

PROCEEDINGS



Biotechnologies et qualité des produits de l'olivier dans le bassin méditerranéen

Biotechnology and quality of Olive tree products around the Mediterranean basin

Edited by

My Mustapha ISMAILI-ALAOUI,
Sevastianos ROUSSOS & Isabelle PERRAUD-GAIME



A Éditions
CTES

PROCEEDINGS

Biotechnologies et qualité des produits de l'olivier dans le bassin méditerranéen

Biotechnology and quality of Olive tree
products around the Mediterranean basin

Edited by

**My Mustapha ISMAILI-ALAOUI¹,
Sevastianos ROUSSOS² & Isabelle PERRAUD-GAIME²**

- ¹ Laboratoire des Biotransformations, Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, B.P. 6202-Instituts, Madinate Al Irfane, 10101 Rabat, Maroc. Courriel: m.ismaili@iav.ac.ma
- ² Unité Biotrans R-185, IMEP Case 441, FST Saint Jérôme, Université Paul Cézanne, Av. Escadrille Normandie-Niemen, 13397 Marseille cedex 20, France. Courriel: s.roussos@univ-cezanne.fr

PROCEEDINGS

REMERCIEMENTS

Les organisateurs tiennent à remercier Monsieur Hassan AOURID, Wali de la région Meknès-Tafilalet, Monsieur Mhand LAENSER, Ministre de l'Agriculture, du Développement rural et des Pêches maritimes, Monsieur Moha MARGHI, Secrétaire général du Ministère de l'Agriculture, du Développement rural et des Pêches maritimes, le Directeur Exécutif du Conseil Oléicole International (IOOC), l'Union Européenne, My Mehdi ALAOUI, Ambassadeur du Maroc en Lybie, le Gouverneur de la province d'Errachidia, le Président du conseil régional de la province d'Errachidia, le Pr. Fouad GUESSOUS, Directeur de l'Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, le Pr. Mohamed BADRAOUI de l'IAV Hassan II, Monsieur M. HARRAS, Directeur de l'Office Régional de Mise en Valeur Agricole de Tafilalet (ORMVAT), le Dr Henri GUILLAUME, Directeur de l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD, Maroc), le Centre des Études et de Recherches Sahariennes Errachidia (CERS), le Secrétaire général du Centre International de Hautes Études Agronomiques Méditerranéennes (CIHEAM), les membres des différents comités dudit séminaire ainsi que l'ensemble des délégations internationales, nationales et les différents sponsors qui ont contribué activement à la réussite de cette manifestation, notamment le CRDI-Canada. Les remerciements sont également adressés à Hervé MACARIE (IRD) pour son excellente assistance et au Pr. Moussa ETTALIBI pour sa précieuse aide lors de la correction des manuscrits et de l'édition de cet ouvrage.

© Actes Éditions, 2006

Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II,
B.P. 6202-Instituts, Madinate Al Irfane, 10101 Rabat, Maroc
Courriel: m.ettalibi@iav.ac.ma

