

Physico-chemical and microbiological characterization of olive mill wastewater (OMW) of different regions of Tunisia (North, Sahel, South).

Caractérisation physico-chimique et microbiologique des margines de différentes régions de la Tunisie (Nord, Sahel, Sud).

H. ZAIER ^{*1}, W. CHMINGUI², H. RAJHI¹, D. BOUZIDI¹, S. ROUSSOS³, A. RHOUMA¹

¹ Laboratory of the improvement and protection of the genetic resources of the olive tree, Olive tree institute, Hédi Karray Street, P.O.Box 208, 2080, Ariana, Tunisia.

² Chemistry Laboratory for Water-Soil-Biosolids, National Research Institute for Rural Engineering, water, and Forestry, Hédi Karray Street, P.O.Box 10, 2080, Ariana, Tunisia.

³ Biotechnology and Chemometrics Team, St Jérôme Faculty, Campus Etoile, Aix Marseille University & Avignon University; IMBE UMR CNRS-7263/IRD-237, Case 421, 13397 Marseille cedex 20, France

*Corresponding author : hanen_zajer@yahoo.fr

Abstract – Olive mill wastewater (OMW) resulting from the extraction of olive oil is a major problem of the olive industry because of their highly polluting potential. The scientific research is increasing to propose alternatives solution to the direct discharge of these effluents into the natural environment. The objective of this work is to evaluate the degree of pollution OMW of the olive trituration units from different regions of Tunisia: north (Téboursouk, Al Karib, Gaâfour, Mornag), Sahel (Jemmal) and South (Sfax, Châal, Zarzis) by the determination of their physical-chemical and microbiological characteristics. The results of the physicochemical analyzes showed that the OMW of the different regions have an acidic pH and they are rich in organic matter, that is expressed by the BOD₅ and COD. These effluents are also characterized by the predominance of toxic substances, in particular phenolic compounds, the values are between 5.23 g/l in the Sfax region and up to 10.62 g/l in the Téboursouk region, which give them antimicrobial power. The report COD/BOD₅ is superior to 3 for all regions, which highlights the biodegradability of these OMW, where biological treatment appears to be quite appropriate. The count of the germs shows that the yeasts and the fungi represent the majority flora of the OMW of different regions. The analysis of the total aerobic mesophilic flora revealed that the largest number is recorded in the southern region (Sfax, Zarzis and Châal) compared to the other regions. This study showed also the total absence of fecal germs in the OMW of all the regions, which confirm that these effluents probably do not present a sanitary and hygienic problem and therefore is not considered an issue to the receiving environments.

Keywords : Olive mill wastewater, pollution, physical-chemical parameters, microbiology.

Résumé – Les déchets liquides (margines) résultant de l'extraction d'huile d'olive constituent un problème majeur de l'industrie oléicole à cause de leur pouvoir fortement polluant. Pour y faire face, les recherches scientifiques se multiplient pour proposer des solutions alternatives au déversement direct de ces effluents dans le milieu naturel. L'objectif de notre travail est d'évaluer la qualité physico-chimique et microbiologique des margines des unités de trituration d'olives afin de déterminer leurs degrés de pollution, à partir de différentes régions de la Tunisie : nord (Téboursouk, Al Karib, Gaâfour, Mornag), sahel (Jemmal) et sud (Sfax, Châal, Zarzis). Les résultats des analyses physico-chimiques ont montré que les margines des différentes régions ont un pH acide et elles sont riches en matière organique, qu'est exprimé par la DBO₅ et DCO. Ces rejets sont aussi caractérisés par la prédominance de substances toxiques notamment les composés phénoliques, on a noté des valeurs comprises entre 5.23 g/l dans la région du Sfax et peut atteindre jusqu'à 10.62 g/l dans la région du Téboursouk qui leur confèrent un pouvoir antimicrobien. L'examen de DCO/DBO₅ est supérieur à 3 pour toutes les régions qui souligne



bien le caractère biodégradable de ces margines auxquelles un traitement biologique paraît tout à fait convenable. Le dénombrement des germes montre que les levures et les champignons représentent la flore majoritaire des margines de différentes régions. L'analyse de la microflore mésophile aérobie totale a révélé que le nombre le plus important est enregistré dans la région du sud (Sfax, Zarzis et Châal) par rapport aux autres régions. Cette étude a montré l'absence totale des germes fécaux dans les margines de toutes les régions, ce que reflète que ces margines ne présentent probablement pas de problème sanitaire et hygiénique, et par conséquent, ne posent pas de danger sur les milieux récepteurs.

Mots clés : Margines, Biodégradable, demande chimique en oxygène, demande biochimique en oxygène, pollution, polyphénols.

