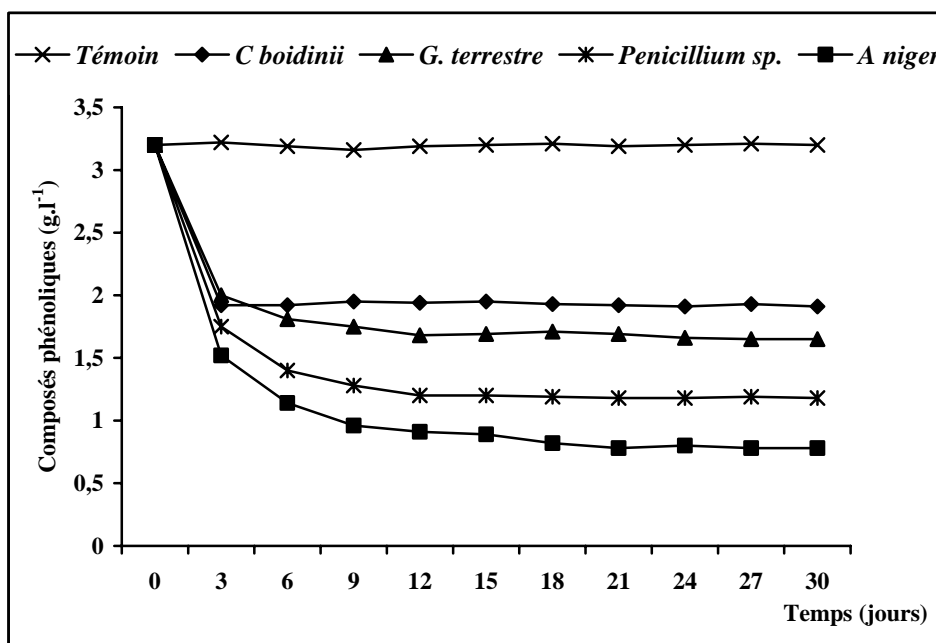


Figure 19 : Evolution des composés phénoliques dans les margines brutes en fonction du temps par les souches étudiées.

En présence des margines brutes, l'activité des quatre souches n'est pas inhibée. La grande part de la dégradation des composés phénoliques est réalisée pendant les 6 premiers jours. Ainsi, en présence de *C. boidinii*, *Penicillium sp.*, *G. terrestre* et *A. niger* la réduction des composés phénoliques est de l'ordre de 40% ; 43,4% ; 56,3% et 64,4% respectivement. Par ailleurs, du 9^{ème} au 30^{ème} jours, le taux de dégradation de ces derniers est faible et reste stable jusqu'au 30^{ème} jour. Le taux d'abattement après 30 jours d'incubation atteint 40,3% ;

48,4% ; 63,1% et 75,6% en présence des souches *C. boidinii*, *G. terrestre*, *Penicillium sp.* et *A. niger* respectivement.

III. 3. 2. Evolution de la DCO

Les résultats de l'évolution de la DCO au cours du temps sont présentés dans la figure 20. L'analyse de ces résultats montre qu'en absence de micro-organismes (témoin), la matière organique exprimée en DCO ne subit pas de dégradation chimique comme pour les composés phénoliques.

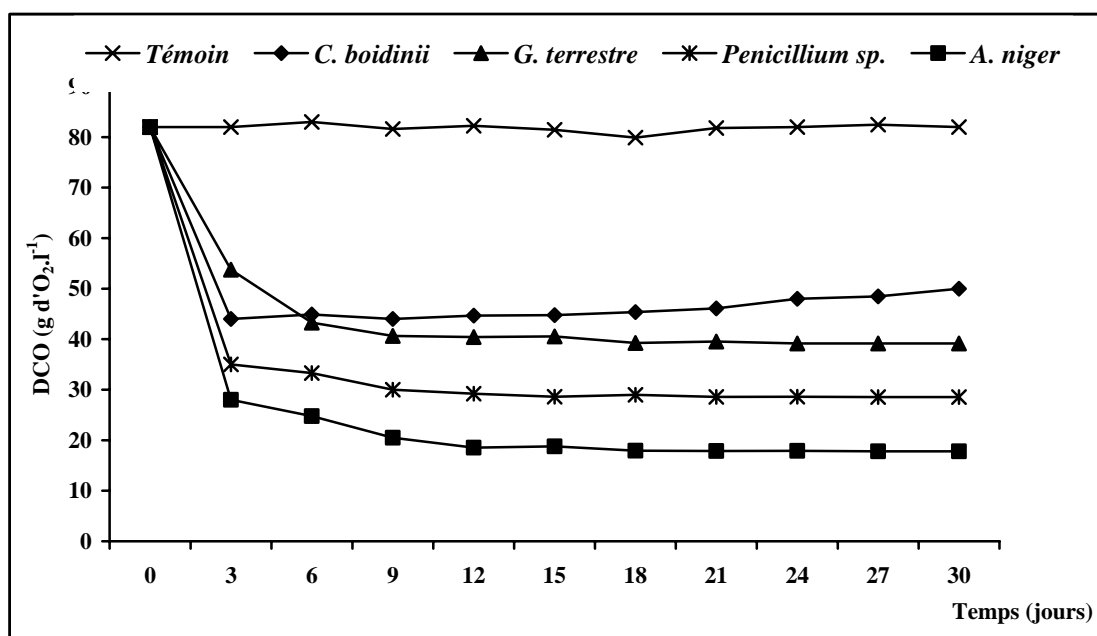


Figure 20 : Evolution de la DCO dans les margines brutes en fonction du temps par les souches étudiées.

La souche *C. boidinii* est capable de réduire environ 46,3% de la DCO des margines traitées juste après 3 jours d'incubation. La DCO atteint une concentration de 44 g d'O₂.l⁻¹ qui reste stable jusqu'au 21^{ème} jour. Après, elle subit une légère augmentation pour atteindre 50 g d'O₂.l⁻¹ au 30^{ème} jour.

En parallèle, les souches *G. terrestre*, *Penicillium sp.* et *A. niger* ont montré une élimination considérable de la DCO de 47,2% ; 59,4% et 69,8% respectivement après 6 jours d'incubation. Les taux d'élimination de la DCO obtenus après 30 jours de traitement sont de l'ordre de 52,2% ; 65,2% et 78,3% en présence de *G. terrestre*, *Penicillium sp.* et *A. niger* respectivement.

III. 3. 3. Evolution de la biomasse produite

La figure 21 montre l'évolution de la biomasse produite au cours du traitement des margines brutes par les souches de levures et de champignons.

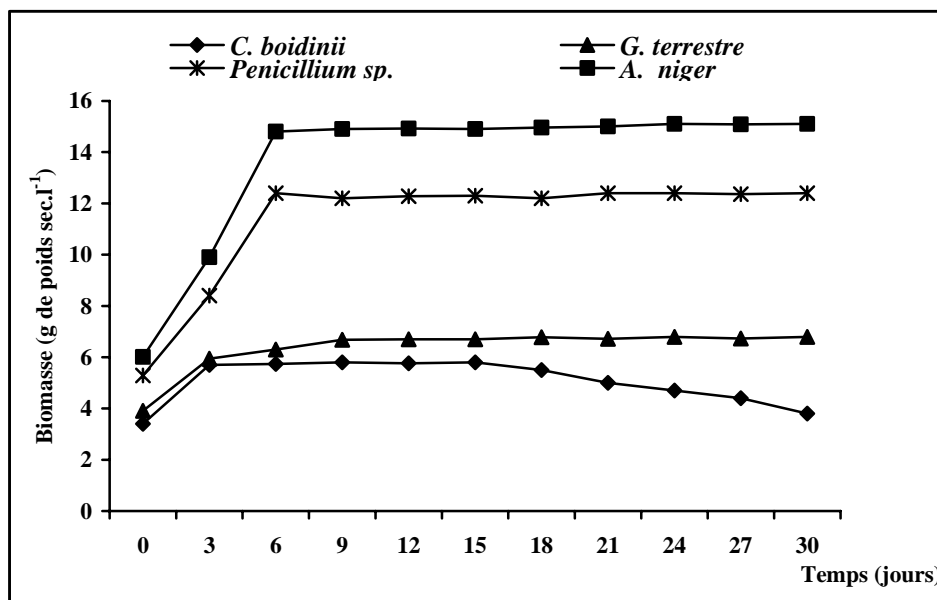


Figure 21 : Evolution de la biomasse produite dans les margines brutes en fonction du temps par les souches étudiées.

La biomasse produite augmente considérablement durant les 6 premiers jours chez les souches. Elle atteint respectivement 5,74 ; 6,3 ; 12,4 et 14,8 g de poids sec.l⁻¹ chez *C. boidinii*, *G. terrestre*, *Penicillium sp.* et *A. niger*. Au delà du 9^{ème} jour, elle reste constante jusqu'au 30^{ème} jours du traitement. Chez *Candida boidinii*, le maximum de la biomasse produite est observé après seulement 3 jours d'incubation et reste stable à 5,8 g de poids sec.l⁻¹ jusqu'au 15^{ème} jour. Puis, la biomasse baisse régulièrement pour atteindre 3,8 g de poids sec.l⁻¹ au 30^{ème} jour.

III. 3. 4. Interprétation des résultats de l'évolution des composés phénoliques, de la DCO et de la biomasse produite

Les figures (19 et 20) nous permet de constater que les courbes évolutives des composés phénoliques présentent la même allure que celle de l'évolution de la DCO soluble. Ce qui nous permet de suggérer l'existence d'une corrélation entre le contenu en composés phénoliques et la DCO. Effectivement, une relation linéaire a été établie entre la réduction des composés phénoliques et celle de la DCO soluble avec un coefficient de corrélation très

significative variant entre 0,97 et 0,98 (figure 22). En effet, plusieurs auteurs ont signalé cette corrélation (Sayadi et Ellouz, 1992 ; Vinciguerra *et al.*, 1995 ; Zenjari *et al.*, 1999).

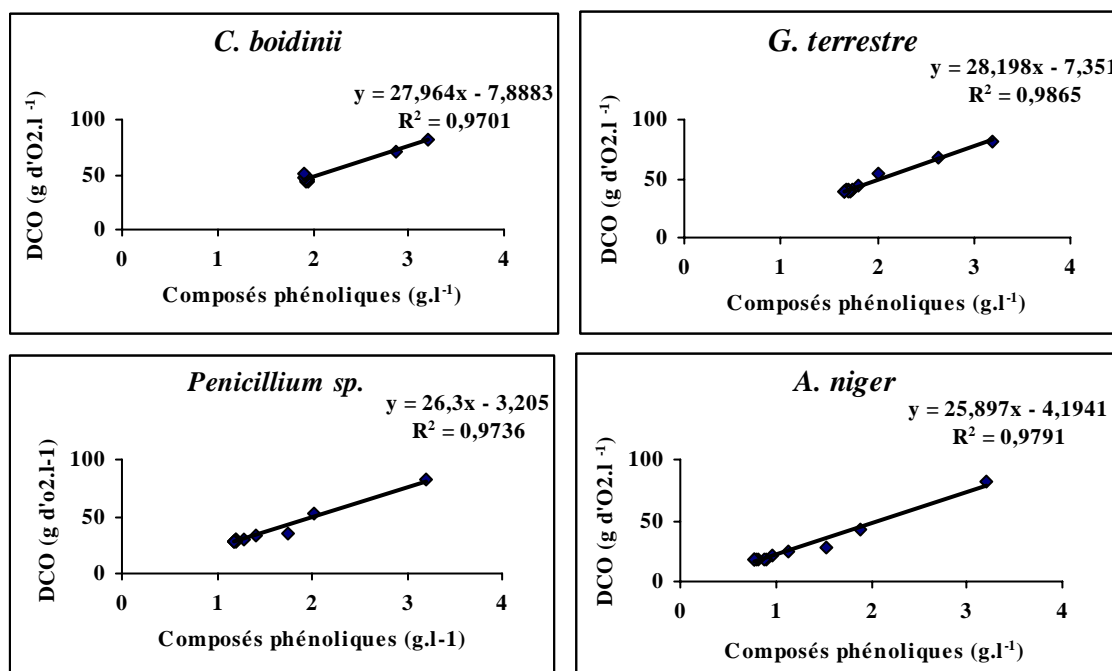


Figure 22 : Corrélation entre l'évolution de la DCO et celle des composés phénoliques.

Cette relation entre la réduction de la DCO et celle des composés phénoliques nous permet de déduire que la biomasse provient des produits du catabolisme des composés phénoliques.

Parallèlement à la diminution de la biomasse produite par *C. boidinii* pendant la deuxième quinzaine du traitement, la concentration de la DCO augmente légèrement de 44 à 50 g d'O₂.l⁻¹ (figure 20). Ceci peut être expliqué par une lyse cellulaire. Un effet semblable a été observé par Gharsallah (1993).

C. boidinii et *G. terrestre* ont montré une élimination considérable des composés phénoliques (40%, 37,5%) après 3 jours, alors que cette élimination n'a pas dépassé 10,6% et 17,5% après 36 heures (figure 19). Ce retard peut être expliqué à la nature des margines fortement chargées en polluants organiques. En plus, les levures présentent un système enzymatique moins performant que celui des champignons dans la dégradation des composés phénoliques.

La rapidité de l'attaque de la matière organique par les deux champignons *Penicillium sp.* et *A. niger* suggère l'implication d'un métabolisme alternatif performant qui

joue un rôle important dans la dégradation des composés phénoliques. Cette biodégradation pourrait s'expliquer par leurs capacités métaboliques dans la dégradation séquentielle des noyaux aromatiques des composés phénoliques à travers les enzymes oxygénase hautement exprimées chez les champignons (Horiguchi *et al.*, 2001b). Ce résultat est en concordance avec celui obtenu par Hamdi *et al.* (1992).

Par contre, on note presque une stabilité de la diminution de la DCO et des composés phénoliques, et de la production de biomasse au delà du 9^{ème} jour dans le cas des quatre souches. Ceci pourrait être attribué à l'épuisement des composés organiques biodégradables dans les milieux de culture, et à la bioconversion en composés phénoliques stables et non biodégradables. En effet, il a été démontré par Hamdi et Ellouz (1993) que l'oxydation des margines entraîne la polymérisation des composés phénoliques simples et forme des tannins résistants à la biodégradation. Ces composés phénoliques qui sont non biodégradables à cause de leur structure complexe et hétérogène (Capasso, 1997) pourraient présenter des activités antibiotiques, antifongiques, antioxydantes ou anticancéreuse. Ceci ouvre d'autres axes de recherche qu'il faudrait développer.

Donc le traitement des margines brutes pourrait être achevé après seulement 6 jours, puisque environ de 90% de la matière organique et des composés phénoliques sont dégradés durant les 6 premiers jours.

III. 3. 5. Evolution du pH

Les résultats de la variation du pH durant le traitement des margines sont montrés dans le tableau 31.

Tableau 31 : Evolution du pH en fonction du temps dans les margines brutes traitées par les souches étudiées.

	0	2	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30
Témoin	5	5	5,1	4,9	5	5	4,9	5	4,9	5	5	5
<i>C. boidinii</i>	5	3,9	3,8	3,8	3,9	3,9	3,9	4,2	4,7	5,6	6	6,2
<i>G. terrestre</i>	5	4,2	4,1	4,1	4,9	4,9	4,9	5	5	5	5	5
<i>Penicillium sp.</i>	5	4,3	4,3	4,2	4,8	4,8	4,8	4,9	4,9	4,9	4,9	4,9
<i>A. niger</i>	5	4,2	4,1	4	5	5,1	5,2	5,2	5,2	5,3	5,3	5,3

D'après les résultats du tableau 31, nous remarquons dans le cas des quatre souches, le pH diminue pendant les 6 premiers jours. Il diminue de 5 à 3,8 ; à 4,1 ; à 4,2 et à 4 en

présence de *C. boidinii*, *G. terrestre*, *Penicillium sp.* et *A. niger* respectivement. Cette baisse du pH pourrait être due à une dégradation des composés phénoliques, ce qui permet une augmentation du taux d'acides organiques par rapport à celui des composés phénoliques dans le milieu réactionnel. Nous pouvons attribuer également cette diminution du pH, à la libération des ions H^+ par les cellules dans le milieu réactionnel. Cette libération s'effectue au moment du transport antiport des acides aminés, des sucres et des composés phénoliques du milieu de culture vers les cellules. L'activité cellulaire se manifeste donc par une baisse du pH, alors que son augmentation pourrait indiquer que les cellules sont en difficulté physiologique.

A partir du 6^{ème} jour on assiste à une augmentation du pH. Il passe de 4,1 à 5, de 4,2 à 4,9 et de 4 à 5,3 en présence de *G. terrestre*, *Penicillium sp.* et *A. niger* respectivement. Ceci est dû probablement à la dégradation des acides phénoliques et organiques portant des groupements COO^- et/ou OH^- comme l'acide lactique et l'acide acétique qui sont présents dans les margines (Ercoli et Ertola, 1983). La disparition de ces composés entraîne une élévation du pH. En plus, l'activité microbienne entraîne une dégradation des protéines en libérant les ions NH_4^+ qui provoque l'augmentation du pH. Cette élévation du pH des margines traitées par rapport aux valeurs initiales a été observée par plusieurs auteurs (Fountoulakis *et al.*, 2002 ; Fadil *et al.*, 2003). Hamdi *et al.* (1992) ont noté une augmentation du pH de 7 à 8,2 lors de la dégradation microbienne des margines. De même, au cours du traitement aérobie des margines par les micro-organismes du sol, Zenjari *et al.* (1999) ont observé que le pH passe de 7,1 à 8,4.

En présence de *C. boidinii*, le pH initial décroît de 5 à 3,8 après 6 jours de fermentation, puis il reste presque stable. Au delà du 18^{ème} jour on assiste à une augmentation considérable du pH qui atteint 6,2 au 30^{ème} jour. Nous pensons que la phase de stabilisation du pH correspond à la phase stationnaire de la levure puisque pendant cette période, il n'y a ni réduction de la DCO ni production de la biomasse. L'augmentation du pH pourrait s'expliquer par la mort et la lyse de la majorité des cellules. Ceci entraîne la libération de certains métabolites essentiellement les protéines dans le milieu réactionnel, provoquant ainsi une alcalinisation du milieu et une augmentation de la DCO (figure 20).

La diminution du pH initial suivi de son élévation durant le traitement des margines a été signalé par plusieurs auteurs. En effet, Gharsallah (1993) a constaté que le pH passe de 5 à 3,9 pour atteindre 4,2 avec *Saccharomyces rouxii* sur les margines. Garcia Garcia *et al.* (2000) ont remarqué une diminution du pH suivi d'une élévation pendant le traitement aérobie des

margines par les souches suivantes : *Phanerochaete chrysosporium*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* et *Geotrichum candidum*. Assas *et al.* (2002) ont noté aussi la même observation durant le traitement des margines fraîches par *Geotrichum candidum*.

III. 4. Discussion

La croissance des quatre souches étudiées dans les margines à concentration croissante a permis le changement de l'équipement enzymatique et l'induction d'un métabolisme alternatif très efficace. Sous ces conditions physiologiques, les cellules synthétisent des enzymes non spécifiques entraînant l'hydrolyse des composés phénoliques à des concentrations élevées. Ce qui permet entre autres, la croissance des levures et des champignons sur la matière organique provenant du catabolisme des composés phénoliques. En effet, certains auteurs ont signalé le rôle important joué par l'induction métabolique des champignons et des levures pour améliorer le traitement des margines (Errachidi, 1997 ; Kahraman et Yesilada, 1999, 2001). Kahraman et Yesilada (1999, 2001) ont montré que l'addition des tiges de coton lors du traitement des margines par les champignons *Coriolus versicolor* et *Funalia troglia*, augmente significativement l'activité de l'enzyme laccase (phénol oxydase).