1. Introduction

La Tunisie est le pays oléicole le plus important du Sud de la Méditerranée. Si l'on exclut l'Union européenne, la Tunisie est une grande puissance mondiale dans le secteur de l'huile d'olive, déployant de grands efforts de restructuration, de modernisation et d'amélioration de la qualité de ses huiles, accompagnés d'une considérable expansion de surfaces (Gharbi et al., 2014). Ainsi, l'olivier constitue la principale espèce fruitière plantée avec environ 1,7 million d'hectares, répartie du nord au sud dans des conditions bioclimatiques très variées, avec une grande diversité variétale, représentant près de 79% de la superficie arboricole totale et 34% des terres labourables (ONH 2015). En 2015, la Tunisie a exporté 312 000 tonnes d'huile d'olive sur les 340 000 produites. Cependant, l'industrie oléicole engendre l'huile d'olive comme produit principal, mais elle présente l'inconvénient de générer d'importantes quantités de sous-produits (Nefzaoui 1995). Il s'agit essentiellement des margines (liquides) et des grignons (pâteux) dont la fraction organique complexe leur confère un pouvoir fortement polluant (Martinez-Garcia et al. 2009). En effet, les quantités annuelles des grignons ont été estimées à 180000 tonnes, tandis qu'une tonne d'olive donne par pressage traditionnel 450 litres de margines et par pressage moderne 600 à 1200 litres de margines (Lakhtar et al. 2010). Les margines, ou eaux de végétation, sont des rejets très riches en matières organiques, parfois stockées provisoirement dans des cuves mais souvent lâchées dans la nature sur les sols agricoles (Zenjari et al. 2006). En conséquence, ces effluents posent de sérieux problèmes pour l'écosystème aquatique à cause de leur contenu en composés phénoliques solubles dans sa phase aqueuse. Ces composés aromatiques colmatent le sol, asphyxient et inhibent la croissance des organismes vivants (El Hajjouji et al. 2007). Cependant, avec la promotion des vertus bénéfiques de l'huile d'olive pour la santé, la demande mondiale ne cesse d'augmenter et par conséquent la production croît constamment pour répondre aux besoins des consommateurs (Conseil Oléicole International 2005). Ainsi, la création des moulins pour la trituration des olives de plusieurs producteurs, forme des points de concentration des polluants non résorbables par le pouvoir épurateur des milieux. Or pour les huileries, la nécessité de produire une huile de qualité, avec le minimum d'impacts négatifs sur l'environnement, est une condition essentielle pour qu'elles puissent rester concurrentielles sur le marché (Mebirouk 2002). De plus l'image de pollueur peut nuire à l'image de marque de l'entreprise et peut l'exposer à des sanctions en fonction de la législation qui devient de plus en plus contraignante (Benyahia et Zein 2003). Ces considérations ont conduit plusieurs chercheurs à choisir la voie du traitement et de la valorisation des margines pour limiter leurs pollutions (Hafidi et al. 2005). Ces applications dépendent essentiellement des caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques de ces effluents. Ces caractéristiques varient selon la variété des olives triturées, des conditions climatiques, de l'utilisation des engrais et du système de trituration (Zenjari et al. 2006). Ainsi les travaux de valorisation qui ont été effectués sont surtout orientés vers la valorisation des margines par la voie biologique (aérobies, anaérobies) (Hamdi 1996). Des travaux ont été aussi effectués sur la bioconversion des composés phénoliques des margines par les microorganismes en molécules d'intérêt comme l'hydroxytyrosol (Karray 2008). La valorisation des margines par épandages agricole a été largement étudiée par plusieurs chercheurs (Ben Rouina et al. 2002; Yaakoubi et al. 2009). Divers procédés sont applicables aussi, tels que les traitements physico-chimiques (coagulation/floculation, filtration sur membrane...) (Ouabou et al. 2014; Sbai et Loukili 2015), les traitements thermiques (incinération, évaporation,...) (Jail et al. 2010) et le traitement par des bassins d'évaporation naturelle qui reste actuellement, la technique la plus usitée en raison de sa simplicité (Esmail et al. 2014). Cependant, les questions environnementales doivent être prises en compte lors du choix de la méthode appropriée pour éviter de créer un impact pire sur l'environnement au lieu de résoudre un problème. Par conséquent, une évaluation environnementale complète de l'une de ces solutions doit être effectuée avant

de l'examiner. Dans cette étude, nous avons essayé de déterminer le degré de pollution des échantillons des margines de différentes régions de la Tunisie : nord (Téboursouk, Al Karib, Gaâfour, Mornag), sahel (Jemmal) et sud (Sfax, Châal, Zarzis), en se basant sur les résultats de dénombrement de la charge microbienne afin d'établir le lien entre la présence et l'absence des microorganismes et l'effet des paramètres polluants (polyphénols, DBO₅ et DCO).

2. Matériel et Méthodes

2.1. Milieu et échantillonnage

Les échantillons des margines ont été prélevés à partir de 8 unités de trituration équipées d'un système continu à trois phases, situées dans différentes régions de la Tunisie (Al krib, Téboursouk, Mornag, Gaâfour, Sfax, Zarzis, Châal, Jammel).

Les régions concernées forment 3 groupes de point de vue géographique et surtout climatique (Fig. 1). Les échantillons de margines qui ont fait l'objet de cette étude ont été prélevés pendant la campagne oléicole (Novembre 2015-Mars 2016). Les échantillons ont été prélevés et homogénéisés à partir du bassin de stockage, et obtenu sans modification de leurs caractéristiques. Les résultats analytiques et leur interprétation dépendent étroitement de la manière de prélèvement, de conditionnement et de la durée de stockage. Pour cela, nos échantillons ont été prélevés dans des flacons propres de 2 litres pour les dosages physico-chimiques. Ceux qui sont destinés aux analyses microbiologiques ont été conservés à -20°C propres.

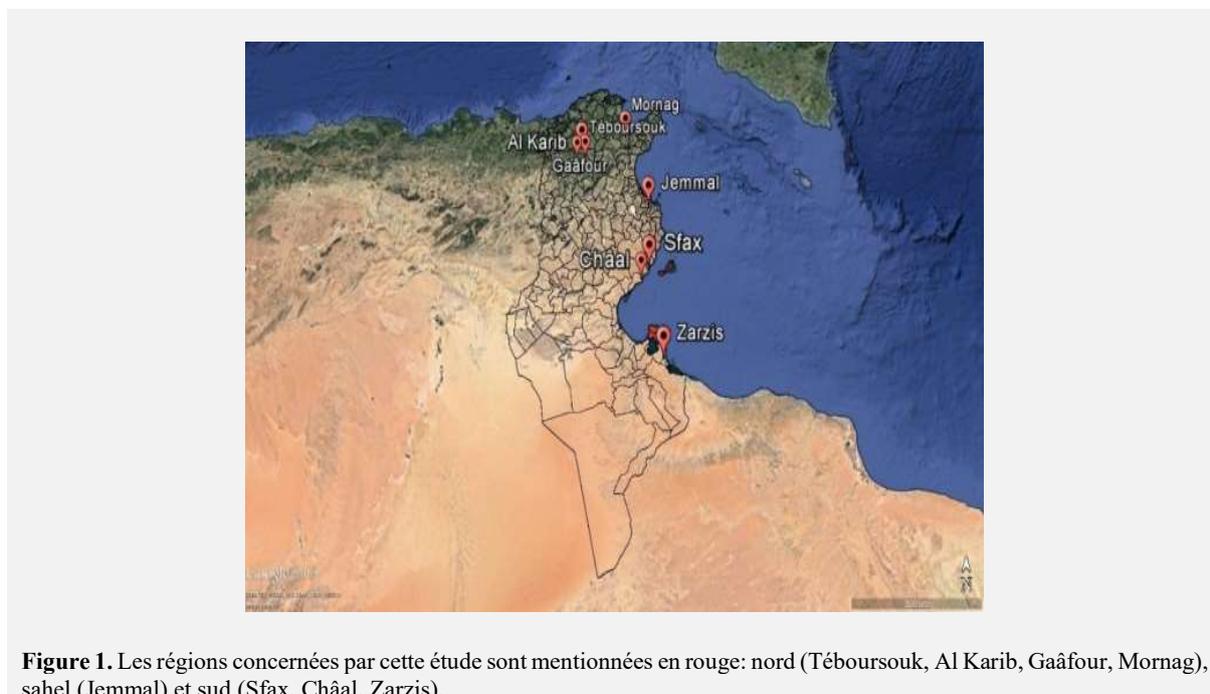


Figure 1. Les régions concernées par cette étude sont mentionnées en rouge: nord (Téboursouk, Al Karib, Gaâfour, Mornag), sahel (Jemmal) et sud (Sfax, Châal, Zarzis).

2.2. Analyses des échantillons

2.2.1. Analyses physico-chimiques

La caractérisation physico-chimique a été basée sur l'étude des paramètres suivants : Acidité (pH), Conductivité électrique (CE), compositions chimiques des échantillons par le spectre infrarouge, Taux de cendre (TC), matière sèche (MS), matière volatiles (MV), matière organique (MO), polyphénols totaux, demande biochimique en oxygène (DBO₅) et demande chimique en oxygène (DCO). Tous les échantillons ont été homogénéisés avant l'analyse.

* Le potentiel d'hydrogène (pH) a été mesuré par un pH-mètre de type HANNA HI-9143, l'instrument est préalablement étalonné avec des solutions tampon pH 4; 7 et 10. L'essai est répété trois fois pour chaque échantillon.

* La Conductivité (CE) a été directement mesurée sur la margine fraîche par un conductimètre de type WTW model inolab cond 730, elle est exprimée en mS.cm⁻¹.

* Les matières en suspension (MES) ont été déterminées par centrifugation d'un volume de 20 ml de margines à 8000 tours/mn pendant 20 minutes. Le culot a été mis dans une coupelle en porcelaine préalablement pesée puis séchée 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.

* La matière sèche (MS) est constituée par l'ensemble des substances organiques et inorganiques en solution ou en suspension, contenues dans les margines. La MS a été déterminée par évaporation d'un échantillon de 10 ml dans une coupelle en porcelaine préalablement séchée et tarée, à 105°C jusqu'à poids constant. La teneur en matière sèche, est exprimée en g/l.

* Matière volatile (MV) la matière volatile a été déterminée en faisant la différence entre la matière sèche obtenue et les résidus de cendres issus de la calcination à 550°C dans un four à moufle pendant 2h. Elle est exprimée en g/l par rapport au poids sec.

* Taux de cendres la matière sèche obtenue a été ensuite calcinée à 550°C dans un four à moufle pendant 24 heures ; elle est exprimée en g/l.

* Matière organique les échantillons secs des margines ont été calcinés dans un four à moufle à 450°C. Après refroidissement dans un dessiccateur ils sont pesés. Se basant sur l'hypothèse que les cendres récupérées sont constituées de 100 % de matière minérale, la détermination de la teneur de la matière organique est faite par différence entre le poids sec et le poids après calcination (Pauwels et al., 1992).

* La demande chimique en oxygène (DCO) : la détermination de la DCO a été 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 (H₂SO₄), et en présence du sulfate d'argent comme catalyseur et du sulfate de mercure comme complexant des chlorures. 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.

* La demande biochimique en oxygène (DBO₅) : Elle est déterminée selon la méthode respirométrique dans une enceinte thermostatée à 20°C (AFNOR T 90103), en obscurité et pendant 5 jours. Les échantillons de margines ont été préalablement dilués,ensemencés par des eaux usées urbaines et leur pH a été ajusté à pH neutre.

*Indice de biodégradabilité (Ib) : Le rapport DCO/DBO₅ permet de déterminer Ib, indicateur de l'importance des matières polluantes peu ou pas biodégradables (Rodier 1996).

Si :

Ib > 6 Substrat difficilement biodégradable

3 < Ib < 6 Substrat partiellement (ou moins facilement) biodégradable

Ib < 3 Substrat très facilement biodégradable

* Dosage des polyphénols totaux par colorimétrie : le dosage des composés phénoliques a été effectué avec la méthode de Folin- Ciocalteu (De Marco et al. 2007). Cette méthode est basée sur la réduction d'un mélange d'acide phosphotungstique (Réactif de Folin-Dennis). Les monophénols et les polyphénols réduisent ce réactif à un mélange bleu d'oxyde de tungstène et de molybdène. La coloration produite présente un maximum d'absorption à 765 nm. La quantification des composés phénoliques a été faite en fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire de la forme $y = ax$ réalisée en utilisant le tyrosol comme référence. Les résultats seront donc exprimés en équivalents de tyrosol.