L'effet bénéfique de l'adaptation des souches a été évalué par la teneur en biomasse produite sur les margines brutes. L'ensemencement des margines à 75% et à 100% par des précultures des quatre souches a montré une faible croissance et une germination rudimentaire des spores. Des observations microscopiques sur *Aspergillus niger* ont montré la germination de quelques spores, mais le mycélium reste rudimentaire n'envahissant pas le milieu de culture. Des tests de survie des souches ont montré que l'adaptation provoque le passage des souches d'un état de survie sous forme d'un pseudomycélium à un état de croissance de cellules en plein bourgeonnement pour les levures dans les margines brutes.

L'adaptation des souches à croître sur de fortes concentrations en margines pourrait se manifester par des changements structuraux au niveau des membranes notamment la composition chimique des lipides membranaires. Ainsi, les acides gras saturés sont remplacés par les acides gras insaturés. Ce qui permet de modifier l'espace hydrophobe pour diminuer d'une part le flux de transport de ces composés phénoliques vers le milieu intracellulaire et d'autre part leur solubilisation par les composés phénoliques.

L'ensemble des résultats obtenus a révélé l'importance de nos souches dans le traitement des margines brutes :

- *Aspergillus niger*

Au cours de cette étude, *Aspergillus niger* a permis d'obtenir le meilleur rendement dans la réduction des composés phénoliques (75,6%) et de la DCO (78,3%) des margines brutes. Ceci montre la performance de notre souche dans le traitement des margines. Un taux d'abattement de la DCO de 50 à 60%, a été enregistré par Hamdi (1991b). Ce qui prouve l'effet bénéfique de l'adaptation sur le rendement de notre souche *A. niger*.

Penicillium sp.

L'étude du traitement des margines brutes par *Penicillium sp.* a révélé les capacités de notre souche à réduire 65,2% de DCO et à dégrader 63,1% des composés phénoliques. Cependant, ce champignon est moins viable que *A. niger* et nécessite un contrôle permanent. Les exigences des conditions de culture des souches de *Penicillium* pourraient être l'une des causes de la rareté des travaux de recherches sur le traitement des margines par ce genre de champignon.

Geotrichum terrestre

La plupart des travaux de recherches du traitement des margines par le genre *Geotrichum* se sont polarisés sur l'espèce *Geotrichum candidum*. Ainsi, il a été démontré par Assas *et al.* (2000) que cette espèce est incapable de traiter les margines brutes. Un bon rendement est obtenu avec les margines diluées à 20% après 6 jours d'incubation (Assas *et al.*, 2002). Le traitement des margines par *Geotrichum candidum* a permis un taux d'abattement de 45,8% de la DCO, alors que la concentration des phénols totaux est restée stable durant le traitement (Garcia Garcia *et al.*, 2000). Selon ces auteurs, cette réduction de la DCO est liée à la dégradation d'autres composés organiques présents dans les margines. La souche *Geotrichum candidum* étudiée n'a donc aucun effet sur la dégradation des phénols. Tous ces résultats mettent en œuvre les qualités avantageuses de notre souche *Geotrichum terrestre*. Elle est capable de croître sur les margines brutes en réduisant 52,2% de DCO et 48,4% des composés phénoliques pour une DCO initiale de 82 g d'O₂.l⁻¹. Ce résultat est proche de celui trouvé par Fadil *et al.* (2003), ils ont obtenu un taux d'abattement des polyphénols de l'ordre de 46,6% en présence de *Geotrichum sp.* mais pour une DCO initiale de 40 g d'O₂.l⁻¹.

Candida boidinii

Notre souche *Candida boidinii* a permis l'élimination de 40% des composés phénoliques et 46,3% de DCO après 3 jours d'incubation. Ces résultats sont légèrement inférieurs à ceux obtenus après optimisation du traitement des margines par *Candida tropicalis* (Fadil *et al.*, 2003). Cette souche a pu dégrader 51,7% des polyphénols et 62,8% de la DCO des margines diluées (DCO initiale de 40 g d'O₂.l⁻¹). Même si ces taux d'abattement sont considérables, le traitement des margines par *Candida tropicalis* reste limité puisqu'elle est considérée comme une souche pathogène. En revanche, *Candida boidinii* présente plusieurs avantages, en plus du fait qu'elle n'est pas pathogène, elle est facile à cultiver et capable de croître sur les margines brutes à une DCO initiale de 82 g d'O₂.l⁻¹ en.

Le rendement du traitement des margines par *C. boidinii* pourrait être amélioré en optimisant les conditions du milieu de culture. *C. boidinii* est très connue dans la littérature par sa capacité à dégrader le méthanol (Hristozova *et al.*, 1994 ; Sakai *et al.*, 1998 ; Aggelis *et al.*, 2000 ; Santovito *et al.*, 2002). De ce fait, l'induction métabolique par addition du méthanol pourrait jouer un rôle important dans l'activation du système enzymatique du métabolisme alternatif. Ce qui pourrait augmenter le rendement de la dégradation des composés phénoliques.

Les champignons sont en général plus efficace que les levures dans le traitement des margines. Ceci est dû probablement à leur système enzymatique plus performant dans la dégradation des composés phénoliques par rapport à celui des levures. En effet, d'après la littérature, le traitement des margines par les souches de levures est très peu étudié. Cependant, leur culture présente plusieurs avantages par rapport à celle des champignons. Elles sont faciles à cultiver et leur temps de génération ne dépasse pas 2 heures, alors que celui des champignons est de 4 à 6 heures. Vu les avantages que présentent les levures, l'optimisation des conditions de leur culture sur les margines pourrait donner de meilleurs résultats. L'immobilisation des cellules de levures ainsi que l'induction métabolique pourraient aussi améliorer le rendement d'épuration de ces rejets (Errachidi, 1997 ; Yesilada *et al.*, 1998 ; Kahraman et Yesilada, 1999, 2001).

IV. CONCLUSION

Notre contribution dans le traitement des margines a été focalisée sur l'adaptation des souches indigènes pour augmenter leur résistance à la toxicité des composés phénoliques générée à forte concentration. Les souches non adaptées n'arrivaient pas à se développer sur les margines brutes, d'où l'intérêt de notre étude.

A partir des résultats obtenus lors de cette étude, nous pouvons conclure que :

- La caractérisation physiologique a montré que les levures *Candida boidinii* et *Geotrichum terrestre*, ainsi que les champignons *Penicillium sp.* et *Aspergillus niger* sont les souches les plus performantes dans l'assimilation des composés phénoliques et lipidiques.
- La capacité des quatre souches à dégrader la matière organique diminue avec l'augmentation de la concentration initiale de la DCO des margines.
- Les souches *A. niger*, *Penicillium sp.*, *G. terrestre* et *C. boidinii* ont permis un taux d'abattement de la DCO de 78,3% ; 63,1% ; 48,4% et 40,3% respectivement après un mois de traitement des margines brutes.
- Cette étude a montré aussi l'intérêt de la souche *Aspergillus niger* qui contribue à la réduction de 78,3% de la DCO et de 63,1% des composés phénoliques.

L'avantage de notre étude réside dans le fait que la biodégradation n'obéit pas à la loi de tout ou rien, mais à des systèmes de modulation et d'adaptation pour faire passer les cellules d'un état physiologique à un autre plus avantage.

I. INTRODUCTION

Durant l'étude du traitement biologique des margines, la souche *Aspergillus niger* a montré sa capacité à dégrader les composés phénoliques. Cependant, le coût de revient de ce traitement est élevé en raison de la consommation des quantités d'eau utilisées dans la dilution des margines. Nous avons donc, orienté notre recherche vers la voie de valorisation des margines en produisant une valeur ajoutée suffisante pour couvrir les charges du traitement.

En général, les souches d'*Aspergillus niger* sont connues par leur croissance marquée sur plusieurs sources de carbone et aussi par leur résistance aux conditions drastiques de l'environnement (Hamdi *et al.*, 1991b, 1991c). A l'échelle industrielle, ces souches offrent plusieurs applications par la production d'enzymes (tableau 32) et d'acides organiques tels que les acides citriques, maliques, fumarique et oxalique.

Tableau 32 : Enzymes produites par *A. niger* et leurs applications à l'échelle industrielle.

Enzyme	Application industrielle
<i>Amylases</i>	Médecine, alimentation, boissons
<i>Anthocyanases</i>	Décoloration des vins rouges
<i>Arabinanases</i>	Hydrolyse des gommes et des mucilages
<i>Glucoamylase</i>	Sirop de glucose à partir d'amidon
<i>Glucose oxydase</i>	Dosage, antioxydants, alimentation
<i>Inulinase</i>	Production de fructose à partir d'inuline
<i>Naringinases xylanases</i>	Hydrolyse des glucosides amers
<i>Pectinases</i>	Clarification des jus de fruits, traitement du café
<i>Protéases</i>	Médecine, alimentation et industrie de cuir
<i>Tannases</i>	Pharmacie, Tanneries, alimentation

A. niger a été aussi largement utilisé dans la valorisation de plusieurs substrats biologiques par la production de protéines d'organismes unicellulaires (POU) ou parfois dans la dépollution (tableau 33).

Tableau 33 : Bioconversion de plusieurs effluents agro-alimentaires par *A. niger*.

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

Les margines renferment un taux non négligeable de tannins hydrolysables, pouvant être dégradés par une enzyme extracellulaire appelée : tannase ou tannin acyl hydrolase (CE 3.1.1.20). Cette enzyme hydrolyse la liaison ester des tannins hydrolysables et produit l'acide gallique et le glucose (Lekha et Lonsane, 1997).

L'enzyme tannase est extrêmement utile dans divers domaines. Elle est utilisée comme inhibiteur de mousse dans le thé et comme clarifiant dans la production de bière et les jus de fruits (Masschelein et Batum, 1981 ; Cantarelli *et al.*, 1989). Elle joue aussi un rôle important en industrie pharmaceutique, surtout dans la fabrication d'un antibiotique appelé trimethoprim qui est un dérivé d'acide gallique (Bajpai et Patil, 1997). Cette enzyme est employée également dans le traitement des effluents des tanneries (Suseela et Nandy 1985). Malgré les vertus que présente cette enzyme, les travaux de recherche sont limités à cause des difficultés de la méthodologie de dosage (Iacazio *et al.*, 2000 ; Sharma *et al.*, 2000).

Bien que plusieurs micro-organismes soient des sources potentielles pour la production de cette enzyme (Bradoo *et al.*, 1997 ; Bajpai et Patil, 1997 ; Lane *et al.*, 1997 ; Sharma *et al.*, 1999), la recherche continue à sélectionner de nouveaux organismes compétents dans la production d'une tannase plus stable et capable de résister aux conditions drastiques des procédés industriels.

Vu le rôle important que joue l'enzyme tannase dans l'environnement et dans l'application industrielle, et puisque les souches d'*A. niger* sont connues par la production de cette enzyme, il nous a paru intéressant d'étudier la production de cette enzyme par notre souche nommée *Aspergillus niger* HA37. Les margines sont utilisées comme substrat puisqu'elles renferment un taux élevé en tannins hydrolysables capables d'induire la production de l'enzyme tannase.

Avant d'entamer l'étude de la production de l'enzyme tannase à partir des margines, nous avons jugé intéressant de commencer par l'étude de cette production en utilisant l'acide tannique comme substrat.

Cette recherche porte sur deux volets :

- Le premier vise l'étude de la production de l'enzyme tannase sur milieu minimum contenant l'acide tannique comme source de carbone à différentes concentrations (0,2% ; 0,5% et 1%).
- Le deuxième volet étudie la production de cette enzyme par *A. niger* HA37 en utilisant les margines diluées à 25% comme milieu de culture.

II. MATERIEL ET METHODES

II. 1. Milieu de culture

Le milieu de culture est un milieu minimum qui contient des concentrations croissantes d'acide tannique (0,2%, 0,5% et 1%).

Dans des Erlenmeyers de 250 ml, des volumes de 50 ml d'un milieu à base d'acide tannique (AT) qui contient 0,065% de K_2HPO_4 et 0,35% de $(NH_4)_2SO_4$ sont préparés. Ces milieux sont stérilisés à l'autoclave à 120°C pendant 20 minutes. L'acide tannique stérilisé par filtration est ajouté aseptiquement au milieu à des concentrations de 0,2% ; 0,5% et 1% (p/v).

Parallèlement, des boîtes de pétri contenant le même milieu additionné de 2% d'agar et 1% d'acide tannique sont préparées (ATA).

Un volume de 50 ml des margines diluées à 25% additionnées de 0,065% de K_2HPO_4 et 0,35% de $(NH_4)_2SO_4$ est mis dans des Erlenmeyers de 250 ml. Ce milieu est stérilisé à l'autoclave à 120°C pendant 20 minutes. Les margines utilisées sont celles étudiées dans le chapitre III.

II. 2. Matériel biologique

Dans cette étude, la souche *Aspergillus niger* HA37 est choisie comme matériel biologique. Elle est isolée des margines de la station d'évaporation naturelle durant la campagne 2000 – 2001.

La souche est stockée sur gélose inclinée (2% de l'extrait de malt, 2% d'agar) à 4°C, et elle est repiquée chaque mois.

II. 3. Inoculation des milieux de culture

A. niger HA37 a été cultivée dans des boîtes de pétri contenant le milieu AT avec 2% d'agar et 0,5% d'acide tannique (ATA). L'incubation est effectuée à 30°C pendant 7 jours pour favoriser la sporulation. A partir des spores formées, le centre des boîtes contenant 1% d'acide tannique est inoculé. L'incubation est réalisée dans une étuve à 30°C pendant 48 heures.

Après dénombrement à l'aide d'une cellule de thomas, 10^7 spores.ml⁻¹ sont inoculées dans chaque Erlenmeyer. Les milieux de culture sont ensuite incubés à 30°C sous agitation horizontale pendant 48 heures pour ceux contenant l'acide tannique, et pendant 96 heures pour ceux des margines.

Des prélèvements de 1 ml sont effectués à des intervalles de 3 heures et le surnagent est utilisé pour le dosage de l'enzyme tannase et des composés phénoliques. La DCO initiale et finale des margines traitées après 96 heures sont dosées selon la méthode décrite dans le chapitre I.

II. 4. Techniques du dosage

II. 4. 1. Dosage du CO₂

Le taux de croissance de la souche *A. niger* HA37 est estimé par le dosage du CO₂ total libéré dans le milieu de culture à base d'acide tannique selon la méthode gravimétrique (Pochon et Tordux, 1962).

Dans des Erlenmeyers de 250 ml à col large contenant 50 ml du milieu de culture, on y trompe des petites bouteilles de 25 ml contenant 20 ml de NaOH (0,2 N). Après l'ajout d'acide tannique stérilisé par filtration, le milieu de culture estensemencé avec les spores de *A. niger* HA37. Le dosage du CO₂ est réalisé au bout de chaque 3 heures. Le CO₂ produit par métabolisation de l'acide tannique par le champignon est neutralisé par un léger excès d'une solution de NaOH. Le taux de cette consommation est ensuite déterminé à l'aide d'une solution d'acide chlorhydrique (0,02 N) en présence de chlorures de Baryum.

II. 4. 2. Dosage de l'acide tannique et des composés phénoliques

Ils sont dosés par la méthode Maestro-Duran *et al.* (1991) décrite dans le chapitre III. Le choix de cette technique est basé sur le fait que l'acide tannique est un composé phénolique.

II. 4. 3. Détermination de la biomasse sèche

La biomasse produite par *A. niger* HA37 sur les différents milieux de culture est recueillie par filtration sur un morceau de tissu de Tergal placé dans un entonnoir. La biomasse est mise dans une coupelle en porcelaine préalablement pesée puis séchée dans l'étuve à 105°C pendant 24 heures.

II. 4. 4. Dosage des protéines contenues dans la biomasse produite

La biomasse récupérée est broyée à l'aide d'un mortier dans 10 ml de l'eau distillée. Ensuite, un aliquote de 1 ml est dosé selon la méthode de Bradford (1976). Le sérum de l'albumine bovine (BSA) est utilisé comme solution étalon.

II. 4. 5. Dosage de l'enzyme tannase

Après culture de la souche *Aspergillus niger* HA37 sur l'acide tannique, l'activité de l'enzyme tannase a été déterminée par chromatographie sur couche mince pour détecter la disparition de l'acide tannique et l'apparition d'acide gallique.

Le dosage quantitatif de la tannase produite est effectué dans les deux milieux de culture artificiel et naturel. Le degré d'hydrolyse de la liaison ester de l'acide tannique est estimé par mesure de la disparition d'acide tannique à la longueur d'onde de 310 nm d'après la méthode légèrement modifiée de Iibuchi *et al.* (1967). Le protocole détaillé de cette technique est décrit dans l'annexe II.

Une unité enzymatique (UE) est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour hydrolyser la liaison ester d'un μmol d'acide tannique par minute. Les résultats sont exprimés en $\text{UE} \cdot \text{ml}^{-1}$.

II. 4. 6. Chromatographie des composés phénoliques sur colonne de Séphadex G-50

Le gel de filtration Séphadex G-50 est utilisé pour analyser les composés phénoliques présents dans les margines traitées et non traitées.

Un volume de 200 ml environ de ce gel est placé dans une colonne en quartz ($2,5 \times 50$). Après stabilisation et lavage avec le tampon (NaOH 0,05M, LiCl 0,025 M), 1 ml de l'échantillon est injecté dans la colonne et est élué par fraction de 3 ml à un débit de $0,60 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. L'équilibration de la colonne est réalisée par le tampon. La densité optique de ces fractions est mesurée par spectrophotométrie à 280 nm.

III. RÉSULTATS ET DISCUSSION

III. 1. Production de l'enzyme tannase par *A. niger* HA37 sur l'acide tannique

L'étude de la croissance des onze micro-organismes isolés des margines sur milieu minimum contenant comme seule source de carbone l'acide tannique à 0,5% a été effectuée dans le chapitre III. Cette étude a révélé l'efficacité et la performance de *A. niger* vis-à-vis de la dégradation de l'acide tannique (tableau 34). C'est pour cela qu'elle est considérée la meilleure souche pour la production de l'enzyme tannase à partir des sources d'énergie renouvelables, telles que l'acide tannique ou un effluent contenant des tannins comme les margines.

Tableau 34 : Croissance des souches de bactéries, levures et de champignons isolées des margines sur milieu à base d'acide tannique à 0,5%.

Souche	Croissance
<i>Pseudomonas sp.</i>	-
<i>C. boidinii</i>	++
<i>C. diddensiae</i>	-
<i>C. wickerhamii</i>	-
<i>G. terrestre</i>	+
<i>P. membranaefaciens</i>	±
<i>P. kluyveri</i>	±
<i>S. cerevisiae</i>	-
<i>Z. fermentati</i>	-
<i>A. niger</i>	©
<i>Penicillium sp.</i>	+++

- : Pas de croissance
- ± : Survie
- +
- ++ : Croissance importante
- +++ : Croissance très importante
- © : Présence d'auréole de dégradation.

III. 1. 1. Croissance d'*A. niger* HA37 sur milieu solide (ATA) contenant l'acide tannique à 1%

La croissance d'*A. niger* sur milieu minimum YNB (Wickerham, 1951) contenant comme source de carbone l'acide tannique à 0,5% a montré des auréoles de dégradation sur les boîtes de pétri. Pour approfondir l'étude, nous avons testé la capacité de cette souche à croître sur milieu minimum ATA contenant 1% d'acide tannique comme seule source de carbone. Contrairement au milieu YNB, le milieu ATA ne contient ni vitamines ni oligoéléments. Les résultats de cette étude sont illustrés dans la figure 23.