* Spectroscopie infrarouge : L'appareil utilisé dans cette étude est un spectromètre à transformé de fourrier AVATAR 370 FT-IR de la société Thermo Nicolet. Pour analyser, les échantillons de poudre des margines lyophilisés sont analysés par réflexion ATR (diamant) dans une pièce climatisée à 21°C. La poudre est déposée sur l'accessoire ATR et on la presse grâce à l'enclume. Les conditions d'acquisition des spectres sont les suivantes : acquisition en réflexion totale atténuée, gamme spectrale de 4000 cm⁻¹ à 400 cm⁻¹, résolution de 4 cm⁻¹, 100 accumulations de scans. Chaque échantillon a été analysé en triplicata. L'analyse chimiométrique des spectres a été réalisée avec le logiciel « The Unscrambler version 9.6» développé par CAMO (Computer Aided Modelling, Trondheim, Norway).

2.2.2. Etude microbiologique des margines

Les analyses microbiologiques des margines ont été portées sur les germes indicateurs de pollution qui regroupent les bactéries hétérotrophes aérobies mésophiles tels que : Coliformes Totaux (CT) et Coliformes Fécaux (CF), Flore Mésophile Aérobie Totale (FMAT) des Streptocoques Fécaux (SF), des levures et des champignons filamenteux.

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

* La Flore Mésophile Aérobie Totale (FMAT) : Le milieu de culture utilisé est la gélose nutritive à pH 7. L'incubation des boîtes étalées a été effectuée à 37°C pendant 24 heures et elle est exprimée en UFC [unités formant colonies].

* Les coliformes fécaux et totaux : Le dénombrement a été effectué sur milieu EMB (Eosine Méthylène Bleu) après 48 h d'incubation à 37°C pour les coliformes totaux et à 44°C pour les coliformes fécaux.

* Les streptocoques fécaux (SF) : Les streptocoques fécaux sont également des témoins d'une contamination d'origine fécale, leur dénombrement est effectué sur milieu Milieu Slantez et Bantley. Les boîtes de Petri étalées ont été incubées à 37°C pendant 24 à 48 heures.

*Les levures : L'évaluation de l'abondance des levures se fait sur milieu Sabouraud auquel est ajouté le chloramphénicol (0.25g/litre) comme antibiotiques afin d'inhiber toute croissance bactérienne. L'incubation a été réalisée à 30°C pendant 48 à 72 heures.

*Les champignons : Le dénombrement a été effectué sur un milieu Gélose dextrosé à la pomme de terre (PDA), auquel a été ajouté le chloramphénicol (0.25g/litre). L'incubation a été réalisée à 30°C pendant 4 à 5 jours.

3. Résultats et Discussion

3.1. Caractérisation physico-chimique

L'analyse comparative des caractéristiques physico-chimique des margines dans les différentes régions étudiées a montré que dans la plupart du temps, les margines sont caractérisées par un pH acide (entre 4,7 et 5,15), en raison de la présence des acides organiques (acides phénoliques, acides gras, ...) (Tableau 1). Ainsi les valeurs enregistrées dans notre étude se trouvent dans la limite de la fourchette citée dans la littérature (4,2 à 5,9) (Eroglu et al. 2008). Cependant l'acidité des margines est liée à la durée de leur stockage dans les bassins de stockages. Ceci peut être expliqué aussi par des réactions d'auto-oxydation et de polymérisation qui transforment les alcools phénoliques en acides phénoliques (Hamdi 1991). Ces réactions se manifestent par un changement de la coloration initiale des margines vers une couleur noire très sombre (Assas et al. 2002). En effet, nos échantillons de margines sont caractérisés par une coloration noire très foncée. La composition minérale des margines des différentes régions étudiées a montré que ces eaux résiduaires présentent une forte charge saline due particulièrement aux chlorures de sodium, liée probablement au salage pratiqué pour conserver les olives jusqu'à leur trituration, en plus de la richesse naturelle des olives en sels minéraux (Levi-Minzi et al. 1992). Ceci pourra s'expliquer par les valeurs élevées de la conductivité électrique trouvées dans les différentes huileries étudiées (entre 11 et 13 mS/cm). Les teneurs moyennes des margines en matière sèche et en matière volatile sont de l'ordre de 75 g.l⁻¹ et de 64 g.l⁻¹ respectivement. La matière volatile représente 80% de la matière sèche, ce qui montre la nature organique de ces margines. Ce pourcentage est proche de celui observé par plusieurs auteurs (Assas et al. 2002; Fountoulakis et al. 2002; Fadil et al. 2003). Les margines de différentes régions sont très riches en matières en suspension, leur teneur moyenne est comprise entre 9.4 et 18.2 g.l⁻¹. Cependant, les valeurs moyennes enregistrées au cours de notre étude ont été élevées ceci pourrait être expliqué que dans les bassins, les matières en suspension des margines baissent sous l'effet de la décantation et ceci est probablement dû à l'effet du vent et/ou de l'agitation provoquée au moment du déchargement des margines. Ces valeurs sont similaires à celles rapportées par d'autres auteurs dans les margines (Al-Malah et al. 2000; Assas et al. 2002). De même les margines sont très chargées en matières organiques exprimées en termes de DBO₅ et DCO. Ainsi, d'après le Tableau 1, les valeurs obtenues peuvent atteindre 86,71 g/l (DBO₅), 286,3 (DCO) et 57. 2 g.l⁻¹ matière organique dans la région d'Al Karib (Nord de la Tunisie). Pour la région de Jammel (Sahel) nous avons trouvé 80.5 g.l⁻¹ (DBO₅), 266.53 (DCO) et 56.2 g.l⁻¹ matière organique pour la région du sud Zarzis une valeur de l'ordre de 82.1 g.l⁻¹ (DBO₅), 274,39 (DCO) et 59.6 g.l⁻¹ matière organique. Ceci montre la forte demande en oxygène pour l'oxydation complète de la matière organique contenue dans ces effluents qui reflète leurs pouvoirs polluant très important. Ainsi, cette teneur en DCO est très élevée par rapport à celle enregistrée dans d'autres types de rejets : Ces valeurs sont 200 à 400 fois supérieures à celles des eaux municipales (Tabet et al. 2006). 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. 2007). Toutefois, nos valeurs restent comparables à celles obtenues par plusieurs auteurs

dans des margines issues du système de centrifugation (Ergüder et al. 2000; Tsioulpas et al. 2002). L'indice de la biodégradabilité (Ib) exprimé par le rapport DCO/DBO₅ a une importance pour la définition de la chaîne d'épuration d'un effluent. Les résultats de ce rapport constituent une indication de l'importance des matières polluantes peu ou pas biodégradables. En effet, une valeur faible du rapport DCO/DBO₅ implique la présence d'une grande proportion de matières biodégradables et permet d'envisager un traitement biologique. Inversement, une valeur importante de ce rapport indique qu'une grande partie de la matière organique n'est pas biodégradable et, dans ce cas, il est préférable d'envisager un traitement physico-chimique. Ainsi, les valeurs moyennes du rapport DCO/DBO₅ des différentes régions étudiées est supérieur à 3 qui est le seuil limite de biodégradabilité. Donc, on peut conclure que même si les margines de différentes régions présentent une charge organique élevée, elles sont partiellement biodégradables. L'examen de ce rapport souligne bien le caractère biodégradable des margines de différentes régions de la Tunisie auxquelles un traitement biologique paraît tout à fait convenable. Ces résultats concordent avec ceux observés par Gnagne et Brissaud (2003) et Zerhouni (2003). Ces rejets sont aussi caractérisés par la prédominance de substances toxiques notamment les composés phénoliques. Des valeurs de 5.23 g.l⁻¹ ont été mesurées dans la région de Sfax et peuvent atteindre 10.62 g.l⁻¹ dans la région de Téboursouk. Cette concentration élevée pourrait limiter toute biodégradation naturelle, et par conséquent pourrait entraîner une perturbation plus ou moins profonde de tout l'écosystème. Néanmoins, les valeurs de ces paramètres sont plus au moins proches à celles trouvées dans plusieurs travaux, ayant fait l'objet de traitement des margines (Kissi et al. 2001, Fountoulakis et al. 2002, khoufi et al. 2008). Ainsi, les composés phénoliques sont des substances organiques cycliques très variées. Selon Jail et al (2010), leur solubilisation dans l'huile est inférieure à celle dans les eaux de végétation, ce qui explique leur concentration élevée dans les margines. Selon Justino et al (2012), ces composés ont une structure variable, ils proviennent de l'hydrolyse enzymatique des glucosides et des esters de la pulpe des olives au cours du processus de l'extraction. D'après les résultats, dans la région du nord (Al karib, Téboursouk, Mornag et Gaâfour) on a noté les concentrations les plus élevées en composés phénoliques par apport aux régions du sahel et du sud, ceci pourrait limiter toute biodégradation naturelle, et par conséquent pourrait entraîner une perturbation plus ou moins profonde de tout l'écosystème. Cette variabilité de la composition phénolique des margines entre les régions dépend non seulement de la variété, de la maturité de fruit et des conditions climatiques, mais aussi de la durée de stockage des margines et des procédés technologiques utilisés pour séparer la phase aqueuse (margines) de la phase huileuse (Gimeno et al. 2002; Léger 2008). Les spectres MIR-FTIR obtenus pour tous les échantillons des margines lyophilisés étaient semblables par une inspection visuelle. D'après la Figure 2 qui illustre les spectres moyens de chaque échantillon de différentes régions, tous les spectres sont caractérisés par des bandes d'absorption communes. Cependant, malgré la similitude du modèle général, certaines différences dans les intensités relatives de l'absorbance spectrale ont été observées entre les différents échantillons des margines. Ainsi, L'examen de spectre MIR fait apparaître clairement une bande large et intense à 3125-3700 cm⁻¹ qui représente l'élongation O-H observée pour les phénols. La bande située environ à 2929 cm⁻¹ est assignée à l'élongation symétrique et asymétrique de la liaison C-H aliphatiques 2850-2980 cm⁻¹ le plus souvent indiscernables et noyées dans une seule enveloppe. Les bandes situées vers 1409 cm⁻¹ et 1565 cm⁻¹ sont due à l'élongation >C=C< aromatique. La bande intense à 1300-1000 cm⁻¹ représente l'élongation =C-O- phénols et éthers aromatiques, et celle située vers 700 cm⁻¹ et 600 cm⁻¹ peut être attribuée à l'élongation C-Cl des chlorures d'alkyles.

Tableau 1: Les caractéristiques physico-chimiques moyennes des échantillons de margines de différentes régions.