Figure 23 : Croissance d'*Aspergillus niger* HA37 sur l'acide tannique à 1%.

L'auréole de dégradation montré sur la boîte de Pétri visualise nettement l'activité tannase après seulement deux jours de croissance de la souche *A. niger* HA37. Cette dernière est capable de dégrader l'acide tannique à 1% comme seule source de carbone. Aguilar *et al.* (2001) ont étudié l'activité tannase de *Aspergillus niger* sur des milieux solides contenant différentes concentrations d'acide tannique. Les résultats ont montré que le maximum de

l'activité tannase est obtenu à 10% d'acide tannique mais sur des milieux riches en acides aminés, en vitamines et en sucres. Ainsi la fraction en substrat conçue pour la maintenance cellulaire est minimisée. Dans notre étude, le milieu utilisé ne contient que les éléments minéraux et ceci pour simuler au maximum le milieu de culture à base des margines.

III. 1. 2. Effet de la concentration initiale d'acide tannique sur la croissance d'*A. niger* HA37

L'acide tannique fait partie des tannins hydrolysables sous forme de galloyl-glucose qui contient plusieurs molécules d'acide gallique par molécule de glucose (Spencer *et al.*, 1988) (figure 24).

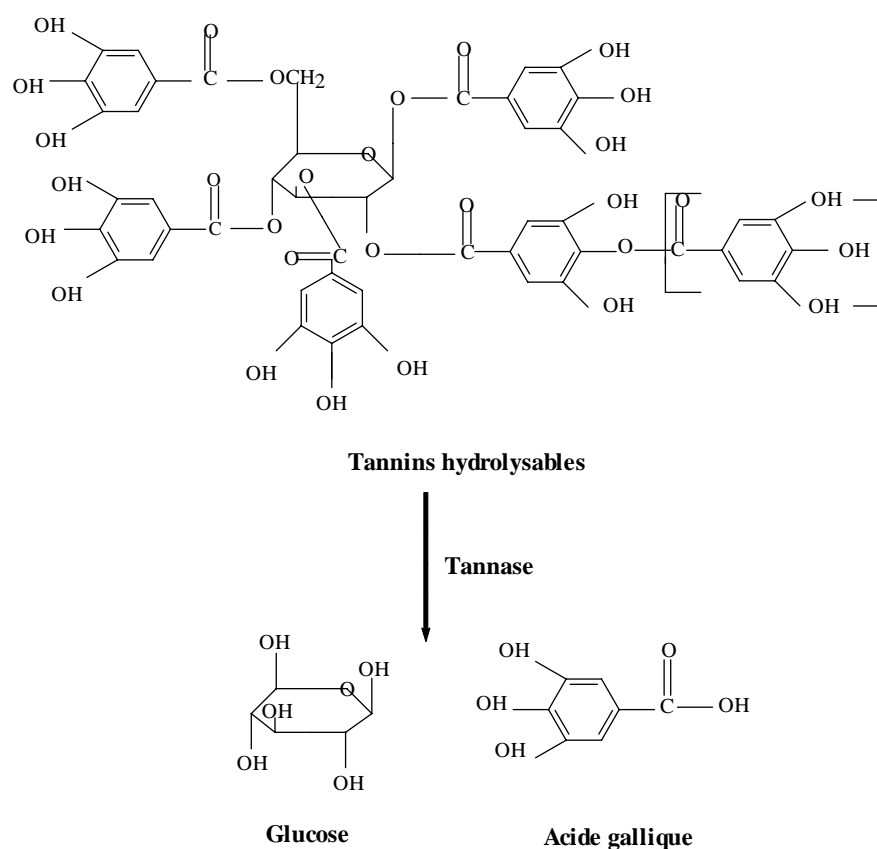


Figure 24 : Production de l'acide gallique et du glucose à partir des tannins hydrolysables sous l'action de l'enzyme tannase.

La variation de la concentration d'acide tannique et du taux de croissance d'*A. niger* HA37 en fonction du temps est illustrée dans la figure 25. Le taux de croissance de la souche est estimé par la production du CO₂.

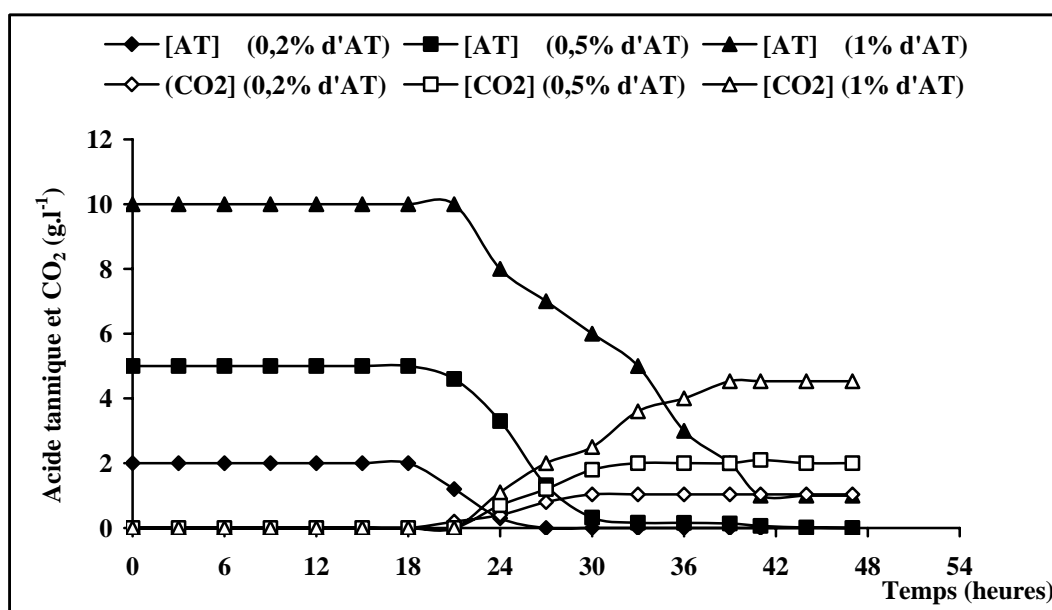


Figure 25 : Variation de la concentration de l'acide tannique (AT) et du CO₂ en fonction du temps.

D'après cette figure, nous remarquons que la souche *A. niger* HA37 peut assimiler l'acide tannique à 0,2% ; 0,5% et 1% sur milieu liquide. Elle a trouvé dans l'acide tannique le carbone nécessaire pour sa croissance et sa maintenance cellulaire. La présence de l'acide tannique et les oligomères phénoliques qui l'accompagnent n'arrête pas sa croissance.

Les courbes peuvent être divisées en deux phases :

- La première phase correspond à la phase de latence. Elle ne présente ni consommation d'acide tannique, ni croissance de la souche *A. niger* HA37 due à un retard de la germination des spores. La souche *A. niger* HA37 est incapable de croître immédiatement en présence d'acide tannique, elle a besoin d'une phase d'adaptation qui dure environ 20 heures.
- La deuxième phase se caractérise par la dégradation d'acide tannique et la croissance de la souche. D'après l'allure des courbes, cette dégradation diminue progressivement en fonction de la concentration initiale d'acide tannique. Plus cette concentration augmente, plus la durée de sa dégradation est lente. La croissance de la souche augmente également avec la teneur en acide tannique initiale.

III. 1. 3. Effet de la concentration initiale d'acide tannique sur la production de l'enzyme tannase par *A. niger* HA37

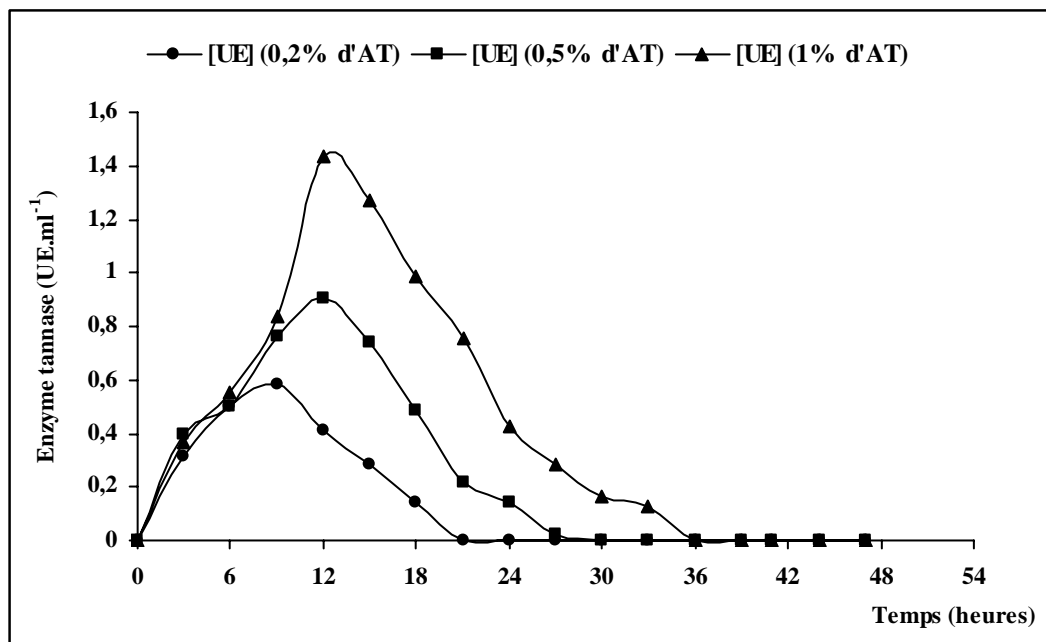


Figure 26 : Concentration de l'enzyme tannase libérée par *A. niger* HA37 dans les trois types de milieu en fonction du temps

L'activité extracellulaire de l'enzyme tannase a été suivie pendant toutes les phases de croissance. Cette activité enzymatique a été détectée dès la première heure de fermentation (figure 26). La production de la tannase commence au début de la phase d'adaptation physiologique correspondant à la phase de latence de la souche étudiée. Suseela et Nandy (1985) ont montré aussi que l'enzyme tannase est produite à la phase initiale de croissance.

La production de l'enzyme tannase augmente avec la concentration initiale de l'acide tannique (figure 26). L'activité enzymatique maximale est de 0,6 UE.ml⁻¹, 0,9 UE.ml⁻¹ et 1,5 UE.ml⁻¹ dans les milieux de culture contenant l'acide tannique à 0,2%, à 0,5% et à 1% respectivement. Ceci suggère que la fraction de substrat conçu pour la production de l'enzyme tannase croît avec l'augmentation de la concentration de l'acide tannique. Des résultats similaires ont été obtenus avec la souche *Aspergillus japonicus* (Bradoo *et al.*, 1997).

Dans le milieu AT contenant 0,2% d'acide tannique, le maximum de production de l'enzyme est obtenu après 9 heures d'incubation, alors que l'activité maximale de cette enzyme est observée après 12 heures dans les deux milieux AT contenant 0,5% et 1% d'acide tannique. Ensuite, l'activité enzymatique diminue progressivement. Cette diminution pourrait

être due à la libération de l'acide gallique et du glucose dans le milieu de culture qui exercent une répression catabolique sur la production de l'enzyme tannase (Suseela et Nandy, 1985 ; Bradoo *et al.*, 1997).

III. 1. 4. Production de la biomasse d'*A. niger* HA37 après 48 heures d'incubation

La biomasse produite par *A. niger* HA37 après 48 heures de fermentation est de l'ordre de 0,9 ; 2 et 3,3 g de poids sec.l⁻¹ sur l'acide tannique à 0,2% ; 0,5% et 1% respectivement (figure 27).

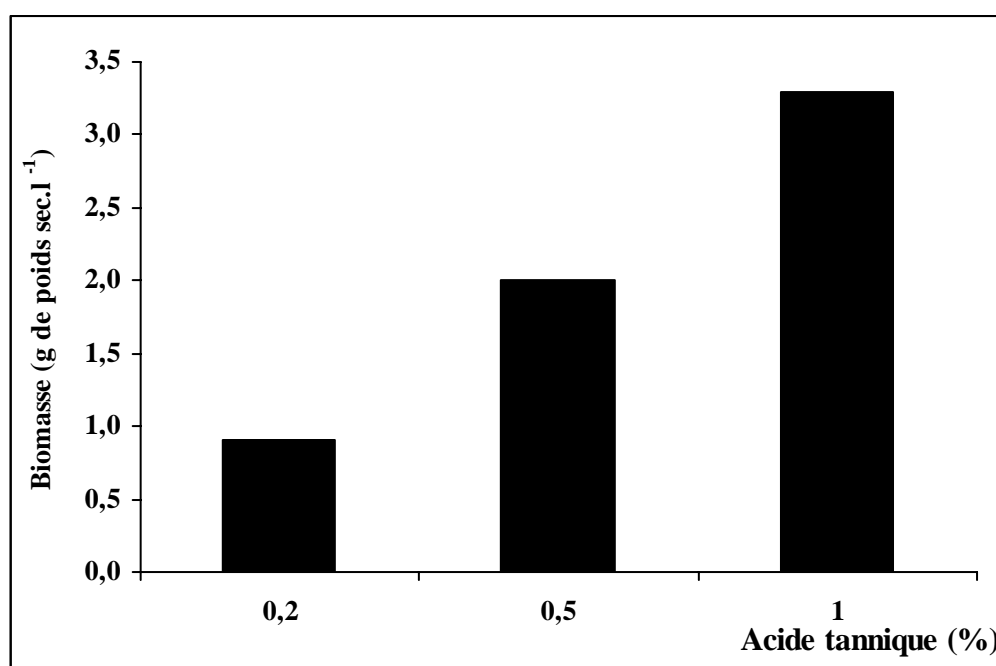


Figure 27 : Biomasse produite par *A. niger* HA37 sur différentes concentrations d'acide tannique après 48 heures d'incubation.

La quantité de biomasse produite par *A. niger* HA37 augmente proportionnellement avec la concentration initiale d'acide tannique. Bradoo *et al.* (1997) ont trouvé des résultats similaires par *Aspergillus japonicus* sur l'acide tannique de 0,5% à 1%.

Cette biomasse peut être utilisée comme additif alimentaire pour le bétail après séchage et traitement adéquat.

Le dosage des protéines dans la biomasse produite par *A. niger* HA37 sur différentes concentrations d'acide tannique a montré qu'elle est enrichie de 28% en protéines. En effet, *A. niger* a été largement utilisé pour la production de POU en raison du taux des protéines qu'elle renferme (tableau 33).

III. 1. 5. Effet de la concentration d'acide tannique sur les paramètres de la croissance et de la production de l'enzyme tannase

Le tableau 35 résume les paramètres cinétiques de la croissance d'*A. niger* HA37 et l'activité enzymatique en fonction de la concentration initiale d'acide tannique.

Tableau 35 : variation des paramètres cinétiques en fonction de la concentration initiale d'acide tannique.

Concentration d'acide tannique initiale (g.l ⁻¹)	Activité enzymatique maximale (UE.ml ⁻¹)	Rendement Y _m /s (g.g ⁻¹)	Taux de croissance μ (h ⁻¹)
2	0,6	0,44	0,23
5	0,9	0,40	0,16
10	1,5	0,36	0,09

D'après ce tableau, nous remarquons que l'activité enzymatique maximale augmente avec la concentration en acide tannique initiale. En effet, l'acide tannique est un inducteur pour la production de l'enzyme tannase (Bradoo *et al.*, 1997). Par contre, le rendement pondéral et le taux de croissance diminuent avec l'augmentation de la concentration d'acide tannique initiale. Ceci pourrait s'expliquer par le fait qu'en présence des concentrations élevées d'acide tannique dans un milieu minimum, la souche *A. niger* HA37 utilise une fraction considérable du substrat vers la maintenance cellulaire. Aguilar *et al.* (2001) ont montré que le taux de croissance augmente avec l'augmentation de la concentration d'acide tannique dans des milieux liquides contenant 1,25%, 2,5% et 5%. Ceci est dû probablement au fait qu'ils ont utilisé un milieu de culture plus riche que le notre.

D'après cette étude préliminaire, nous pouvons conclure que l'acide tannique avec les éléments minéraux ajoutés constituent un milieu convenable à la croissance productive de l'enzyme tannase à haute concentration (10 g.l⁻¹) par *A. niger* HA37. Cette fermentation se manifeste aussi par la formation d'une biomasse protéique très importante. Elle peut être récupérée par centrifugation et utilisée comme aliment au bétail après traitement adéquat.

A partir de ces résultats préliminaires sur les processus et les techniques développés pour simuler le biotope naturel d'*A. niger* HA37, nous pouvons étudier la production de l'enzyme tannase sur milieu à base des margines.

III. 2. Production de l'enzyme tannase par *A. niger* HA37 sur les margines

L'enzyme tannase joue un rôle important dans la dégradation des tannins hydrolysables. C'est pourquoi nous avons jugé utile de suivre l'évolution de la production de l'enzyme tannase par *A. niger* HA37 utilisée dans le traitement aérobie des margines.

III. 2. 1. Evolution de la teneur des composés phénoliques et de l'enzyme tannase produite durant le traitement des margines par *A. niger* HA37

Les résultats du suivi du traitement des margines (25%) par *A. niger* HA37 durant 96 heures sont illustrés dans la figure 28.

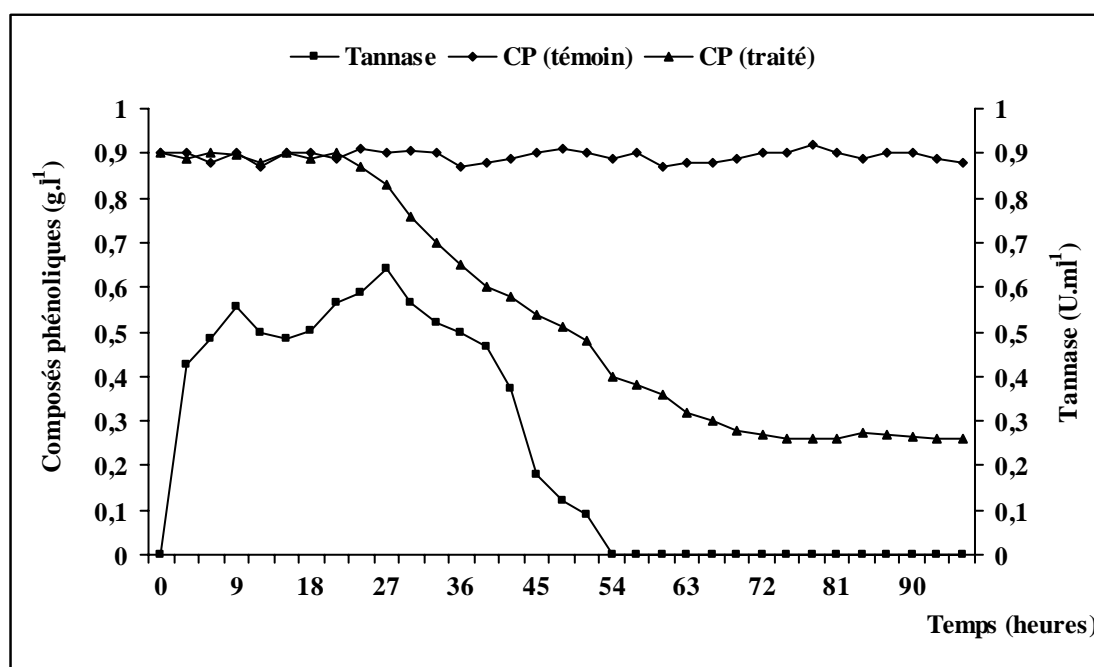


Figure 28 : Evolution de la teneur des composés phénoliques et de l'enzyme tannase produite par *A. niger* HA37 dans les margines en fonction du temps.

D'après la figure 28, nous constatons que la dégradation des composés phénoliques par *A. niger* HA37 est précédée par une phase de latence. Cette phase correspond au temps nécessaire pour la germination des spores qui dure 24 heures. Après cette phase d'adaptation, la teneur en composés phénoliques diminue progressivement. Elle passe de 0,9 g.l⁻¹ à 0,26 g.l⁻¹ après 72 heures d'incubation pour rester stable jusqu'à la fin de la fermentation, ce qui correspond à un taux d'abattement de 71,1%. Nous pouvons donc dire, que la présence des composés phénoliques dans les margines ne limitent pas la capacité des spores d'*A. niger* HA37 à germer. Cependant, nous remarquons que la phase de latence est légèrement plus

longue par rapport à celle obtenue en culture sur l'acide tannique à différentes concentrations. Ceci pourrait être attribué à la nature complexe des margines renfermant différents types de composés organiques.

Le dosage de la production de l'enzyme tannase a été suivi durant le traitement des margines par *A. niger* HA37 (figure 28). L'analyse de cette figure nous permet de constater que la souche *A. niger* HA37 produit l'enzyme tannase dès les premières heures d'incubation. La production enzymatique augmente rapidement après 3 heures d'incubation pour atteindre 0,43 UE.ml⁻¹. De la 3^{ème} heure jusqu'à la 42^{ème} heure, la quantité de l'enzyme produite oscille entre 0,37 et 0,64 UE.ml⁻¹. Ensuite, elle diminue progressivement pour s'annuler après 54 heures d'incubation. Nous constatons également, que l'optimum de la production de cette enzyme est plus large que celle obtenue avec l'acide tannique (figure 26). Ceci pourrait être expliqué par la stabilité enzymatique prolongée de l'enzyme tannase sur un milieu naturel riche en composés phénolique, en sels et autres molécules de nature très variable.

D'après ces résultats, nous constatons que la capacité de la souche *A. niger* HA37 à produire l'enzyme tannase n'est pas inhibée par les margines à 25%. Ce qui nous laisse supposer que le système enzymatique responsable de la production de l'enzyme tannase se trouve induit par la présence des composés phénoliques. En effet, des résultats similaires ont été trouvés par le champignon *Phanerochaete chrysosporium* qui, en présence des margines son système ligninolytique est activé afin de dégrader les composés phénoliques à haut poids moléculaire (Sayadi *et al.*, 2000 ; Kissi *et al.*, 2001). Donc il peut être raisonnable de suggérer que le système enzymatique de la tannase soit impliqué dans le processus de dégradation des composés phénoliques présents dans les margines par *A. niger* HA37.

Suite aux résultats obtenus, nous pouvons conclure que *A. niger* HA37 est capable de dégrader les composés phénoliques des margines à 25% par le biais des enzymes produites (particulièrement la tannase). La germination des spores d'*A. niger* HA37 inoculées dans le milieu de culture à base des margines n'est pas inhibée par les composés phénoliques.

La comparaison de la production de l'enzyme tannase dans les deux systèmes artificiel et naturel, montre que l'activité enzymatique sur les margines à 25% est comparable à celle trouvée sur 0,2% d'acide tannique. En plus la production de l'enzyme tannase reste stable pendant plusieurs heures sur les margines. Ceci est dû à l'induction prolongée du système enzymatique par la présence des composés phénoliques particulièrement les tannins hydrolysables et la stabilité de l'enzyme tannase sur ce milieu naturel.

III. 2. 2. DCO finale et biomasse produite par *A. niger* HA37

Nous avons constaté dans le chapitre III une corrélation très significative entre la dégradation des composés phénoliques et celle de la DCO. Donc, nous nous sommes limités au dosage de la DCO initiale et finale afin d'évaluer le taux de réduction de la matière organique après traitement des margines à 25% par *A. niger* HA37.

La DCO initiale des margines à 25% non traitées est de l'ordre de 20 g d'O₂.l⁻¹. Après fermentation par *A. niger* HA37 durant 96 heures, le taux des matières organiques baisse et la DCO atteint 6,8 g d'O₂.l⁻¹, ce qui correspond à un taux d'abattement de 66%. Cette réduction est accompagnée d'une production de la biomasse de l'ordre de 1 g de poids sec.l⁻¹ après 96 heures d'incubation. Le dosage du contenu protéique de cette biomasse a révélé qu'elle renferme 32% en protéines. Ce résultat est comparable à celui obtenu par Hamdi (1991a), il a trouvé que le mycélium produit par *A. niger* lors du traitement des margines contient une teneur en protéine qui peut atteindre 30%. La biomasse d'*A. niger* cultivée sur les margines a été testée en alimentation du bétail et a donné des résultats encourageants sans aucun risque d'intoxication (Vaccarino *et al.*, 1986).

III. 2. 3. Evaluation par chromatographie de l'efficacité du traitement des margines par *A. niger* HA37

L'efficacité du traitement des margines par *A. niger* HA37 a été vérifiée également par l'étude de la chromatographie sur gel de Séphadex avant et après traitement pendant 96 heures. Ceci est dans le but de mettre en évidence le groupe de composés phénoliques dégradé par *A. niger* HA37 durant le traitement. La figure 29 illustre les résultats de cette chromatographie.

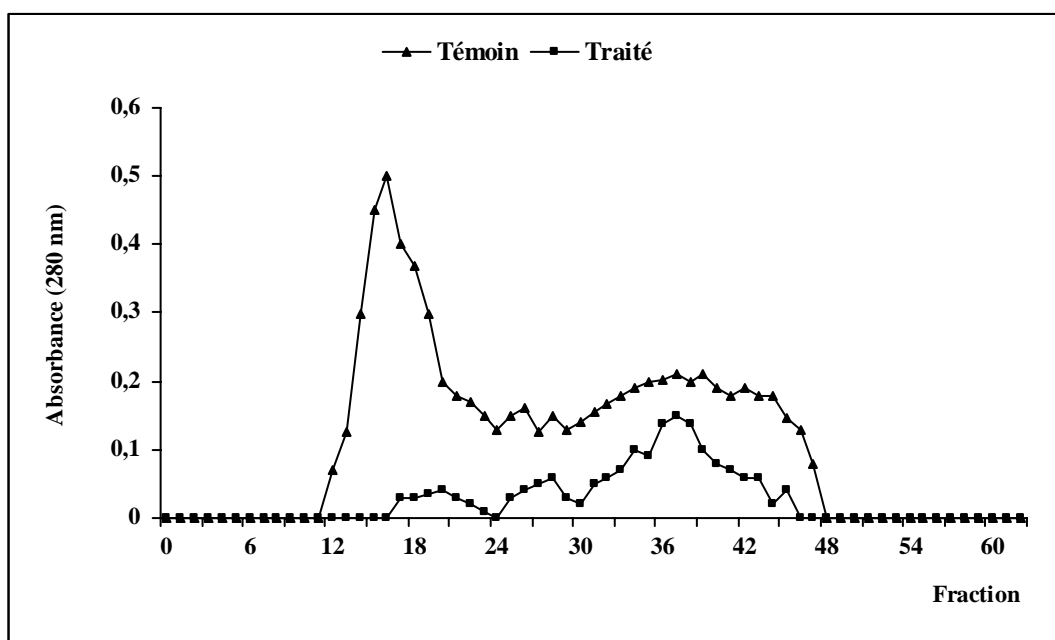


Figure 29 : Profil d'élution du mélange des margines avant et après traitement par *A. niger* HA37.

Les résultats de la chromatographie sur gel de Séphadex G-50 des margines non traitées (témoin) montrent deux pics. Le premier correspond aux composés phénoliques polymères de haut poids moléculaire, le deuxième pic correspond à la fraction des composés phénoliques monomères de faible poids moléculaire. Après traitement, une fraction importante des composés phénoliques polymères a été assimilée. Cependant, le pic des monomères n'a pas beaucoup changé. Ceci pourrait être expliqué soit par la concentration des monophénols qui est plus élevée pour être assimilée par *A. niger* HA37, soit que ces composés sont réfractaires aux enzymes dont dispose cette souche. Nous pouvons aussi supposer que quelques monophénols des margines ont été assimilés, alors que d'autres ont été produits par la dégradation des polyphénols ou par la bioconversion des monophénols.

Donc, la chromatographie des margines fermentées par *A. niger* HA37 a montré que les composés phénoliques polymères sont les plus dégradés durant ce type de traitement. Parmi ces composés on trouve les gallotannins qui représentent le groupe le plus abondant des tannins hydrolysables. L'action des tannases d'*A. niger* hydrolyse ce type de tannins en glucose et en acide gallique.

Nous pouvons donc déduire, que l'enzyme tannase produite par *A. niger* HA37 a joué un rôle important dans le traitement des margines.

IV. CONCLUSION

D'après les résultats obtenus, nous pouvons déduire que la souche *A. niger* HA37 est capable de produire l'enzyme tannase sur milieu artificiel à base d'acide tannique à différentes concentrations et sur milieu naturel à base des margines.

Nous pouvons conclure aussi que, les margines à 25% constituent un milieu convenable pour la production de l'enzyme tannase par *A. niger* HA37 pendant plusieurs heures de fermentation. Cette production est accompagnée de taux d'abattement importants des composés phénoliques et de la DCO qui sont de l'ordre de 71,1% et 66% respectivement. En plus, la biomasse produite renferme une teneur considérable en protéines (32%).

Ainsi cet effluent ne peut être considéré comme source de préjudice pour l'environnement mais un milieu de culture stable est facilement exploitable.

Au cours de ce travail, l'étude physico-chimique des margines de la station d'évaporation naturelle a montré que ces effluents sont caractérisés par une forte pollution organique évaluée en terme de DCO ($154 \text{ g d'O}_2.\text{l}^{-1}$). Ceci nous laisse déduire que les margines ne pourraient être traitées dans des bassins de stabilisation. L'activité et la croissance des micro-organismes sont probablement altérées par la présence de forte teneur en composés phénoliques ($9,7 \text{ g.l}^{-1}$). L'étude microbiologique de ces margines a révélé que ce rejet renferme une charge microbienne assez faible par rapport aux autres effluents industriels (FMAT : $8,4 \cdot 10^3 \text{ UFC.ml}^{-1}$, levures : $7,6 \cdot 10^3 \text{ UFC.ml}^{-1}$, champignons : $4 \cdot 10^2 \text{ UFC.ml}^{-1}$). La présence de faible concentration en sucres ($0,28 \text{ g.l}^{-1}$) montre que les micro-organismes dans les margines utilisent pour leur métabolisme, les produits du catabolisme des composés phénoliques plutôt que celle des sources glucidiques. Donc, ces micro-organismes empruntent des voies métaboliques secondaires. Sous microscope, les levures isolées directement des margines sont rarement observées en plein bourgeonnement. Ce qui nous laisse dire qu'il n'y a pas une croissance de la plupart des micro-organismes dans les margines mais seulement une survie. Par conséquent, l'autoépuration naturelle des margines dans ces bassins pourrait être très limitée. La présence d'une pellicule étanche formée de lipides résiduels à la surface des margines pourrait également altérer l'évaporation naturelle. Donc, le traitement des margines dans des bassins d'évaporation naturelle est peu efficace, et ne permet qu'une évaporation partielle et une faible autoépuration naturelle des margines. De ce fait, l'utilisation de ces bassins d'évaporation ne permet que l'évitement du rejet direct des margines dans les égouts et les rivières.

La caractérisation microbiologique de ces margines nous a permis d'isoler une seule souche de bactérie appartenant au genre *Pseudomonas*, deux types de champignons (*Penicillium sp.* et *Aspergillus niger*), et 8 espèces de levures (*Candida boidinii*, *Candida diddensiae*, *Candida wickerhamii*, *Pichia kluyveri*, *Pichia membranaefaciens*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Geotrichum terrestre* et *Zygosaccharomyces fermentati*). Cette étude a montré aussi que les levures représentent le groupe microbien le plus diversifié en genre et en densité et le plus adapté à ce milieu pollué. Les micro-organismes isolés de ces margines peuvent être considérés comme les plus adaptés et résistants à la toxicité de ces rejets. L'aspect important de ce travail réside dans l'identification des micro-organismes isolés des margines notamment les levures. En effet, rares sont les travaux consacrés à l'étude de la charge microbienne des margines. La comparaison des deux méthodes classique et moléculaire utilisées pour

l'identification des souches de levures a montré qu'elles sont complémentaires et donnent des résultats concordants.

La croissance des micro-organismes isolés des margines sur différentes sources de carbone a révélé que les levures : *Candida boidinii* et *Geotrichum terrestre*, ainsi que les champignons : *Penicillium sp.* et *Aspergillus niger* sont les souches les plus performantes dans l'assimilation des composés phénoliques et lipidiques. Cependant, au cours de notre étude nous avons remarqué que ces souches n'arrivent pas à se développer sur les margines brutes. C'est pour cela que nous avons étudié l'adaptation de ces quatre souches indigènes à croître sur les margines à différentes concentrations croissantes (25%, 50%, 75% et 100%). Cette adaptation permet ainsi leur résistance à la toxicité des composés phénoliques générée à forte concentration en margines. Cette étude a montré que la dégradation des composés phénoliques et de la DCO est optimale dans les margines diluées à 25% en présence des quatre souches étudiées. L'effet des micro-organismes sur la dégradation de la matière organique est alors affecté par l'élévation de la concentration des margines. Donc, ces micro-organismes peuvent dégrader facilement les composés phénoliques à faibles concentrations grâce à leur équipement enzymatique. Cependant, en présence de fortes concentrations, la majorité des composés phénoliques pourrait se fixer sur les enzymes et altérer leur activité. Ainsi, les cellules seraient privées de métabolites intermédiaires, d'énergie et de pouvoir réducteur, et la plupart de celles-ci meurent ou restent à l'état de survie. D'ailleurs, les composés phénoliques à forte concentration agissent sur les structures membranaires, et peuvent altérer les macromolécules telles que les protéines.

Les résultats montrent également que la capacité d'*A. niger* à assimiler les composés phénoliques est plus élevée que celle des autres micro-organismes, suivi de *Penicillium sp.*, *G. terrestre* et de *C. boidinii*. En effet, *A. niger* est capable de dégrader à la fois des polymères et des monomères aromatiques grâce à son équipement enzymatique très riche en enzymes jouant un rôle très important dans le métabolisme alternatif.

Le suivi du traitement biologique des margines brutes par les quatre souches durant un mois a permis de constater l'existence d'une corrélation entre l'abattement de la DCO et celui des composés phénoliques. Ceci nous laisse déduire que la production de la biomasse provient en grande partie des produits de la dégradation des composés phénoliques.

Durant ce traitement, les champignons *A. niger* et *Penicillium sp.* ont permis la réduction de la DCO et des composés phénoliques à des taux plus élevés que ceux obtenus par

les levures *C. boidinii* et *G. terrestre*. Ce qui indique l'implication d'un métabolisme alternatif performant qui joue un rôle important dans la dégradation des composés phénoliques chez les champignons. En plus, les levures présentent un système enzymatique moins efficace que celui des champignons pour métaboliser ces composés phénoliques.

Nous avons aussi noté, une stabilité de la dégradation de la DCO et des composés phénoliques, et de la production de la biomasse au delà du 9^{ème} jour dans le cas des quatre souches. Ceci pourrait être attribué à l'épuisement des composés organiques biodégradables dans les milieux de culture, et à leur bioconversion en composés phénoliques stables et non biodégradables.

La croissance des quatre souches étudiées dans les margines à concentration croissante a permis l'induction d'un métabolisme alternatif efficace. Les cellules synthétisent des enzymes non spécifiques entraînant l'hydrolyse des composés phénoliques à des concentrations élevées. Dans ces conditions, au niveau des lipides membranaires les acides gras saturés sont remplacés par les acides gras insaturés. Ce qui modifie l'espace hydrophobe tout en diminuant le flux de transport de ces composés phénoliques vers le milieu intracellulaire.

Donc, l'adaptation des souches à croître sur des concentrations croissantes en margines a un effet positif sur le traitement des margines. En effet, les souches testées ont permis la dégradation de la matière organique et des composés phénoliques, et la production de la biomasse sur les margines brutes. Des taux d'abattement de la DCO de 78,3% ; 63,1% ; 48,4% et 40,3% ont été obtenus en présence des souches *A. niger*, *Penicillium sp.*, *G. terrestre* et *C. boidinii* respectivement après un mois de traitement des margines brutes. Cependant, le temps du traitement des margines brutes peut être limité à 3 jours d'incubation pour *C. boidinii* et de 6 jours pour les autres souches puisque l'élimination de la quasi-totalité de la DCO et des composés phénoliques est obtenue après cette durée. Cette étude a montré également l'intérêt de la souche *Aspergillus niger* dans l'élimination de la DCO à 78,3% et des composés phénoliques à 63,1%.

La réalisation du biotraitement aérobie des margines à l'échelle industrielle peut être confrontée à des problèmes du coût élevé du fait qu'il nécessite une énergie très importante pour l'aération et une grande quantité d'eau pour les dilutions des margines. L'extraction et la purification d'enzymes à haute valeur industrielle pourraient présenter un intérêt économique capable de surpasser ces difficultés. Puisque les margines sont riches en tannins hydrolysables et *Aspergillus niger* HA37 possède dans son système enzymatique l'enzyme tannase qui

hydrolyse ces composés phénoliques, nous avons pensé à étudier la production de cette enzyme à haute valeur industrielle. Avant d'entamer ce travail, nous avons pensé à étudier la production de l'enzyme tannase par cette souche sur milieu artificiel à base d'acide tannique à différentes concentrations. Cette étude a montré que l'activité enzymatique maximale augmente avec l'augmentation de la concentration d'acide tannique initiale. Nous avons obtenu $0,6 \text{ UE.ml}^{-1}$, $0,9 \text{ UE.ml}^{-1}$ et $1,5 \text{ UE.ml}^{-1}$ dans les milieux contenant 0,2%; 0,5% et 1% d'acide tannique respectivement. En effet, l'acide tannique joue le rôle d'inducteur pour la production de l'enzyme tannase qui est produite au début de la phase de croissance. Nous avons aussi noté que le rendement pondéral et le taux de croissance diminuent avec l'augmentation de la concentration d'acide tannique initiale. Ceci peut être expliqué par le fait qu'en présence des concentrations élevées d'acide tannique dans un milieu minimum, la souche *A. niger* HA37 utilise une fraction considérable du substrat pour la maintenance cellulaire.

L'étude préliminaire de la production de l'enzyme tannase par *Aspergillus niger* HA37 en utilisant les margines à 25% comme milieu de culture a donné des résultats encourageants. Cette souche produit l'enzyme tannase à des teneurs comparables à celles obtenues sur milieu à base d'acide tannique à 0,2%. En outre, la production de cette enzyme sur les margines à 25% reste plus ou moins stable pendant plus de 30 heures, ce qui augmente les chances de son extraction. Cette production de l'enzyme tannase est accompagnée par des taux d'abattement des composés phénoliques et de la DCO de l'ordre de 71,1% et 66% respectivement et d'une production de la biomasse de 1 g.l^{-1} . Notre souche *A. niger* HA37 est donc capable à la fois de traiter les margines et de produire l'enzyme tannase qui présente une haute valeur industrielle. Nous pouvons conclure que les margines à 25% constituent un milieu convenable pour la production de l'enzyme tannase par *A. niger* HA37.