Echantillons	pH	CE (ms/cm)	PT (ppm/tyrosol)	MS (g/l)	MV (g/l)	MO (g/l)	MES (g/l)	TC (g/l)	DBO ₅ (g d'O ₂ /l)	DCO (g d'O ₂ /l)	Ib
Al Karib	4,7	11,1	10,093	90,5	79,4	57,2	17,06	13,57	86,71	286,3	3,301
Téboursouk	4,85	12,8	10,62	61,7	49,7	51,09	9,425	8,69	76,05	253,08	3,327
Mornag	4,9	12,7	8,026	74,6	58,1	65,9	21,36	10,62	74,3	247,41	3,329
Gaâfour	4,95	12,6	7,71	48,03	73,6	41,2	18,2	6,77	75,73	252,08	3,328
Jammel	5,15	13,2	6,9	65,07	56,8	56,2	11,2	8,87	80,04	266,53	3,329
Sfax	5	12,5	5,23	83,5	79,1	71,4	15,46	12,16	65,87	219,34	3,329
Zarzis	5,05	12,4	7,5	95,1	81,4	59,59	16,96	16,85	82,1	274,39	3,342
Châal	5,1	12,3	5,63	80,7	71,8	58,06	16,42	12,72	80,35	267,65	3,331

CE: conductivité électrique, MS: matière sèche, MV: matière volatile, MO: matière organique, MES: matière en suspension, TC: Taux de cendre, DBO₅: demande biochimique en oxygène, DCO: demande chimique en oxygène, Carbone, N: Azote, PT: Polyphénols Totaux, Ib: indice de la biodégradabilité

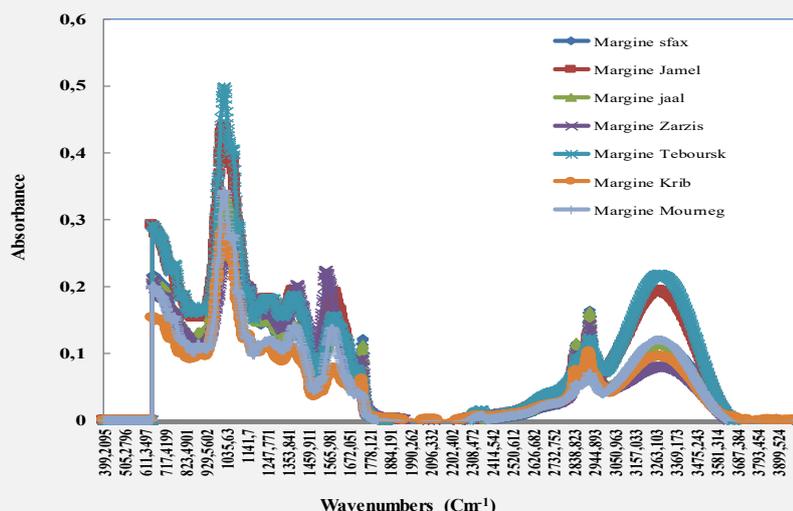


Figure 2. Les spectres typiques de FTIR-ATR moyen des échantillons de margines en poudre ont été enregistrés pour les différentes régions de la Tunisie.

3.2. Caractéristiques microbiologique des margines

La présente étude s'est consacrée au dénombrement de la charge microbienne des margines pour établir le lien entre la présence et l'absence des microorganismes et l'effet des paramètres polluants (polyphénols, DBO₅ et DCO). C'est aussi une mise en évidence des microorganismes résistants ou capables de survivre dans les margines.

Ainsi, les résultats du dénombrement des germes présentés dans le Tableau 2 montrent que les levures et les champignons représentent la flore majoritaire des margines de différentes régions. 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 (Esmail et al. 2014; 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. Parmi les levures, on trouve *Trichosporium cutaneium*, *Cryptococcus albidius* ainsi que les genres *Rhodotorula* sp., *Candida* sp. et *Saccharomyces* sp. (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 charge microbienne totale est évaluée par le dénombrement de la flore mésophile aérobie totale (FMAT).

Tableau 2. Dénombrements microbiologiques des échantillons de margines de différentes régions.

Echantillons	FMAT(10 ³ ufc/ml)	CT(10 ³ ufc/ml)	CF(10 ³ ufc/ml)	ST(10 ³ ufc/ml)	LE(10 ³ ufc/ml)	Champignons (10 ³ ufc/ml)
Al Karib	12	0	0	0	274	47
Téboursouk	8	0	0	0	354	22
Mornag	17	0	0	0	420	71
Gaâfour	10,4	0	0	0	114	65
Jammel	21	0	0	0	151	81
Sfax	3,16.10 ²	0	0	0	Incomptable	316
Zarzis	4,13. 10 ²	0	0	0	Incomptable	413
Châal	3,81.10 ²	0	0	0	Incomptable	472

FMAT: flore mésophile aérobie totale, Coliformes Totaux, CF: Coliformes fécaux, ST: Streptocoques

D'après les résultats trouvés les échantillons de margines de la région du sud (Sfax, Zarzis et Châal) ont révélé le nombre le plus important de la flore mésophile aérobie totale par rapport aux autres régions, ainsi la charge microbienne totale est de l'ordre de 3,16. 10⁵ ufc/ml, 4,13.10⁵ ufc/ml et 3,81. 10⁵ ufc/ml pour les régions de Sfax, Zarzis et Châal respectivement ainsi nous avons trouvés des valeurs respectivement de 12.10³ ufc/ml, 8.10³ ufc/ml, 17. 10³ ufc/ml, 10,4. 10³ ufc/ml et 21.10³ ufc/ml pour les régions de Al karib, Téboursouk, Mornag, Gaâfour et Jammel. Cependant cette charge microbienne

totale dans toutes les régions reste relativement faible par rapport à celle enregistrée dans les effluents d'abattoir ($1,23 \cdot 10^6$ UFC/ml) (Aissam et al. 2007). Ceci peut être lié essentiellement du procédé d'extraction, des conditions opératoires adoptées de la région et également des conditions de stockage des margines et des caractéristiques physico-chimiques qui gênent la croissance des micro-organismes notamment la présence des substances antimicrobiennes (pH, les composés phénoliques, les sels minéraux les métaux lourds, tanins, les acides gras...). Pour vérifier s'il y a une éventuelle contamination fécale 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 de toutes les régions. Des résultats similaires ont été obtenus par des autres chercheurs (Millan et al. 2000; Aissam 2003). Ainsi, une étude microbiologique est effectuée sur des olives crues a montré la présence d'une flore très diversifiée (Asehraou, 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 et les pigments bruns ou catéchol-mélaninique (Ranalli 1991a). Ces effluents agissent sur les bactéries en dénaturant les protéines cellulaires et en altérant les membranes (Ranalli 1991 b). Ils peuvent inhiber également l'activité des bactéries symbiotiques fixatrices d'azote dans le tube digestif des ruminants en inhibant leur activité enzymatique (Hattenschwiler et Vitousek 2000).