En perspectives, il serait intéressant d'approfondir l'étude de la production de l'enzyme tannase sur les margines à différentes concentrations. L'ajout des inducteurs dans le milieu de culture pourrait jouer un rôle important dans la production de cette enzyme. Après optimisation des conditions de culture du champignon *A. niger* HA37 pour une production maximale de l'enzyme tannase, l'étude de son extraction et sa purification devrait être réalisée. L'altération des enzymes par les composés phénoliques pourrait être évitée par la modification des enzymes les plus sensibles à ces composés par génie génétique, ce qui permettrait d'augmenter la stabilité des enzymes.

Il serait envisageable aussi d'étudier la capacité de la co-culture des quatre souches *Candida boidinii*, *Geotrichum terrestre*, *Penicillium sp.* et *Aspergillus niger* à traiter les margines. L'immobilisation des souches ainsi que l'induction métabolique pourraient jouer un rôle important dans l'amélioration du traitement des margines par ces souches.

Nos résultats semblent être très prometteurs pour des applications biotechnologiques tenant compte de l'influence considérable des aspects économiques sur le bon déroulement des procédés de traitement. En utilisant un tel procédé, nous pouvons traiter les margines au meilleurs rendement et à faible coût.

Dans le traitement biologique des margines, le problème réside dans la méconnaissance des facteurs clés de la biodégradation. Ainsi, pour l'élaboration d'un procédé biotechnologique innovant, nous devons faire appel à des études biochimiques et génétiques qui doivent se joindre au génie des procédés.

ANNEXE I : MILIEUX DE CULTURE

Milieux de culture utilisés pour l'isolement et la conservation des micro-organismes

Gélose nutritive

Tryptone		10 g
Extrait de viande		5 g
NaCl		5 g
Agar-agar		15 g
H ₂ O distillée	qsp	1000 ml

Milieu YM

Peptone		5 g
Extrait de levure		3 g
Extrait de malt		3 g
Glucose		10 g
Agar-agar		20 g
H ₂ O distillée	qsp	1000 ml

Milieu YPG

Peptone		20 g
Extrait de levure		10 g
Glucose		20 g
Agar-agar		20 g
H ₂ O distillée	qsp	1000 ml

Milieu Czapek

NO ₃ Na		2 g
KH ₂ PO ₄		1 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O		0,01 g
Saccharose		30 g
Agar-agar		20 g
H ₂ O distillée	qsp	1000 ml

Milieu à l'extrait de malt

Extrait de malt		20 g
Agar-agar		20 g
H ₂ O distillée	qsp	1000 ml

Milieux de culture utilisés dans l'identification des levures

Milieu PDA (Potato-Dextrose-Agar)

Glucose		20 g
Extrait de pomme de terre		230 g
Agar-agar		20 g
H ₂ O distillée	qsp	1000 ml

Milieu de Mac alary

Glucose	1 g
KI	1,8 g
Extrait de levure	2,5 g
Acétate de sodium	8,2 g
Agar-agar	15 g
H ₂ O distillée	qsp 1000 ml

Milieu d'Adams

Glucose	0,4 g
Acétate de sodium	20 g
Agar-agar	20 g
H ₂ O distillée	qsp 1000 ml

Milieu Christensen agar

Peptone	1 g
Glucose	1 g
Na Cl	5 g
KH ₂ PO ₄	2 g
Rouge de phénol	0,012 g
Urée	0,1 g
Agar-agar	20 g
H ₂ O distillée	qsp 1000 ml

Milieu indicateur au Tetrazolium

Glucose	10 g
Peptone	10 g
Chlorure de 2.3.5 Trimethyl tetrazolium	0,1 mg
Agar-agar	20 g
H ₂ O distillée	qsp 1000 ml
pH = 7	

Milieu Wikerham (YNB)

Sulfate d'ammonium	3,5 g
Vitamines :	
Biotine	20 µg
Pantothenate de calcium	2 µg
Acide folique	2 µg
Inositol	10 µg
Niacine	400 µg
Acide para-aminobenzoïque	200 µg
Pyridoxine hydrochloride	400 µg
Riboflavine	200 µg
Thiamine hydrochloride	400 µg

Eléments en trace :

Acide borique	500 µg
Sulfate de cuivre	40 µg
Iodure de potassium	100 µg
Chlorure ferrique	200 µg
Sulfate de manganèse	400 µg
Molybdate de sodium	200 µg
Sulfate de Zinc	400 µg

Sels minéraux :

Phosphate de potassium monobasique	0,85 g
Phosphate de potassium dibasique	0,15 g
Sulfate de magnésium	0,5 g
Chlorure de sodium	0,1 g
Chlorure de calcium	0,1 g

H ₂ O distillée	qsp	1000 ml
----------------------------	-----	---------

ANNEXE II : PROTOCOLE DU DOSAGE DE L'ENZYME TANNASE

Réactifs

A. Tampon citrate, 50mM; pH 5,5 : dissoudre 10,5 g d'acide citrique dans 800 ml d'eau distillée, ajuster le pH à 5,5 avec NaOH (1 N) et compléter avec de l'eau distillée à 1000 ml.

B. Solution d'acide tannique (substrat) 0,35% : 175 mg d'acide tannique/50 ml du tampon citrate (Réactif A). (A préparer juste avant le dosage).

C. Solution d'éthanol, 90% : 900 ml d'éthanol (99,5%) et 95 ml de l'eau distillée.

Procédure

1. Prélever 1 ml de la solution d'acide tannique (réactif B) dans le tube à essai.
2. Equilibrer à 30°C pendant 5 min.
3. Ajouter 0,25 ml de l'échantillon.
4. Incuber à 30°C pendant 15 min.
5. Ajouter 5 ml de la solution éthanol (réactif C) et bien mélanger pour stopper la réaction.
6. Prélever 0,25 ml de l'échantillon et du témoin.
7. Ajouter 5 ml de la solution d'éthanol (réactif C) et bien mélanger.
8. Lire la densité optique à 310 nm dans une cuve en quartz (Echantillon : A_S , Témoin : A_0).

Le témoin est un prélèvement idem à l'échantillon préparé parallèlement et de la même façon sans passer par l'étape 4.

Calcul

L'activité peut être calculée en utilisant la formule suivante :

$$\text{Activité (U/ml)} = \frac{(A_0 - A_S) \times 20,3 \times 1 \text{ (ml)} \times 1,04 \times df}{0,71 \times 0,25 \text{ (ml)} \times 15 \text{ (min)}} = \Delta A \times 7,93 \times df$$

20,3 : Micromoles d'acide tannique dans 1 ml de la solution substrat (réactif B).

0,71 : Changement de l'absorbance après hydrolyse complète de 20,3 μmol d'acide tannique sous les conditions d'essais.

1,04 : Facteur de correction entre la méthode de Libuchi *et al.* et la présente méthode.

df : Facteur de dilution.

C : quantité de tannase dans l'échantillon ($\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$).

ANNEXE III : CARACTERISTIQUES DES SOUCHES DE LEVURES

Candida boidinii (Souches 2, 3, 10)

Croissance à 37°C : -

Croissance à 42°C : -

Pellicule : +

Mycélium : +

Formation des spores : Blastospores

Urease : -

Assimilation des nitrates : +

Croissance sur milieu sans vitamines : +

Présence de cycloheximide : +

Fermentation des sucres :

Glucose : +

Maltose : +

Galactose : -

Lactose : -

Saccharose : -

Tréhalose : -

Assimilation des composés organiques :

Glucose : +

Xylose : +

Inositol : -

Galactose : -

Arabinose : +

Melizitose : ±

Saccharose : +

Ribose : +

Inulin : +

Maltose : -

Rhamnose : -

Arbutin : +

Cellobiose : -

Erythritol : +

Mannose : +

Tréhalose : +

Ribitol : +

Sorbitol : +

Lactose : -

Mannitol : +

Dextran : ±

Raffinose : -

Acide succinique : +

Méthyle glucoside : +

Amidon : -

Acide citrique : +

Candida diddensiae* (Souches 5,7)*Croissance à 37°C : +****Croissance à 42°C : -****Pellicule : -****Mycélium : +****Formation des spores : Blastospores****Urease : -****Assimilation des nitrates : -****Croissance sur milieu sans vitamines : ±****Présence de cycloheximide : -****Fermentation des sucres :**

Glucose : +

Maltose : -

Galactose : -

Lactose : -

Saccharose : -

Tréhalose : +

Assimilation des composés organiques :

Glucose : +

Xylose : -

Inositol : -

Galactose : +

Arabinose : +

Melizitose : +

Saccharose : +

Ribose : ±

Inulin : ±

Maltose : +

Rhamnose : -

Arbutin : +

Cellobiose : +

Erythritol : +

Mannose : +

Tréhalose : +

Ribitol : +

Sorbitol : -

Lactose : -

Mannitol : +

Dextran : -

Raffinose : -

Acide succinique : +

Méthyle glucoside : -

Amidon : -

Acide citrique : -

Candida wickerhamii* (Souche 12)*Croissance à 37°C : -****Croissance à 42°C : -****Pellicule : -****Mycélium : -****Formation des spores : Blastospores****Urease : -****Assimilation des nitrates : +****Croissance sur milieu sans vitamines : +****Présence de cycloheximide : +****Fermentation des sucres :**

Glucose : +

Maltose : -

Galactose : -

Lactose : -

Saccharose : +

Tréhalose : -

Assimilation des composés organiques :

Glucose : +

Xylose : +

Inositol : -

Galactose : +

Arabinose : -

Melizitose : -

Saccharose : +

Ribose : -

Inulin : -

Maltose : -

Rhamnose : -

Arbutin : +

Cellobiose : +

Erythritol : -

Mannose : +

Tréhalose : -

Ribitol : -

Sorbitol : -

Lactose : -

Mannitol : -

Dextran : -

Raffinose : ±

Acide succinique : -

Méthyle glucoside : -

Amidon : -

Acide citrique : +

Geotrichum terrestre* (Souche 11)*Croissance à 37°C : +****Croissance à 42°C : -****Pellicule : +****Mycélium : +****Formation des spores : Blastospores et Arthrospores****Urease : -****Assimilation des nitrates : +****Croissance sur milieu sans vitamines : +****Présence de cycloheximide : +****Fermentation des sucres :**

Glucose : +

Maltose : -

Galactose : -

Lactose : -

Saccharose : -

Tréhalose : -

Assimilation des composés organiques :

Glucose : +

Xylose : +

Inositol : -

Galactose : +

Arabinose : +

Melizitose : +

Saccharose : +

Ribose : +

Inulin : +

Maltose : +

Rhamnose : +

Arbutin : +

Cellobiose : ±

Erythritol : +

Mannose : +

Tréhalose : +

Ribitol : +

Sorbitol : +

Lactose : -

Mannitol : +

Dextran : +

Raffinose : +

Acide succinique : +

Méthyle glucoside : +

Amidon : -

Acide citrique : +

Pichia kluyveri* (Souche 4)*Croissance à 37°C : +****Croissance à 42°C : -****Pellicule : +****Mycélium : -****Formation des spores : Ascospores****Urease : +****Assimilation des nitrates : -****Croissance sur milieu sans vitamines : -****Présence de cycloheximide : -****Fermentation des sucres :**

Glucose : +

Maltose : -

Galactose : -

Lactose : -

Saccharose : -

Tréhalose : -

Assimilation des composés organiques :

Glucose : +

Xylose : -

Inositol : -

Galactose : -

Arabinose : -

Melizitose : -

Saccharose : +

Ribose : -

Inulin : -

Maltose : -

Rhamnose : +

Arbutin : +

Cellobiose : -

Erythritol : -

Mannose : +

Tréhalose : +

Ribitol : -

Sorbitol : -

Lactose : -

Mannitol : -

Dextran : ±

Raffinose : -

Acide succinique : +

Méthyle glucoside : -

Amidon : -

Acide citrique : +

Pichia membranaefaciens* (Souches 1, 6)*Croissance à 37°C : +****Croissance à 42°C : -****Pellicule : +****Mycélium : -****Formation des spores : Ascospores****Urease : +****Assimilation des nitrates : -****Croissance sur milieu sans vitamines : +****Présence de cycloheximide : -****Fermentation des sucres :**

Glucose : +

Maltose : -

Galactose : -

Lactose : -

Saccharose : -

Tréhalose : -

Assimilation des composés organiques :

Glucose : +

Xylose : -

Inositol : -

Galactose : -

Arabinose : -

Melizitose : -

Saccharose : -

Ribose : -

Inulin : -

Maltose : -

Rhamnose : +

Arbutin : +

Cellobiose : -

Erythritol : -

Mannose : -

Tréhalose : +

Ribitol : -

Sorbitol : -

Lactose : -

Mannitol : -

Dextran : -

Raffinose : -

Acide succinique : +

Méthyle glucoside : -

Amidon : -

Acide citrique : +

Saccharomyces cerevisiae* (Souche 9)*Croissance à 37°C : +****Croissance à 42°C : -****Pellicule : -****Mycélium : -****Formation des spores : Ascospores****Urease : +****Assimilation des nitrates : -****Croissance sur milieu sans vitamines : ±****Présence de cycloheximide : -****Fermentation des sucres :**

Glucose : +

Maltose : +

Galactose : +

Lactose : -

Saccharose : +

Tréhalose : +

Assimilation des composés organiques :

Glucose : +

Xylose : -

Inositol : -

Galactose : +

Arabinose : -

Melizitose : -

Saccharose : +

Ribose : -

Inulin : -

Maltose : -

Rhamnose : -

Arbutin : +

Cellobiose : -

Erythritol : -

Mannose : +

Tréhalose : -

Ribitol : -

Sorbitol : -

Lactose : -

Mannitol : -

Dextran : -

Raffinose : ±

Acide succinique : -

Méthyle glucoside : -

Amidon : +

Acide citrique : +

Zygosaccharomyces fermentati* (Souche 8)*Croissance à 37°C : +****Croissance à 42°C : -****Pellicule : -****Mycélium : -****Formation des spores : Ascospores****Urease : +****Assimilation des nitrates : -****Croissance sur milieu sans vitamines : -****Présence de cycloheximide : +****Fermentation des sucres :**

Glucose : +

Maltose : +

Galactose : +

Lactose : -

Saccharose : +

Tréhalose : +

Assimilation des composés organiques :

Glucose : +

Xylose : -

Inositol : -

Galactose : +

Arabinose : -

Melizitose : -

Saccharose : +

Ribose : -

Inulin : +

Maltose : -

Rhamnose : -

Arbutin : +

Cellobiose : +

Erythritol : -

Mannose : +

Tréhalose : +

Ribitol : -

Sorbitol : -

Lactose : -

Mannitol : -

Dextran : -

Raffinose : +

Acide succinique : +

Méthyle glucoside : -

Amidon : -

Acide citrique : -

CARACTERISTIQUES MORPHOLOGIQUES DES SOUCHES DE CHAMPIGNONS



Figure 31 : Croissance de la souche *Aspergillus niger* HA37 sur milieu Czapek.



Figure 31 : Croissance de la souche *Penicillium* sp. sur milieu à l'extrait de malt.

ANNEXE IV : LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

- Figure 1** : Aires de répartition des oliviers au monde (Amoretti et Comet, 1985).
- Figure 2** : Répartition géographique des principales zones oléicoles nationales.
- Figure 3** : diagramme de traitement des olives par pression et nature des différents sous-produits (Nefzaoui, 1987).
- Figure 4** : Procédé d'obtention de l'huile d'olive par centrifugation et nature des différents sous-produits (Nefzaoui, 1987).
- Figure 5** : Schéma descriptif du procédé super-presse utilisé pour l'extraction d'huile d'olive avec les sous-produits engendrés.
- Figure 6** : Hydroxylation de l'acide parahydroxybenzoïque par la monooxygénase.
- Figure 7** : Hydroxylation de l'acide benzoïque en Catéchol par la dioxygénase.
- Figure 8** : Ortho-clivage du Catéchol.
- Figure 9** : Voies Métaboliques de dégradation par ortho-clivage
- Figure 10** : Méta-clivage du Catéchol.
- Figure 11** : Voies de dégradation par méta-clivage
- Figure 12** : Double équipements enzymatiques des bactéries du genre *Pseudomonas* impliquées dans les deux types de clivages.
- Figure 13** : Principales voies microbiennes de dégradation de plusieurs composés aromatiques rencontrés lors de la biodégradation des composés aromatiques (Dagley, 1983).
- Figure 14** : Electrophorèse en gel d'agarose des produits PCR en utilisant les primers V3-1 et V3-2 des souches de levures.
- Figure 15** : Electrophorèse en gel d'agarose des produits PCR après purification des souches de levures.
- Figure 16** : Schéma synoptique du traitement en cascade des margines avec les souches étudiées.
- Figure 17** : Taux d'abattement des composés phénoliques par les quatre souches en fonction de la concentration initiale en margines après 36h d'incubation.
- Figure 18** : Taux d'abattement de la DCO soluble en fonction de la concentration initiale en margines par les quatre souches après 36h d'incubation.
- Figure 19** : Evolution des composés phénoliques dans les margines brutes en fonction du temps par les souches étudiées.
- Figure 20** : Evolution de la DCO dans les margines brutes en fonction du temps par les souches étudiées.
- Figure 21** : Evolution de la biomasse produite dans les margines brutes en fonction du temps par les souches étudiées.
- Figure 22** : Corrélation entre l'évolution de la DCO et celle des composés phénoliques.
- Figure 23** : Croissance d'*Aspergillus niger* HA37 sur l'acide tannique à 1%.

- Figure 24** : Production de l'acide gallique et du glucose à partir des tannins hydrolysables sous l'action de l'enzyme tannase.
- Figure 25** : Variation de la concentration de l'acide tannique (AT) et du CO₂ en fonction du temps.
- Figure 26** : Concentration de l'enzyme tannase libérée par *A. niger* HA37 dans les trois types de milieu en fonction du temps
- Figure 27** : Biomasse produite par *A. niger* HA37 sur différentes concentrations d'acide tannique après 48 heures d'incubation.
- Figure 28** : Evolution de la teneur des composés phénoliques et de l'enzyme tannase produite par *A. niger* HA37 dans les margines en fonction du temps.
- Figure 29** : Profil d'élution du mélange des margine avant et après traitement par *A. niger* HA37.
- Figure 30** : Croissance de la souche *Aspergillus niger* HA37 sur milieu Czapek.
- Figure 31** : Croissance de la souche *Penicillium* sp. sur milieu à l'extrait de malt.



- Tableau 1** : Nombre d'oliviers et les superficies occupées par les oliveraies dans les six principaux pays méditerranéens oléicoles (Faostat, 2001).
- Tableau 2** : Répartition par région des principales unités industrielles et traditionnelles (Maâsras) (Achkar-Begdouri, 1994).
- Tableau 3** : Comparaison de la charge organique des margines issues du procédé en continu et du procédé en discontinu (Ranalli, 1991a).
- Tableau 4** : Principales composantes des margines (Lutwin *et al.*, 1996).
- Tableau 5** : Composition minérale des margines (Salvemini, 1985).
- Tableau 6** : Constituants minéraux des margines (Lutwin *et al.*, 1996).
- Tableau 7** : Concentrations des Cations et des Anions dans les margines issues d'un système par pression (omww₁) et d'un processus par centrifugation (omww₂).
- Tableau 8** : Composition des métaux contenus dans les polymères.
- Tableau 9** : Composition des monosaccharides contenus dans les polymères.
- Tableau 10** : Composition des acides aminés des polymères des margines (Capasso *et al.*, 2002a).
- Tableau 11** : Teneur de quelques composés phénoliques identifiés dans les margines (Balice et Cera, 1984).
- Tableau 12** : Composition phénolique des margines étudiée par D'Annibale *et al.* (2000).
- Tableau 13** : Phénols totaux, ortho-diphénol et monomères aromatiques contenus dans les margines (Casa *et al.*, 2003).
- Tableau 14** : Composés phénoliques identifiés dans des margine (Borja *et al.*, 1995a).
- Tableau 15** : Procédés physiques et biologiques de traitement des margines (Bastista et Giorgio, 1988).

- Tableau 16** : Evaluation des processus de traitement des margines (Hamdi, 1993a).
- Tableau 17** : Performances des procédés de méthanisation appliqués aux margines.
- Tableau 18** : Composition physico-chimique du compost final (Galli *et al.*, 1994).
- Tableau 19** : Microorganismes utilisés pour la production des POU sur les margines (Yazcioglu et Celikkol, 1978).
- Tableau 20** : Utilisation des levures pour la production de POU à partir des margines.
- Tableau 21** : Composition chimique de la pâte des margines obtenue par le procédé Dalmolive (Martilotti, 1993).
- Tableau 22** : Composition organique des margines collectées à partir de la station d'évaporation naturelle de Fès.
- Tableau 23** : Composition minérale des margines étudiées.
- Tableau 24** : Composition métallique des margines collectées à partir de la station d'évaporation naturelle de Fès.
- Tableau 25** : Caractérisation microbiologique des margines de la station d'évaporation naturelle.
- Tableau 26** : Liste des souches de levures identifiées à partir des margines.
- Tableau 27** : Caractérisation morphologique, physiologique et biochimique des souches isolées des margines.
- Tableau 28** : Composition physico-chimique des margines fraîches.
- Tableau 29** : Etude de la croissance des micro-organismes isolés des margines sur les différentes sources de carbone.
- Tableau 30** : Dosage de la biomasse produite dans les margines à différentes concentrations après 36 h d'incubation
- Tableau 31** : Evolution du pH en fonction du temps dans les margines brutes traitées par les souches étudiées.
- Tableau 32** : Enzymes produites par *A. niger* et leurs applications à l'échelle industrielle.
- Tableau 33** : Bioconversion de plusieurs effluents agro-alimentaires par *A. niger*.
- Tableau 34** : Croissance des souches de bactéries, levures et de champignons isolées des margines sur milieu à base d'acide tannique à 0,5%.
- Tableau 35** : variation des paramètres cinétique en fonction de la concentration initiale d'acide tannique.

- Achkari-Begdouri A. (1994)** Problématique des margines produites par les huileries et possibilités de valorisation et de traitement. Rapport destiné à la cellule d'études d'impact sur l'environnement, Ministère de l'intérieur, Royaume du Maroc.
- Aggelis G., Margariti N., C Kralli C., Flouri F. (2000)** Growth of *Candida boidinii* on methanol and the activity of methanol-degrading enzymes as affected from formaldehyde and methylformate. J. Biotechnol., **80** (2), 119-25.
- Aguilar C.N., Augur C., Favela-Torres E., Viniestra-Gonzalez G.(2001)** Production of tannase by *Aspergillus niger* Aa-20 in submerged and solid-state fermentation : influence of glucose and tannic acid Food Research Department, Universidad Autonoma de Coahuila, Saltillo, Coah, Mexico.J Ind Microbiol Biotechnol., **26** (5), 296-302.
- Aissam H., Sendide K., Benlemlih M. (2001)** Etude et traitement biologique préliminaire de la pollution azotée et phosphorée contenue dans les effluents d'industries agro-alimentaires. Ann. Chim. Sci. Mat., **26**, 391-396.
- Aissam H., Errachidi F., Merzouki M., Benlemlih M. (2002)** Identification des levures isolées des margines et étude de leur activité catalase. Cahiers de l'Association Scientifique Européenne pour l'Eau et la Santé, **7**, 23-30.
- Al-Malah K., Azzam M.O.J., Abu-Lail N.I. (2000)** Olive mills effluent (OME) wastewater post-treatment using activated clay. Separation and Purification Technology, **20**, 225-234.
- Amat P., Rinaldi A., Sanjust E., Satt G., Viola A. (1986)** Vegetable material in water in the olive oil industry: raw material or polluting waste. Riv. Merceol, **25**, 183-199.
- Amirante P., Montervino A. (1996)** Epuration par concentration thermique des effluents des huileries d'olives et compostage du concentré. Une expérience appliquée dans les poulies, Olivea, **63**, 64-69.
- Amoretti M.C., Comet G. (1985)** Le livre de l'olivier. EDISUD.
- Anderson G., Donnelly T., Rippon G.M. (1977)** Digestion anaerobia de aguas residuales industriales. Actas I. Congreso nacional de Química, Vigo., 549-565.
- Anderson J.J., Dagley S. (1980)** Catabolism of aromatic acids in *Trichosporon cutaneum*. J., Bacteriol., **141**, 534 - 543.
- Anderson J.G., Blain J.A., Marchetti P., Todd J.R. (1981)** Processing of model dilute carbohydrate wastes using *Aspergillus niger* in disc fermenters. Biotechnol. Lett., **8**, 451-454.
- Annaki A., Chaouch M., Rafiq M. (1999a)** Elimination des margines par évaporation naturelle. L'eau, L'industrie, Les nuisances, **1**, 99-107.
- Annaki A., Chaouch M., Rafiq M. (1999b)** Influence de la durée du stockage des olives sur l'évolution de la composition des margines. L'eau. L'industrie. Les nuisances, **218**, 24-28.
- Antonacci R., Brunetti A., Rozzi A., Santori M. (1981)** Trattamento anaerobico di acqua vegetazione di frantoio. I. Risultati preliminari. Ingegneria sanitaria, **6**, 257-262.

- Arienzo M., Capasso R. (2000)** Analysis of metal cations and inorganic anions in olive oil mill waste waters by atomic absorption spectroscopy and ion chromatography. Detection of metals bound mainly to the organic polymeric fraction. *J Agric Food Chem.*, **48** (4), 1405-10.
- Asehraou A. (1993)** Etude physico-chimique et microbiologique des olives vertes crues et en fermentation et des olives noires. Thèse 3^{ème} Cycle. Univ. Cadi Ayyad, Fac. Sci., Semailia.
- Assas N., Marouani L., Hamdi M. (2000)** Scale down and optimization of olive mill wastewaters decolorization by *Geotrichum candidum* *Bioprocess Engineering*, **22** (6), 503-507.
- Assas N., Ayed L., Marouani L., Hamdi M. (2002)** Decolorization of fresh and stored and stored-black olive mill wastewaters by *Geotrichum candidum*. *Pro. Biochem.*, (sous press).
- Auger D. (1989)** Methode du dosage de cadmium, du cuivre, du plomb et du zinc dans la chair du poisson. Direction de l'environnement et des recherches océanique. DERO 89-07-MB.
- Aveni A. (1984)** Biogaz from olive mill wastewater by anaerobic digestion. In anaerobic digestion and carbohydrate hydrolysis of waste. Eds Ferrero G.L., Ferranti M.P., Naveau H., Elsevier Applied Science, Barking.
- Baccioni L. (1981)** Ricido delle acque e loro incenerimento : una soluzione per la depurazione delle acque dei frantoi. *Riv. Ital. Sostanze Grasse*, LVIII, 34-37.
- Bajpai B., Patil S. (1997)** Induction of tannin acyl hydrolase (EC 3.1.1.20) activity in some members of fungi imperfecti. *Enzyme Microb Technol.*, **20**, 612-614.
- Balice V., Boari G., CERA O., Abbaticchio P. (1982)** Indagine analitica sulle acque di vegetazione. Nota 1., *Inquinamento*, **7**, 49-53
- Balice V., Cera O. (1984)** Acidic phenolic fraction of the juice of olives determined by gas chromatographic method. *Grasas y Aceites*, **25**, 178-180.
- Balice V., Carriera C., Cera O., Difacio A. (1986)** Naturel biodegradation in olive mill effluents stored in opened basins. In: *International Symposium on olive by products Valorization* FAO, Seville, Spain, 101-118.
- Balice V., Carieri C., Cera O., Rindone B. (1988)** the fate of tannin-like compounds from olive mill effluents in biological treatment. In: Hall, E. R. and hobson, P. N. (Eds). *Proceedings of the Fifth International Symposium: On Anaerobic Digestion*. Bologna, 275-280 Academic Press. Italy.
- Balice V., Carrieri C., Carrieri G. (1997)** Trattamento chimico-fisico seguito dal biologico delle acque di vegetazione delle olive, *Ricerca*, **2**, 50-53.
- Bambalov G., Israilides C., Tanchev S. (1989)** Alcohol Fermentation in olive Oil Extraction Effluents, *Biological Wastes*, **27**, 71-75.
- Barnett J.A., Payne R.W., Yarrow D. (1990)** *Yeasts: Characteristics and identification*. 40 West 20th Street, New York.

- Beccari M., Bonemazzi F., Majone M., Riccardi C. (1996)** Interaction between acidogenesis in the anaerobic treatment of olive oil mill effluents. *Wat. Res.*, **30**, 183-189.
- Beccari M., Majone M., Torrisi L. (1998)** Two reactor system with partial phase separation for anaerobic treatment of olive oil mill effluents. *Wat. Sci. Tech.*, **38**, 53-60.
- 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.
- Beccari M., Majone M., Petrangeli Papini M., Torrisi L. (2000)** Enhancement of anaerobic treatability of olive oil mill effluents by addition of Ca(OH)_2 and bentonite without intermediate solid/liquid separation. Proceedings of the First World Congress of International Water Association, Paris, July 3-7.
- Bechak J.P. Mercier B., Nuer P. (1984)** Traitement des eaux usées. Ed. Eyrolles, Paris, 281p.
- Benitez J., Bertrans-Heredia J., Torregrosa J., Acero J.L., Cercas V. (1997)** Aerobic degradation of olive mill wastewaters. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **47**, 185-188.
- Benlemlih M., Danglot C., Kuchta W., Vilagines R. (1991)** Perspectives ouvertes par le génie génétique sur les traitements des pollutions par les hydrocarbures. *Revue annuelle de Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer*, **7**, 228-247.
- Bertin L., Majone M., Di Gioia D., Fava F. (2001)** Anaerobic fixed-phase biofilm reactor system for the degradation of the low-molecular weight aromatic compounds occurring in the effluents of anaerobic digestors treating olive mill wastewaters. *J. Biotechnol.*, **87** (2), 161-77.
- Boari G., Brunetti A., Passino R., Rozzi A. (1984)** Anaerobic digestion of olive oil mill waste-waters. *Agric. Wastes*, **10**, 161-175.
- Borja R., Martin M.A., Duran Barrantes M.M. (1992)** Kinetic study of biomethanization of olive mill wastewater previously subjected to aerobic treatment with *Geotrichum candidum*. *Grasas y Aceites*, **43**, 82-86.
- Borja R., Garrido E.S., Martinez L., Cormenzana R.A., Martin M.A. (1993)** Kinetic study of anaerobic digestion of olive mill wastewater previously fermented with *Aspergillus terreus*. *Process Biochem.*, **28**, 397-404.
- Borja R., Martin A., Alonso V., Garcia A.I., Banks C.J. (1994a)** Influence of different aerobic pre-treatment on the kinetic of anaerobic digestion of olive mill wastewater. *Water Research*, **19**, 489-495.
- Borja R., Martin M.A., Maestro Duran R., Alba Mendoza J., Fiestas Ros de Ursinos J.A. (1994b)** Enhancement of the anaerobic digestion of olive mill wastewaters by removal of phenolic inhibitoris. *Process. Biochem.*, **27**, 231-237.
- Borja R., Banks C.J., Alba J. (1995a)** A simplified method for determination of kinetic parameters to describe the aerobic biodegradation of two important phenolic constituents of olive mill wastewater treatment by a heterogeneous microbial culture. *Eniro, Sci. Health., A.*, **30** (3), 607-626.

- Borja R., Alba J., Garrido S.E., Martinez L., Garcia M.P., Monteoliva M., Ramos-Cormenzana A. (1995b)** Effect of aerobic pretreatment with *Aspergillus terreus* on the anaerobic digestion of olive-mill wastewater, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **22**, 233-246.
- Borja R., Martin M.A., Banks C.J., Alonso V., Chica A. (1995c)** Kinetic study of anaerobic digestion of olive mill wastewater at mesophilic and thermophilic temperatures. *Environ. Pollution*, **88**, 13-18.
- Bouranis D.L., Vlyssides A.G., Drosopoulos J.B., Karvouni G. (1995)** Some characteristics of new organic soil conditioner from the co-composting of olive oil processing wastewater and solid residue. *Soil. Sci. Plant. Annal.*, **26**, 2461-2472.
- Bradford M.M. (1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.*, **72**, 248-254.
- Bradoo S., Gupta R., Saxena R.K. (1997)** Parametric optimization and biochemical regulation of extracellular tannase from *Aspergillus Japonicus*. *Proc Biochem.*, **32**, 135-139.
- Brenes M., Garcia A., Garcia B., Rios J.J., Garrido A. (1999)** phenolic compounds in spanish olive oils. *Agric. Food Chem.*, **47**, 3535-3540.
- Buldini P.L., Mevoli A., Quirini A. (2000)** On-line microdialysis-ion chromatographic determination of inorganic anions in olive-oil mill wastewater. *J Chromatogr A.*, **882** (1-2), 321-8.
- Cabello L., Fiestas Ros de Ursinos J.A. (1981)** Différentes utilisations des margines. Séminaire international sur la valorisation des sous-produits de l'olivier. FAO, Tunis. Tunisie.
- Cabrera F., Lopez R., Martinez-Bourdiu E., Dupuy De Lome E., Murillo J.M. (1996)** Land treatment of olive oil mill wastewater. *International Biodegradation and Biodeterioration*, **38**, 215-225.
- Cantarelli C., Brenna O., Giovanelli G., Rossi M. (1989)** Beverage stabilization through enzymic removal of phenolics. *Food. Biotech.*, **3**, 203-213.
- Capasso R., Evidente A., Scognamiglio F.A. (1992)** Simple thin layer chromatographic method to detect the main polyphenols occurring in olive oil vegetation waters, *Phytochemical. Analysis*, **3**, 270-275.
- Capasso R., Evidente A., Schivo L., Orru G., Marcialis M.A., Cristinzio G. (1995)** Antibacterial polyphenols from Olive Oil Mill Waste Waters. *J. Appl. Bacteriol.*, **79**, 393-398.
- Capasso R. (1997)** The chemistry, biotechnology and ecotoxicology of the polyphenols naturally occurring in vegetable wastes. *Curr. Top. Phytochem., Res. Trends*, **1**, 145-156.
- Capasso R., De Martino A., Arienzo M. (2002a)** Recovery and characterization of the metal polymeric organic fraction (polymerin) from olive oil mill wastewaters. *J Agric Food Chem.*, **50** (10), 2846-55.

Capasso R., De Martino A., Cristinzio G. (2002b) Production, characterization, and effects on tomato of humic acid-like polymerin metal derivatives from olive oil mill waste waters. *J Agric Food Chem.*, **50** (14), 4018-24.

Casa R., D'Annibale A., Pieruccetti F., Stazi S.R., Giovannozzi Sermanni G., Lo Cascio B. (2003) Reduction of the phenolic components in olive-mill wastewater by an enzymatic treatment and its impact on durum wheat (*Triticum durum* Desf.) germinability. *Chemosphere*, **50** (8), 959-66.

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.

Chamrani C. (1994) Etude et possibilités du traitement physico-chimique des margines des huileries d'olive du Maroc, Mémoire d'ingénieur d'état. IAV, Rabat. Maroc.

Chang S.K., Li C., Hiang S., Chang M.C. (1995) Intraspécific protoplast fusion of *Candida tropicalis* for enhancing phenol degradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **43**, 534-538.

Chimi H. (1997) Sous produits de la transformation des olives: possibilités de valorisation et de traitement des margines. Cours international sur l'amélioration de la qualité de l'huile d'olive. 30-11

Cichelli A., Solinas M. (1984) I composti fenolici delle olive e dell'olio di oliva. *Riv. Merceol*, **23**, 55-69.

COI. (2000) Conseil Oléicole International, Olivae (2000).

Cossu R., Blakey N., Cannas P. (1993) Influence of Codisposal of Municipal Solid Waste and Olive Vegetation Water on the Anaerobic Digestion of a Sanitary Landfill, *Wat Sci Tech.*, **27** (2), 261-271.

Cova B. (1988) Il processo snia fibre per il trattamento dei frantoi oleari. 2a tavola rotonda sulle acqua reflue dei frantoi. Accademia Ntionle dell'Olive. Spoleto, 334-39.

Cullen D., Krersten P.J. (1996) Enzymology and molecular biology of legnin degradation. *The Mycota III Biochimistry and Molecular Biology* (Branbl / Marzult ed 1), 295-312.

D'Annibale A., Crestini C., Vinciguerra V., Sermanni G.G. (1998) The biodegradation of recalcitrant effluents from an olive mill by a white-rot fungus. *J Biotechnol.*, **61** (3), 209-18.

D'Annibale A., Stazi S.R., Vinciguerra V., Giovannozzi Sermanni G. (2000) Oxirane-immobilized *Lentinula edodes* laccase: stability and phenolics removal efficiency in olive mill wastewater. *J Biotechnol.*, **77** (2-3), 265-73.

Dagley S. (1983) Microbial degradation of aromatic compounds. In proc. Of the fortieth general meeting of the society for industrial microbiology, August 14-19. Florida, USA.

- De Felice B., Pontecorvo G., Carfagna M. (1997)** degradation of waste waters from olive oil mills by *Yarrowia lipolytica* ATCC 20 255 and *pseudomonas pitida*. Acta Biotechnol., **17**, 231-239.
- Di Gioia D., Bertin L., Fava F., Marchetti L. (2001a)** Biodegradation of hydroxylated and methoxylated benzoic, phenylacetic and phenylpropenoic acids present in olive mill wastewaters by two bacterial strains. Res Microbiol., **152** (1), 83-93.
- Di Gioia D., Fava F., Bertin L., Marchetti L. (2001b)** Biodegradation of synthetic and naturally occurring mixtures of mono-cyclic aromatic compounds present in olive mill wastewaters by two aerobic bacteria. Appl Microbiol Biotechnol., **55** (5), 619-26.
- Diamadopoulos E., Samaras P., Sakellaropoulos G.P. (1992)** The effect of activated carbon properties on the adsorption of toxic substances. Wat. Sci. Tech., **25**, 153-160.
- Di-Giovacchino L., Mascolo A., Seghitti L. (1988)** Sulle caratteristiche delle acque di vegetazione delle olive. La Rivista delle Sotanze Grasse. 65.
- Di-Giovacchino L. (1996)** L'influence des systèmes d'extraction, sur la qualité de l'huile d'olive, Olivea, **63**, 52-63.
- Dommergues Y. (1971)** Interrelations sans caractère symbiotique entre la végétation et la microflore du sol : "l'effet litière". La vie dans les sols : aspects nouveaux, études expérimentales. Gauthier-Villars édit., Paris, 423-471.
- Douglas S., Mountfort D., White Asher R.A. (1990)** Oxidation of Lignin-related Aromatic Alcohols by Cell suspensions of *methylosinus trichosporium*. Appl. And. Environmtal. Microbiol., **56**, (1), 245-249.
- Dubois M., Gilles K., Hamilton J., Rebers P., Smith F. (1956)** Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem., **28**, 350-356.
- Dupont P.F., Hedrick L.R. (1971)** Deoxyribonucleic acid base composition and numerical taxonomy of yeasts in the genus *Trichosporon*. J. Gen. Microbiol, **66**, 349-359.
- Ehaliotis C., Papadopoulou K., Kotsou M., Mari I.I., Balis C. (1999)** Adaptation and population dynamics of *Azotobacter vinelandii* during aerobic biological treatment of olive-mill wastewater. FEMS Microbiol Ecol., **30** (4), 301-311.
- EL Kasmi, Brachman R., Fuchus F., Ragsdale S.W. (1995)** Hydroxybenzoyl-CoA reductase : Coupling. Kinetics and Electrochemistry to enzyme mechanisms.
- Ercoli E., Ertola R. (1983)** SCP production from olive black water. Biotechnol. Lett., **7**, 457-462.
- Ergüder T.H., Guven E., Demirer G.N. (2000)** Anaerobic treatment of olive mill wastes in batch reactors. Process Biochem., **36** (3), 243-248.
- Errachidi F. (1997)** Amélioration d'une souche de *Candida tropicalis* EF 14 pour la production d'éthanol et l'assimilation des phénols. Thèse de 3^{ème} cycle en biologie. Faculté des Sciences de Fès (Maroc).