A la lumière des résultats obtenus, nous pouvons conclure que les margines de différentes régions étudiées ne présentent probablement pas de problème sanitaire et hygiénique, et par conséquent, ne posent pas de danger sur les milieux récepteurs.

4. Conclusion

Le rejet des margines des industries productrices d'huile d'olives est un problème majeur surtout pour les pays du bassin méditerranéen du fait qu'elles renferment une fraction organique importante et provoquent plusieurs types de pollution. La variabilité des résultats obtenus à partir des propriétés physico-chimique et microbiologique des échantillons de marge est due essentiellement à une différence de nature géographique et climatiques de chaque région étudiée, ainsi que la stade de maturation des olives, la variété des oliviers, le système de culture, le temps de stockage des olives avant la trituration, les techniques et lieu de stockage, la nature de conservation des olives, le procédé d'extraction d'huile d'olive qui représente l'élément le plus important. Ces caractéristiques jouent un rôle important dans le processus de traitement biologique des margines, la richesse de leurs répercussions sur la croissance et le développement des microbes, ainsi que sa capacité de traitement. Cette étude, aussi a permis de montrer que les margines de différentes régions étudiées ont une charge organique élevée et elles sont partiellement biodégradables d'après le rapport DCO/DBO₅ et par la suite les procédés de traitement biologiques de ces margines sont plus efficaces que ceux physico-chimiques. Les résultats microbiologiques ont montré l'absence totale des germes fécaux dans les margines de toutes les régions. Nous pouvons conclure donc que les margines de différentes régions étudiées ne présentent probablement pas de problème sanitaire et hygiénique, et par conséquent, ne posent pas de danger sur les milieux récepteurs.

5. Références

- 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.
- Aissam H (2003)** Etude de la biodégradation des effluents des huileries (margines) et leur valorisation par production de l'enzyme tannase. Thèse de doctorat, Faculté des sciences, Dhar El Mehraz, Fes, pp. 69-70.
- Aissam H, Penninckx M, Benlemlih M (2007)** Reduction of phenolics content and COD in olive oil mill wastewaters by indigenous yeasts and fungi. World. J. Microbiol Biotechnol 23: 1203-1208.
- Al-Mallah K, Azzam MOJ, Abu-Lailm NI (2000)** Olive mill effluent (OME) wastewater post-treatment using activated clay. Sep. Pur. Technol 20: 225-234.
- Asehraou A, Faid M, Akhartouf R (1993)** Pure culture fermentation of green olives by lactobacilli strains. Microbiologie-Aliments-Nutrition 11: 221-228.

- Assas N, Ayed L, Marouani L, Hamdi M (2002)** Decolorization of fresh and stored and stored-black olive mill wastewaters by *Geotrichum candidum*. *Process Biochemistry* 38:361–365.
- Ben Rouina B, Gargouri K, Taâmallah H (2002)** L'utilisation des margines comme fertilisants en agriculture. Journées méditerranéennes de l'olivier, France, pp16.
- Benyahia N, Zein K (2003)** Analyse des problèmes de l'industrie de l'huile d'olive et solutions récemment développées. Contribution spéciale de Sustainable Business Associates (Suisse) à SESEC II, pp 2-7.
- Justino CIL, Pereira R, Freitas AC, Rocha-Santos TAP, Panteleitchouk TSL, Duarte AC (2012)** Olive oil mill wastewaters before and after treatment: a critical review from the ecotoxicological point of view. *Ecotoxicology* 21: 615-629.
- COI (2005)** Conseil Oléicole International Amélioration de la qualité de l'huile d'olives. Madrid-Espagne. pp 10.
- De Marco E, Savarese M, Paduano A, Sacchi R (2007)** Characterization and fractionation of phenolic compounds extracted from olive oil mill wastewaters. *Food Chem* 104: 858-867.
- El Hajjouji H, Fakharedine N, Ait Baddi G, Winterton P, Bailly JR, Revel JC, Hafidi M (2007)** Treatment of olive mill waste-water by aerobic biodegradation, An analytical study using gel permeation chromatography, ultraviolet-visible and Fourier transform infrared spectroscopy. *Bioresource Technology* 98: 3513-3520.
- Ergüder TH, Güven E, Demirer GN (2000)** Anaerobic treatment of olive mill wastes in batch reactors. *Process Biochemistry* 36: 243-248.
- Esmail A, Abed H, Firdaus M, Chahboun N, Mennane Z, Berny EH, Ouhssine M (2014)** Étude physico-chimique et microbiologique des margines de trois régions du Maroc. (Ouzazane, Fès Boulman et Béni Mellal). *J. Mater. Environ. Sci.*5:121-126.
- 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.
- Fountoulakis MS, Dokianakis SN, Kornaros ME, Aggelis GG, Lyberatos G (2002)** Removal of phenolics in olive mill wastewaters using the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Water Res* 36 (19): 4735-44.
- Gharbi I, Issaoui M, Hammemi M (2014)** La filière huile d'olive en Tunisie. *Oil crops and supply chain in Africa* 21 (2): 1-6.
- Gimeno M, Castellote AI, Lamuela-Raventos RM, De la Torre MC, Lopez-Sabater MC (2002).** The effects of harvest and extraction methods on the antioxidant content (phenolics, a-tocopherol, and b-carotene) in virgin olive oil. *Food Chemistry* 78: 207–211.
- Gnagne T, Brissaud F (2003).** Etude des potentialités d'épuration d'effluents d'abattoir par infiltration sur sable en milieu tropical. *Sud Sciences & Technologies* n°11.
- Hafidi M, Amir S, Revel JC (2005)** Structural characterization of olive mill waste-water after aerobic digestion using elemental analysis, FTIR and ¹³C NMR. *Process Biochemistry* 40: 2615-2622.
- Hamdi M (1991)** Nouvelle conception d'un procédé de dépollution biologique des margines, effluents liquides de l'extraction de l'huile d'olive. Thèse de doctorat Université de Provence, Aix Marseille, pp. 75.
- Hamdi M (1996)** Anaerobic digestion of olive mill wastewaters. *Process Biochemistry* 31: 105-110.
- Hattenschwiler S, Vitousek PM (2000)** The role of polyphenols in terrestrial ecosystem nutrient cycling. *Tree* 15: 238-243.
- Jail A, Boukhoubza F, Nejmeddine A, Sayadi S, Hassani L (2010)** Co-treatment of olive-mill and urban wastewaters by experimental stabilization ponds. *Journal of Hazardous Materials* 176: 893-900.
- Karray Hamza M (2008)** Bioconversion enzymatique des composés phénoliques des effluents issus de l'extraction d'huile d'olive: une voie prometteuse de valorisation par la production de l'hydroxytyrosol naturel. Thèse de doctorat Université de Sfax, pp. 94-95.
- Khoufi S, Aloui F, Sayadi S (2008)** Extraction of antioxidants from olive mill wastewater and electro-coagulation of exhausted fraction to reduce its toxicity on anaerobic digestion. *J. Hazard. Mater* 151: 531-539.
- 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: 221-6.

- Lakhtar H, Ismaili-Alaoui M, Philippoussis A, Perraud-Gaime I, Roussos S (2010)** Screening of strains of *Lentinula edodes* grown on model olive mill wastewater in solid and liquid state culture for polyphenol biodegradation. *International Biodeterioration and Biodegradation* 64: 167–172.
- Léger CL (2008)** Les polyphénols de l'olive de table et de l'huile d'olive vierge, 2 formes de consommation de l'olive-drupe – Propriétés antioxydantes et rôles biologiques. 1^{ères} Journées Scientifiques du Génie des Procédés Appliqué à l'Agroalimentaire. Inra Marseille(France). <http://www.gp3a.auf.org>.
- Levi-Minzi R, Saviozzi R, Riffaldi AR, Falzo L (1992)** L'épandage au champ des margines : effets sur les propriétés du sol. *Olivae* 40: 20-25.
- Martinez-Garcia G, Johnson AC, Bachmann RT, Williams CJ, Burgoyne A, Edyvean RGJ (2009)** Anaerobic treatment of olive mill wastewater and piggery effluents fermented with *Candida tropicalis*. *J Hazard Mater* 164: 1398-1405
- Mebirouk M (2002)** Rejets des huileries, Développement d'un procédé intégré pour la biodégradation des polyphénols dans la margine. *CMPP News*, n°11.
- 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* 155:143-7.
- Mundt JO (1970)** Lactic acid bacteria associated with raw plant food material. *J. Milk Technol* 33: 550-553.
- Nefzaoui A (1995)** Feeding value of Mediterranean ruminant feed resources. *Advanced course Syria March 1995* 12-23.
- ONH (2015)** Office National de l'Huile. <http://www.onh.com.tn/index.php/fr/2016-05-23-14-44-46/l-olivier/patrimoine-et-repartition>.
- Ouabou E, Anouar A, Hilali S (2014)** Traitement de la margine brute d'huile d'olive par distillation suivi de neutralisation par la chaux. *Journal of Applied Biosciences* 79:6867–6872.
- Pauwels JM, van Ranst E, Verloo M, Mvendo ZEA (1992)** Manuel de laboratoire de pédologie. Méthodes d'analyses des sols et des plantes, équipements, gestion de stocks de verrerie et de produits chimiques. Bruxelles: Administration Générale de la Coopération au Développement (AGCD).
- Ranalli A (1991 a)** L'effluent des huileries d'olive: Propositions en vue de son épuration. Références aux normes italiennes en la matière. Première partie. *Olivae* 37: 30-39.
- Ranalli A (1991 b)** The effluent from olive mills: Proposals for reuse and purification with reference to Italian legislation. *Olivae* 38: 19-34.
- Rodier J (1996)** L'analyse de l'eau : eaux naturelles, eaux résiduaires, eaux de mer. Huitième édition DUNOD Paris, pp 1384.
- Sbai G, Loukili M (2015)** Traitement des margines par un procédé couplant la coagulation floculation et la voie électrochimique. *European Scientific Journal* 9: 1857–7881.
- Tabet D, Saidi M, Houari M, Pichat P, Khalaf H (2006)** Fe-pillared clay as a Fenton-type heterogeneous catalyst for cinnamic acid degradation. *Journal of Environmental Management* 80: 342-346.
- 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
- Yaakoubi A, Chahlaoui A, Rahmani M, Elyachioui M, Oulhote Y (2009)** Effet de l'épandage des margines sur la microflore du sol. *Agrosolutions* 20(1): 35-43.
- Zenjari B, El Hajjouji H, Ait Baddi G, Bailly JR, Revel JC, Nejmeddine A, Hafidi M (2006)** Reduction of toxic compounds during the composting of olive mill wastewater straw mixture. *Journal of Hazardous Materials* 138: 433-437.
- Zerhouni RA (2003)** Flore algale des eaux usées de la ville de Fès et étude de la capacité de certaines espèces à éliminer la charge azotée, phosphatée et quelques métaux lourds (Chrome et Cadmium). Thèse de Doctorat, Faculté des Science, Dhar El Mahraz, Fès, Maroc, pp. 146.