- 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.
- Faostat (2001)** Base de Données Agricoles FAOSTAT-FAO.
- Fedeli E. (1977)** Lipids of olives. *Pros. Chem. Fats other lipids*, **15**, 57-74.
- Fell J. W. (1993)** Rapid identification of yeast species using three primers a polymerase chain reaction. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, **1**, 175-186.
- Fenice M., Giovannozzi Sermanni G., Federici F., D'Annibale A. (2003)** Submerged and solid-state production of laccase and Mn-peroxidase by *Panus tigrinus* on olive mill wastewater-based media. *J Biotechnol*, **100** (1), 77-85
- Fernandez Diaz M.J. (1983)** Olives. In Rehm HJ, Reed G (eds) *Biotechnology*, Verlag Chemie, Weinheim, **5**, 379-397.
- Field J.A., Lettinga G. (1991)** Treatment and detoxification of aqueous spruce bark extracts by *Aspergillus niger*, *Water Sci. Technol.*, **24**, 3/4 127-137.
- Fiestas Ros de Ursinos J.A. (1958)** Caractéristiques et Elimination des eaux résiduelles des usines à huile. I^{ère} Conférence Internationale des Techniciens oléicoles. 21-27, Mai, Tanger-Maroc. 5-12.
- Fiestas Ros de Ursinos J.A. (1961)** Estudio del alpechin para su aprovechamiento industrial V. Cinetica del desarrollo de la levadura *Torulopsis utilis* en el alpechin. *Grasas y Aceites*, **12**, 57-66.
- Fiestas Ros de Ursinos J.A. (1966)** Estudio del alpechin para su aprovechamiento industrial VII. Instalacion comercial para la obtencion de levaduras-pienso. *Grasas y Aceites*, **17**, 41-47.
- Fiestas Ros de Ursinos J.A. (1977)** Problemas del aprovechamiento y depuracion de las aguas residuales de las almazaras. XIII. Reunion plenaria asamblea mieembros dil instituto de la Grasa y Sus Derivados.
- Fiestas Ros de Ursinos J.A. (1981)** Différentes utilisations des margines. Actes du Séminaire Internatinal sur la valorisation des sous produits de l'olivier. Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (FAO). 93-110. Tunisie.
- Fiestas Ros de Ursinos J.A., Leon Gabello R., Garcia Buendia A.J., Maestrojuan Saez de Jauragui G.M. (1982)** Energy production in the olive oil industry from biomethanisation of its effluents. *Food Ind. Environ.*, **9**, 163-172.
- Fiestas Ros de Ursinos J.A. (1986)** Possibilidades de utilizacion del alpechin como fertilisante. Simposio Internacional. Sobre Valorizacion de los subproductos del olivar : alpechin y orujo. 5-6-7 Marzo, Sevilla- Aspana. 321-330.
- Fiestas Ros de Ursinos, J.A., Borja R. (1992)** Use and traetement of olive mill wastewater : Current situation and prospects in Spain. *Grasas y Aceites*, **2**, 101-106.

- Fiorelli F., Pasetti L., Galli E. (1996)** Fertility-Promoting metabolites produced by *Azotobacter vinelandii* grown on olive-mill wastewaters. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 165-167.
- Florenzano G., Balloni W. (1983)** Trattamento e utlizzazione delle acque di scarico di oleificio: considerazioni analitiche e proposte tecnologiche. *Genio Rurale*, **9**, 342-348.
- Flouri F., Sotirchos D., Ioannidou S., Balis C. (1996)** Decolorization of olive oil mill liquid wastes by chemical and biological means. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 189-192.
- 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.
- Francesco G.L. (1993)** Evaluations économiques sur l'innovation technologique. Les problèmes de l'environnement dans le lecteur oléicole en Italie. *Olivae*, **47**, 15-20.
- Galli E., Pasetti L., Volterra E., Tomati U. (1994)** Compost from olive processing industry waste waters. Congresso Internazionale, L'apporoccio Integrato della Moderna Biologia : Uomo, Territorio, Ambiente, **1**, 22-25. Vieste (FG). 22-25 Settembre Italia.
- Garcia Garcia I, Jimenez Pena PR, Bonilla Venceslada JL, Martin Martin A, Martin SantosMA, Ramos Gomez E.(2000)** Removal of phenol compounds from olive mill wastewater using *Phanerochaete chrysosporium*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* and *Geotrichum candidum*. *Process Biochem*, **35** (8), 751-758.
- Garcia-Ribera R., Monteoliva-Sanchez M., Ramos-Cormenzana A. (2001)** production of polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas putida* KT2442 harbouring pSK2665 in waste water from oil mills (alpechin). *EJB Electronic journal of Biotechnology*, **4** (2), 1-4.
- Garrido Hoyos S.E., MartinezNieto L., CamachoRubio F., RamosCormenzana A. (2002)** Kinetics of aerobic treatment of olive-mill wastewater (OMW) with *Aspergillus terreus*. *Pro. Biochem.*, **37**, 1169-1176.
- Gharsallah N. (1993)** Production of single cell protein from olive mill wastewater by yeasts. *Environ. Technol.*, **14**, 391-395.
- Gharsallah N. (1994)** Influence of dilution and phase separation on the anaerobic digestion of olive mill wastewaters. *Bioproc. Engineering*. **10**, 29-34.
- Gharsallah N., Labat M., Aloui F., Sayadi S. (1999)** The effect of *Phanerochaete chrysosporium* pretreatment of olive mill wastewaters on anaerobic digestion. *Ressources Conservation and recycling*, **27**, 187-192.
- Gibriel A.Y., Mahmoud R.M., Goma M., Abou-Zeid M. (1981)** Production of single cell protein from cereal by-products. *Agricultural Wastes*, **3**, 229-240.
- Giulietti A.M., Ercoli E., Ertola R. (1984)** Purification and utilization of olive black water and distillery slops by microbial treatment. *Acta Cient Venez* **35**, 76-86.

- Gonzalez M.D., (1986)** Ensayo de sensibilidad de bacterias aisladas de suelo frente al alpechin, Memoria de licenciatura. Faculta de Famacia Universidad de Granada. Espana.
- Gonzalez M.D., Moreno E., Quevedo-Sarmiento J., Ramos-Cormenzana A. (1990)** Studies on antibacterial activity of waste waters from olive oil mills (alpechin) : Inhibitory activity of phenolic and fatty acids. *Chemosphere*, **20**, 423-432.
- Goto S., Iwasaki H., Okuma Y., Ito Y., Endo A. (1987)** New species belonging to the genera *Pichia* and *Candida*. *Journal of general and Applied microbiology*, **33**, 275-286. [*Candida hinoensis*, *C. soli*, *C. solicola*, *Pichia galeiformis*]
- Hagerman A.E., Robbins C.T., Weerasuriya Y., Wilson T.C., Mcarthur C. (1992)** Tannin chemistry in relation to digestion. *Journal Range Manage*, **45**, 57-62.
- Hamdi M., Garcia J.L. (1991)** Comparison between anaerobic filter and anaerobic contact process for fermented olive mill wastewaters. *Biores. Technol*, **38**, 23-29.
- 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.
- Hamdi M., Bouhamed H., Ellouz R. (1991b)** Optimisation of *Aspergillus niger* growth on olive mill wastewaters, *Appl. Microbiol. Biothechnol.*, **36**, 285-288.
- Hamdi M., Khadir A., Garcia J.L. (1991c)** The use of *Aspergillus niger* for the bioconversion of olive mill waste-waters. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **34**, 828-831.
- Hamdi M. (1992)** Toxicity and biodegradability of olive mill wastewaters in batch anaerobic digestion. *Appl Biochem Biotechnol.*, **37**, 155.
- Hamdi M., Garcia J.L., Ellouz R. (1992)** Integrated biological process for olive mill wastewaters treatment. *Bioprocess. Eng.*, **8**, 79.
- Hamdi M., Ellouz P. (1993)** Treatment of detoxified olive mill wastewater's by anaerobic filter and aerobic fluized bed processes. *Environ. Technol.*, **14**, 183-188.
- Hamdi M., Garcia J.L. (1993)** Anaerobic digestion of olive mill wastewaters after detoxification by prior culture of *Aspergillus niger*. *Process Biochem.*, **28**, 155-159.
- Hamdi M. (1993a)** Future prospects and constraints of alive mill waste waters use and treatment : A. Review. *Bioprocess Engineering*, **8**, 209-214.
- Hamdi M. (1993b)** Thermoacidic precipitations of darkly coloured polyphénols of olive mill wastewaters, *Envirommental Technology*, **14**, 495-500.
- Hamdi M. (1993c)** Valorisation et épuration des effluents des huileries d'olives: l'utilité de la microbiologie industrielle. *Olivae*, **46**, 20-24.
- Hammel K.E., Moen A. (1991)** Depolymerisation of syntetic lignin in vitro by lignin peroxydase. *Enzyme. Microbiol. Technol.*, **13**, 15-18.

- Hansen E.C. (1883)** Undersqgjelser over alkoholgaersvampenes fysiologi og morfologi. II. Om askosporedannelsen hos slaegten *Saccharomyces*. Medd. Carlsberg Lab., **2**, 29-86.
- Horiguchi H., Yurimoto H., Kato N., Sakai Y. (2001a)** Antioxidant system within yeast peroxisome. Biochemical and physiological characterization of cbpmp20 in the methylotrophic yeast *Candida boidinii*. J. Biol. Chem., **276** (17), 14279-14288.
- Horiguchi H., Yurimoto H., Goh T.K., Nakagawa T., Kato N., Sakai Y. (2001b)** Peroxisomal Catalase in the Methylotrophic Yeast *Candida boidinii* : Transport Efficiency and Metabolic Significance. Journal of Bacteriology, **183** (21), 6372-6383.
- Hristozova T., Michailova L., Dmitriev V., Tsiomenko A., Roshkova Z., Tuneva D. (1994)** Investigations of mannan and glucan in the cell wall of *Candida boidinii* cultivated on methanol, A. V. Leeuwenhoek, **65** (1), 13-20.
- Iacazio G., Périssol C., Faure B. (2000)** A new tannase substrate for spectrophotometric assay. Journal of Microbiological Methods, **3**, 209-214.
- Iibuchi S., Minoda Y., Yamada K. (1967)** Studies on tannin acyl hydrolase of microorganisms. Part II. A new method determining the enzyme activity using the change of ultra violet absorption. Agric. Biol. Chem., **31**, 513-518.
- Jardak T. (1999)** Le secteur oléicole en Tunisie: Potentiel, contraintes et perspectives. The olive oil wastes Remediation Symposium. Sfax, Tunisia. 46-51.
- Kahraman S., Yesilada O. (1999)** Effect of spent cotton stalks on color removal and chemical oxygen demand lowering in olive oil mill wastewater by white rot fungi. Folia Microbiol., **44** (6), 673-676.
- Kahramann S., Yesilada O. (2001)** Industrial and Agricultural wastes as substrates for laccase production by white-rot Fungi. Folia microbial., **46** (2), 133-136.
- Karapinar M., Worgan M.J.T. (1983)** Bioprotein production from the waste products of olive oil extraction, J. Chem. Tech. Biotechnol., **33**, 185-188.
- Katayama-Hirayama K., Tobita S., Hirayama K. (1994)** Biodegradation of phenol and monochlorophenols by yeast *Rhodotorula glutinis*. Water Science and Technology, **30** (9), 59-66.
- Kieslich K. (1976)** Microbial transformations of non-steroid cyclic compounds. John Wiley and Sons Georg Thieme publishers, 1262 pp.
- 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.
- Klibanov A.M., Tu T.M., Scott K.P. (1983)** Peroxidase catalysed removal of phenols from coal-conversion wastewater's. Science, **22**, 259-261.
- Kodama K., Kyono T., Kodama S. (1955)** A study of film-forming yeasts (II). Genus *Pichia* (2). J. Ferment. Technol., **33**, 317-324.

- Koster I.W., Cramer A. (1980)** Inhibition of methanogenesis from acetate in granular sludge by long-chain fatty acids. *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**, 403-409.
- Kreger-van Rij. (1987)** The yeasts a taxonomic study; third revised and enlarged edition, Groninger, The Netherlands, Elsevier Science Publishers. B.V. Amsterdam.
- Lane R.W., Yamakoshi J., Kikuchi M., Mizusawa K., Henderson L., Smith M. (1997)** Safety evaluation of tannase enzyme preparation derived from *Aspergillus oryzae*. *Food and chemical Toxicology*, **35**, 207-212.
- Leger C.L., Kadiri-Hassani N., Descomps B. (2000)** Decreased superoxide anion production in cultured human promonocyte cells (THP-1) due to polyphenol mixtures from olive oil processing wastewaters. *J Agric Food Chem.*, **48** (10), 5061-7.
- Lekha P.K., Lonsane B.K. (1997)** Production and application of tannin acyl hydrolase : state of the art. *Adv. Appl. Microbiol.*, **44**, 215-260.
- Lettinga G., Van Velson A.F.M., Lobma S.W., de Zeeuw W., Klapwijk A. (1980)** Use of the upflow sludge blanket (USB) reactor concept for biological wastewater treatment, especiallt for anaerobic treatment. *Biotech. Bioeng.*, **222**, 699-734.
- Levis-Menzi R., Gaviozzi A., Riffaldi R., falzi L. (1992)** L'épandage au champs des margines : effet sur les propriétés du sol. *Olivae*, **40**, 20-25.
- Levis-Menzi R., Raffaldi R., Saviozzi A., Cardelli R. (1995)** Decomposition of anaerobically digested olive mill sludge, *Environmental. Science*, **7**, 1411-1422.
- Lombardo N., Bricolli Bati C., Marsilio V., Di-Giovacchino L., Solinas M. (1988)** Prime osservazioni sugli effetti somministrazioni di acqua di vegetatione al terreno agario, estratto da annali del l'instituto Sperimentale per lolivicoltura, **10**, 9-22.
- Longhi P., Vodopivec B., Fiori G. (2001)** Electrochemical treatment of olive oil mill wastewater. *Annali di Chimica*, **91**, 1696-174.
- Loulan P.Y., Thelier Y. (1987)** Procédé et dispositif de traitement par fermentation méthanique des eaux résiduaires lipidiques, Brevet français, 2620439.
- 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, Editions (GTZ) GmbH, Eschborn. République Fédérale d'Allemagne.
- Macheix J.J., Fleuriet A., Billot U. (1990)** Fruit phenolics. CRC Press Inc, Boca Raton Florida, 378p.
- Maeda-Yorita, Massey V. (1992)** On the reaction mechanism of phenol hydroxylase. new information obtained by correlation of fluorescence and absorbance stopped flow studies. *The journal of Biological chemistry*, **268**, 4139-4144.
- Maestro-Duran R., Borja R., Martin A., Fiestas Ros de Ursinos J.A., Alba Mendoza J. (1991)** Biodegradacion de los compuestos fenolicos presentes en el alpechin. *Grasas Y Aceites*, **42**, 271-276.

- 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.
- Martin A., Borja R., Garcia I., Fiestas J.A. (1991)** Kinetics of methane production from olive mill wastewater. *Process. Biochem.*, **26**, 101-107.
- Martin A., Borja R., Banks C.J. (1994)** Kinetic model for substrate utilization and methane production during the anaerobic digestion of olive mill wastewater and condensation water waste. *J. Chem. Biotechnol.*, **60**, 7-16.
- Martinez N.L., Ramos-Cormenzana A., Garcia Pareja M.P., Garrido Hoyos S.E. (1992)** Biodegradacion de compuestos fenolic del alpechin con *Aspergillus terrus*, *Grasas y Aceites*, **43** (2), 75-81.
- 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 Research*, **1** (30), 1914-1918.
- Masschelein C.A., Batum M.S. (1981)** Enzymic degradation and participation of ester linked beer polyphenols in chill haze formation. *Proc. Cong. Eun Brew. Conv. I8TH*, 359-370.
- Mendia L., Procino L. (1964)** Studio sul trattamento delle acque di rifiuto dei frantoi oleari. Pro. ANDIS conference. Bologna, Italy.
- Middelhoven W.J. (1993)** Catabolism of benzene compounds by Ascomycetous and Basidiomycetous yeasts and yeast like fungi. A. Literature Review and experimental approach. Antome van Leewenhoek. *International Journal of general and molecular microbiology*, **63**, 125-144.
- Millan B., Lucas R., Robles A., García T., Alvarez de Cienfuegos G., Gálvez A. (2000)** A study on the microbiota from olive-mill wastewater (OMW) disposal lagoons, with emphasis on filamentous fungi and their biodegradative potential *Microbiol Res.*, **155** (3), 143-7.
- Ministère des Travaux Public (1997)** Etat de qualité des eaux de l'oued de Sebou, Note présentée au séminaire sur l'évolution du projet d'élimination des margines à Fès en collaboration avec la communauté urbaine et la RADEEF, Fès. Maroc.
- Monties B. (1980)** Les polymères végétaux. Gautier-Villars (eds).
- Moreno E., Perez J., Ramos-Cormenzana A., Martinez J. (1987)** Antimicrobial effect of waste water from olive oil extraction plants selecting soil bacteria after incubation with diluted waste. *Microbios*, **51**, 169-174.
- Morisot A. (1979)** Utilisation des margines par épandage. *Olivae*. **19**, 8-13.
- Morisot A., Tournier J.P. (1986)** Répercussions agronomique de l'épandage d'effluents et déchets de moulins à huile d'olive. *Agronomie*, **6**, 235-241.
- Mouncif M., Tamoh S., Faid M., Achkari-Begdouri A. (1993a)** A study of chemical and microbiological characteristics of olive mill waste water in Morocco. *Grasas y Aceites*, **44**, 335-338.

- Mouncif M., Achkari-Begdouri A., Faid M. (1993b)** Traitement des margines par digestion anaérobique. Actes Inst. Agron. Vet. Maroc, **13** (2), 13-19.
- Mundt J.O. (1970)** lactic acid bacteria associated with raw plant food material. J. Milk Technol., **33**, 550-553.
- Murphy J., Riley J.P. (1962)** A modified single solution method for the determination of phosphate in natural water. Annal. Chim. Acta., 127.
- Nakamoto S., Machida M. (1991)** Phenol removal from aqueous solutions by peroxidase catalysed reaction using Additives. Wat Res., **26**, 49-54.
- Nakazawa T., Yokota T. (1973)** Benzeate metabolism of in *Pseudomonas putida* (arvilla) mt2; demonstration of benzoat athway. J. Bacteriol, **115**, 262-267.
- 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.
- Nicell J.A., Bewtra J.K., Taylor K.E., Biswas N. (1992)** Enzyme catalyzed polymerisation and precipitation of aromatic compounds from waste water. Wat. Sci. Tech., **25**, 157-164.
- 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 Sebou en amont du kariat ba Mohamed, rapport : 053/DC/05, Office National de l'eau potable, Rabat. Maroc.
- Oukili O., Chaouch M., Rafiq M., Hadji M., Hamdi M., Benlemlih M. (2001)** Bleaching of olive mill wastewater by clay in the presence of hydrogen peroxyde. Ann. Chim. Sci. Mat., **26**, 45-53.
- Papadimitriou E.K., Chatjipa I., Balis C. (1997)** Application of composting to olive mill wastewater treatment. Environmental technology, **18**, 101-107.
- Paredes M.J., Monteoliva-Sanchez M., Perez J., Ramos-Cormenzana A., Martinez J. (1986)** Effect of waste waters from olive oil extraction plants on the bacterial population of soil. Chemosphere, **16**, 1557-1564.
- Pazzynski A., Huynh V.B., Crawford R.L. (1985)** Enzymatic activities of an extracellular manganese dependant peroxidase from *phanerochate chrysosporium*. FEMS Microbiol Lett., **29**, 37-41.
- Peelen S., Rietjens I., Boersma M.G., Vervoort B.J. (1995)** Conversion of phenol derivatives to hydroxylated products by phenol hydroxylase from *Trichasporon cutanum*. A comparaison of regioselectivity and rate of conversion with calculated molecular orbital substrate characteristics. Eur. Journal of Biochemistry, **227**, 284-291.
- Pérez J., Gallardo Lara F., Astheban E. (1980)** Aspectos a considerar en el empleo del alpechin como fertilizante. I. Evaluacion de su efecto fitotoxico de la germinacion de semillas. Cuad. Cien. Biol., **7**, 59-67.

- Pérez J., Estheban E., Gomez M., Gallardo-Lara F. (1986)** Effects of wastewater from olive processing on seed germination and early plant growth of different vegetable species. *Environ. Sci. Health*, **49**, 349-357.
- Pérez J., Gallardo-Lara F. (1987)** Effects of the application of wastewater from olive processing on soil nitrogen transformation. *Commn. In Soil Sci. Plant Anal.*, **18**, 1031-1039.
- Pérez J., Rubia T., Moreno G., Martinez J. (1992)** Phenolic content and antibacterial activity of olive oil waste waters. *Environ. Toxicol. Chem.*, **11**, 489-495.
- Pérez J., Saez L., De la rubia T., Martinez L. (1997)** *Phanerochaete* flavido-alba ligninolytic activities and decolorisation of partially bio-depurated paper mill wastes. *Wat. Res.*, **31**, 495-502.
- Petrucchioli M., Servili M., Montedoro F., Federico F. (1988)** Development of recycle procedure for the utilization of vegetation waters in the olive-oil extraction process. *Biotechnol. Lett.*, **10**, 55-60.
- Piperidou C.I., Chaidou C.I., Stalikas C.D., Soulti K., Pilidis G.A., Balis C. (2000)** Bioremediation of olive oil mill wastewater: chemical alterations induced by *Azotobacter vinelandii*. 1: *J Agric Food Chem.*, **48** (5), 1941-8
- Pochon J.P., Tordux (1962)** Techniques d'analyse en microbiologie du sol .p.101 Collection Technique de base France.
- Pozo C., Martinez-Toledo M.V., Rodelas B., Gonzalez-Lopez J. (2002)** Effects of culture conditions on the production of polyhydroxyalkanoates by *Azotobacter chroococcum* H23 in media containing a high concentration of alpechin (wastewater from olive oil mills) as primary carbon source. *J. of Biotechnology*, **97**, 125-131.
- Proietti P., Cartechini A., Tombesi A. (1988)** Influenza delle acque reflue dei frantoi oleari su olivi in vaso e in campo. *L'informatore Agrario*, **45**, 87-91.
- Rahlkar S.B., Joshi S.R., Shivorman N. (1993)** Phototabolism of Aromatic compounds by *Rhodopsudomonas palustris*. *Cur. Mirbiol.*, **26**, 1-9.
- Raimbault M., Alazard D. (1980)** Culture method to study fungal growth in solid fermentation. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **9**, 199-209.
- 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.
- Ramos-Cormenzana A. (1990)** Studies on antibacterial activity of wastewaters from olive oil mills (alpechin) : inhibitory activity of phenolic and fatty acids. *Chemosphere*, **2**, 423-432.
- Ranalli A. (1989)** Fermenti selezionati nel trattamento biologico dell acque dei frantoi. Prove orientative col-complesso microbico S. N. K. D. *Industrie Alimentari*, **28**, 141-148.
- Ranalli A. (1991a)** The effluent from olive mills : Proposals for re-use and purification with reference to Italian legislation. *Olivae*, **37**, 30-39.

- Ranalli A. (1991b)** The effluent from olive mills : Proposals for re-use and purification with reference to Italian legislation. *Olivae*, **38**, 19-34.
- Ranalli A. (1991c)** The effluent from olive mills : Proposals for re-use and purification with reference to Italian legislation. *Olivae*, **39**, 26-40.
- Ranalli A. (1992)** Microbiological treatment of oil mill waste waters. *Grasas y Aceites*, **43**, 16-19.
- Reimers Suarez G. (1983)** Posibilidades de tratamiento del alpechin por ultrafiltracion y osmosis inversa, *Quimicae Industria*, 273-274.
- Renzo C., Amirante P. (1988)** Trattamento di osmosi inversa ed ultrafiltrazione, In proc. Of Inter. Symp, on olive mill wastewater traetment. COI-FAO-APROL, Lecce, Italy.
- Rigoni-Stern S., Rismondo R., Szpyrkowicz L., Zilio grandi F. (1988)** Anaerobic digestion of vegetation water from olive oil mills on a fixed biological bed with a biogas production. In: Proc. Of Fifth Int. Symp. On Anaerobic Digestion, Bologna, Italy, 22-26 May, Tilche, A. and Rozzi, A., (eds) pp. 561-565.
- Robert A.S., Ellen S.H., Connie A.N., Van Oorschrt. (1981)** Introduction to food-borne fungi. Central bureau Voor Schimmel cultures, Institute of royal netherlands, Academy of Arts and Sciences.
- Robles A., Lucas R., De Cienfuegos G.A., Galvez A. (2000)** Phenol-oxidase (laccase) activity in strains of the hyphomycete *Chalara paradoxa* isolated from olive mill wastewater disposal ponds. *Enzyme and Microbial Technology*, **26**, 484-490.
- Rodier J. (1996)** L'analyse de l'eau, 8^{ème} édition. Dunod, Paris. France.
- Rodriguez J.A., Ecchevarria J., Rodriguez F.J., Sierra N., Daniel A., Martinez O. (1985)** Solid state fermentation of dried citrus pell by *Aspergillus niger*. *Biotechnol. Lett.*, **7**, 577-580.
- Rozzi A., Passino R., limoni M. (1989)** Anaerobic treatment of olive mill effluents in polyurethane foam bed reactors. *Process Biochem.*, 68-74.
- Saiz-Jiménez C., Gomez Alarcon G., De Leeuw J.W. (1986)** Chemical properties of the polymer isolated in fresh vegetation water and sludge evaporation pond. FAO, on olive by-products valorisation. Madrid-Spanish, 41-60.
- Saiz-Jiménez C., De Leeuw J.W., Gomez Alarcom G. (1987)** Sludge from the waste water of the olive processing industry: A potential soil fertilizer. *Sci. total Environ.*, **52**, 445-452.
- Saez Mertre L.E. (1989)** Contenido fenolico del alpechin y actividal antibacteriana, licenciatura, Depto Microbiologia, facultad de farmacia, Universidad de Granada, Espana.
- Saez L., Perez J., Martinez J. (1992)** Low Molecular weight Phenolics Attenuation during Simulated Treatment of Wastewater from Olive Oil Mills in Evaporation Ponds. *Wat. Res.*, **26**, 1261-1266.

- Saito K. (1914)** Mikrobiologische Studien über die Bereitung des mandschurischen Branntweins. Rep., Centr. Lab. S. Manchurian Railway Co., 1, 1-60 (rev. in: Bull. Inst. Pasteur, 13, 1, 1915; Zentralbl. Bakteriologie Parasitenkunde, Abt II, 55, 323, 1922)
- Sakai Y., Yurimoto H., Matsuo H., Kato N. (1998)** Regulation of peroxysomal proteins and organelle proliferation by multiple carbon sources in the methylotrophic yeast, *Candida boidinii*. Yeast, **14** (13) 1175-1187.
- Salvimini V., Cera O. (1984)** Acidic phenolic fraction of the juice of olives determined by gas chromatographic method. Grasses y Aceites, **25**, 178-180.
- 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.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989)** Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Santovito G., Salvato B., Manzano M., Beltramini M. (2002)** Copper adaptation and methylotrophic metabolism in *Candida boidinii*. Yeast, **19** (7), 631-640.
- Sarah F.; C. Philif; Kersten, Daniel cullen (1989)** Recent Advances in the molecular genetics of lignin degradation fungus, *Phanerochaete chrysosporium*. Proc. Int. Synp. Biotechnology for energy. Eds :Malik. K. Nagri S.H and ALeeM MIH Published by NIAB, NIBGR Faisalabad Pakestan.
- Sayadi S., Ellouz R. (1992)** Decolouration of olive mill wastewaters by the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* involvement of the lignin-degrading system. Appl. Microbiol. Biotechnol., **37**, 813-817.
- Sayadi S., Ellouz R. (1993)** Screening of white rot fungi for the treatment of olive mill waste-waters. J. Chem. Biotechnol., **57**, 141-146.
- Sayadi S., Ellouz R. (1995)** Role of lignin peroxidase and manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* in the decolorization of olive mill waste-waters. Applied and Environmental Microbiology, **61**, 1098-1103.
- Sayadi S., Zorgani F., Ellouz R. (1996)** Decolorization of olive mill waste-waters by free and immobilized *Phanerochaete chrysosporium* cultures. Effect of the high-molecular-weight polyphenols. Appl Biochem Biotechnol., **56** (3), 265-76.
- Sayadi S., Allouche N., Jaoua M., Aloui F. (2000)** Detrimental effects of high molecular-mass polyphenols on olive mill wastewater biotreatment, Process Biochemistry, **35** (7), 725-735.
- Scandiaconsult (1992)** «Projet de gestion de l'environnement, Etude Institutionnelle, Juridique et de la pollution». Rapport de consultant préparé par Groupement SWEEP-SCANDIACONSULT, Suède, Commandité par la Banque Mondiale.
- Seng J.M. (1988)** Chitine, chitosane et dérivés: De nouvelles perspectives pour l'industrie. Biofutur, **71**, 40-44.

- Sethi R.P., Grainger J.M. (1980 a)** Conversion of banana into animal feed by *Aspergillus niger* using solid substrate fermentation. Advances in Biotechnology. Vol. 2. Moo-Young M and C.W. Robinson (eds). 71-79.
- Sethi R.P., Grainger J.M. (1980 b)** Conversion of mangostone into SCP for animal feed by *Aspergillus niger* using solid substrate fermentation. Advances in biotechnology. Vol. 2. Moo-Young M and C.W. Robinson (eds). 319-325.
- Shamar S., Bhat T.K., Dawra R.K. (1999)** Isolation, purification and properties of tannase from *Aspergillus niger* van Tieghem. World J. Biotechnol., **15**, 673-677.
- Shamar S., Bhat T.K., Dawra R.K. (2000)** A Spectrophotometric Method for Assay of Tannase Using Rhodanine. Anal. Biochem., **279**, 85-89.
- Sierra B., Navarro-Pedreno J., Gomez I., Mataix J. (1994)** Soil properties affected by wastes from olive oil processing industries. Fresenius, Environ. Bull. **3**, 381-386.
- Sierra J., Martí E., Montserrat G., Crauañas R., Garau 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.
- Spencer C.M., Cai Y., Martin J.D., Graffney S.H., Goulding P.N., Magnolato D., Lilley T.H., Haslam E. (1988)** Polyphenol complexation-some thoughts and observations. Phytochemistry, **27**, 2397-2409.
- Steegmans R. (1995)** Traitement des margines : Bilan des Expériences. Colloque National organisé par l'Ecole Hassania des Travaux Publics. Mai, Casablanca, Maroc, **101** (121), 16-17.
- Stelling-Dekker N. M. (1931)** Die sporogen hefen. Verh. Kon. Ned. Akad. Wetensch., Afd. Natuurk., Sect. II, **28**, 1-547.
- Strom J. (1989)** Evaporation del alpechin, Jornadas sobre innovacion tecnologica, medio ambiente y desarrollo, Sevilla. Espana.
- Suseela R.G., Nandy S.C. (1985)** Decomposition of tannic acid and gallic acid by *Penicillium chrysogenum*. Leather Science, **32**, 278-280.
- Tanchev S., Joncheva N., Genov N., Codounis M. (1980)** Identification of anthocyanins contained in olives. Georgike Ereuna, **4**, 5-73.
- Tien M., Kirk T.K. (1984)** Lignin-degrading enzyme from *phanerochaetae chrysosporium* purification. Characterisation and catalytic proprieties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **81**, 2280-2284.
- Tomati U., Galli E., Di Lena G., Buffone R. (1991)** Induction of laccase in *Pleurotus ostreatus* mycelium grown in olive oil astewaters. Agrochimica, **35**, 273-279.
- Tomati U., Galli E. (1992)** In Humus, its structure and role in agriculture and environment, Kubat J. Ed. Elsevier, London. 117-126.

- Tsioulpas A., Dimou D., Iconomou D., Aggelis G. (2002)** Phenolic removal in olive mill wastewater by strains of *Pleurotus* spp. In respect to their phenol Oxidase (laccase) activity. *Bioresource Technology*, **84**, 251-257.
- Tsonis S.P., Grigoropoulos S.G. (1988)** High rate anaerobic treatment of olive oil mill wastewater. Fifth Intern. Symp. On Anaerobic digestion, Bologna. Hall E.R. and Hobson P.N. (Eds), 115-124.
- Tsubouchi H., Yamamoto K., Hisada K., Sakabe Y. (1983)** Degradation of aflatoxins by *A. niger* and aflatoxin nonproducing *Aspergillus flavus*. *Shok. Eise. Zas.*, **24**, 113-119.
- Vaccarino C., Lo Curto R., Tripodo M.M., Lagana G., Patente R., Muano F. (1986)** Vegetation water treatment by anaerobic fermentation with fungi. Simposio Internacional sobre Valorizacion de los subproductos del olivar: Alpechin y Orujo. **23**, 5-6-7 Marzo, Sevilla-Espana.
- Van-Berkel W.J.H., Eppink H.M., MiddlHoven W.J., Vervoort Rietgens I.M.C.M. (1994)** Catabolism of 4-hydroxyBenzoate in *Candida parapsilosis* Proceeds through initial oxidative decarboxylation by a FAD-dependent 4-hydroxybenzoate 1-hydroxylase. *FEMS. Microbiology. Letters*, **121**, 207-215.
- Vazequez R.A., Maestro D.R., Graciani C.E. (1974)** Compentes fenolicos de la aceintuna. II. Poliphenoles del alpechin. *Grasas y Aceites*, **25**, 341-345.
- Vazequez R.A. (1978)** Les polyphénols de l'huile d'olive et leur influence sur les caractéristiques de l'huile, *Revue française des corps gras*, **25** (1), 21-26.
- Vinciguerra V., D'Annibale A., Delle Monache G., Sermanni G.G. (1995)** Correlated effects during the bioconversion of waste olive waters by *lentinus edodes*. *Bioresource Tochnol.*, **51**, 221-226.
- Voragen A.G.J., Rombouts F.M., Searle-Van M.J.F. (1987)** Conversion of arabinans by the arabinanases of *Aspergillus niger*. In proc. Int. Conf. On biomass for energy and industry, Orléans, France, 11-15 mai, 737-744.
- Wagner H., Bladf S., Zgainski E.M. (1984)** plant drug analysis. Translated by Scott Th.A. Springer-Verlag.
- Wang H.J., LeDall M.T., Waché Y., Laroche C., Belin J.M., Gaillardin C., Nicaud J.M. (1999)** Evaluation of Acyl Coenzyme A Oxidase (Aox) Isozyme Function in the *n*-Alkane-Assimilating Yeast *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Bacteriology*, **181** (17), 5140-5148.
- Wariishi H., Akileswaran L., Gold M.H. (1988)** Manganese Peroxidase from the Basidromycete *phanerochaete chrysosporium*: Spectral characterisation of the oxidized states and the catalytic cycle. *Biochemistry*, **27**, 5365-5370.
- Weete J.D. (1974)** Sterols of the funguis distribution and biosynthesis. *Phytochem*, **12**, 1843-1864.
- Weijman A.C.M. (1979)** Carbohydrate composition and taxonomy of *Geotrichum*, *Trichosporon* and allied genera. *Antonie van Leeuwenhoek*, **45**, 119-127.

- White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J. (1990)** Amplification and direct sequencing of fungal rRNA genes for phylogenetics, p315-322. In M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White (ed), PCR protocols : a guide to methods and applications. Academic Press, San Diego, Calif.
- Wickerham L.J., Burton K.A. (1948)** Carbon assimilation tests for the classification of yeasts. J. Bacteriol., **56**, 363-371.
- Wickerham L.J. (1951)** Taxonomy of yeasts. VS. Dept. Agric washinton. D. C. Tech. Bull., **1029**, 1-56.
- Yazicioglu T., Celikkol F. (1978)** Some trials on the utilisation of whey, black water of olive, and vinase for production of SCP. In Turkey. Cento Seminar on biological conversion of agricultural waste and by prodcts into food and animal feeds-stuffs.
- Yesilada O., Fiskin K., Yesilada E. (1995)** The use of white-rot-fungus *Funalia trogii* (Malatya) for the decolorization and phenol removal from olive mill waste water. Environ. Technol., **16**, 96-100.
- Yesilada O., Sam M. (1998)** Toxic effects of biodegraded and detoxified olive oil mill wastewaters on the growth *Pseudomonas aeruginosa*. Toxicol. Environ. Chem., **65**, 87-94.
- Yesilada O., Sik S., Sam M. (1998)** Biodegradation of olive oil mill wastewater by *Coriolus versicolor* and *Funalia trogii*: effects of agitation, initial COD concentration, inoculum size and immobilization. World Journal of Microbiology & Biotechnology, **14**, 37-42.
- Zenjari B., Hafidi M., El Hadrami Bailly J.P., Nejmeddine A. (1999)** Traitement aérobie des effluents d'huilerie par les micro-organismes du sol. Agrochimica, XLIII, 5-6.
- Zenjari B. (2000)** Etude ecotoxicologique des effluents liquides des huileries de la ville de Marrakech : Impact sur les milieux récepteurs et détoxification. Thèse de 3^{ème} cycle, Faculté des Sciences de Marrakech (Maroc).
- Zenjari B., Nejmeddine A. (2001)** Impact of spreading olive mill wastewater on soil characteristics : laboratory experiments. Agronomie, **21**, 749-755.
- Zimbalatti G. (1995)** A new and alternative technology to reduce the pollution caudes by oil mills; Seventh International Symposium on Agricultural and Food Processing Wastes (ISAFPW 95). American Society of Agricultural Engineers, 420-428.
- Zouari N., Ellouz R. (1996)** Microbial consortia for the aerobic degradation of aromatic compounds in olive oil mill effluent. Ind. Microbiol., **3**, 155-162.