Dépôt légal: 2006/2324

ISBN : 9981-801-71-2

Tous droits de reproduction et de traduction réservés

Sommaire

Préface	7
Identification of olive (<i>Olea europaea</i> L.) genotypes using SSR and RAPD markers	9
Effets du type d'explant, de l'acide tri-iodobenzoïque et du nitrate d'argent sur le microbouturage de l'olivier	15
Improving micropropagation and somatic embryogenesis protocols for olive tree (<i>Olea europaea</i> L.) cv. 'Moroccan Picholine'	23
Effets de l'état physique du milieu et des subcultures sur les paramètres de croissance <i>in vitro</i> des microboutures de la Picholine marocaine	31
Effets du type et de la concentration de sucres sur l'induction et le développement des embryons somatiques chez l'olivier cv. Picholine marocaine	39
Enracinement <i>in vitro</i> et production de vitroplants d'olivier (<i>Olea europaea</i> L.) à partir d'arbres adultes	45
Le secteur oléicole dans le Tafilalet. Situation actuelle et perspectives	53
Mécanisation de la récolte des olives en Tunisie. Résultats et perspectives d'avenir	61
Olive (<i>Olea europaea</i> L.) responses to environmental constraints in Mediterranean agroecosystems	69
Activité photosynthétique, fluorescence chlorophyllienne et relation hydrique chez l'olivier (<i>Olea europaea</i> L.) cvs. Chemlali et Chetoui durant un stress hydrique	89
Impacts de la nature du sol sur la vigueur et la production de l'olivier au Sud tunisien	105
Quelques aspects de la gestion de l'eau par l'olivier durant la sécheresse 2000-2002 en Tunisie aride	119
Conduite technique des oliveraies et impact sur les rendements en huile d'olive dans le périmètre du Tadla	129
Essais d'évaluation des pertes causées par l'hylésine (<i>Hylesinus oleiperda</i> Fabr., Coleoptera, Scolytidae): approche du seuil de nuisibilité	135
Study of the possibility to control olive powdery mildew (<i>Leveillula taurica</i>) with the use of soft and biological fungicides	143
Screening of salt tolerant <i>Olea europaea</i> L. seedlings by <i>in vitro</i> technology	147
Élevage en masse des Trichogrammes spp. Amélioration des conditions de production ...	155
Pig slurry as amendment of olive culture	169
Mycoflore naturelle des olives dans les Maâsra et pouvoir toxigène des souches d' <i>Aspergillus</i> sur céréales	175
Changes in phenolic content and antioxidant activity of Chemlali olive fruits during maturation	193
Stabilité oxydative (photooxydation) de l'huile d'olive vierge. Influence du degré de maturité des olives	199
Optical inspection for quality separation of olive fruit	207
Élaboration des olives vertes de table: contrôle de la fermentation et amélioration du rendement	215
Caractérisation et prétraitement des margines par la chaux	223

Traçabilité et labellisation des produits de terroirs. Cas des huiles d'olives	229
Tentative de modernisation des Maâsra traditionnelles. Unité mobile d'extraction des huiles d'olives	243
Évolution de la technologie d'élaboration de l'huile d'olive vierge en Espagne durant la décennie 1994-2004	259
Co-compostage des boues riches en polyphénols issues du traitement des margines	269
Impact des margines traitées et non traitées sur la microflore nitrifiante et des formes azotées du sol	275
Electro-Fenton oxidation of olive mill wastewater phenolic compounds	285
Distribution écologique des champignons filamenteux thermophiles isolés à partir des principales Maâsra du Maroc	293
Effet antioxydant de <i>Lactobacillus plantarum</i> sur l'augmentation des composés phénoliques de l'huile d'olive	307
Bioconversion des composés phénoliques de la margine par les bactéries lactiques	313
Production des bactéries lactiques et leurs potentialités d'applications aux produits de l'olivier	317
Temporal evolution of the olive mill pomaces during composting	329
Powerful bio-active compounds from olive mill effluents	335
Isolement d'une nouvelle espèce bactérienne du genre <i>Bacillus</i> , transformant le p-hydroxyphényléthanol en acide p-hydroxy-phénylacétique à partir de saumures d'olives tunisiennes	341
Conversion des tanins par <i>Lactobacillus plantarum</i>	345
Contribution à l'étude des effets protecteur et conservateur de quelques extraits d'olive et de composés phénoliques purifiés des margines	349
Headspace extraction and identification of Tunisian virgin olive oil aroma components ..	355
High value compounds from olive mill wastes	361
A common policy to face the problem of olive oil mill wastes	375
Use of a selected strain of <i>Lactobacillus pentosus</i> in the production of black- (<i>Itrana</i> and <i>Leccino</i> Cv.) table olives at pilot plant-scale	383
Atelier 1. Génétique, marqueurs moléculaires et sélection variétale	401
Atelier 2. Agronomie et stress hydrique et protection des plantes	419
Atelier 3. Technologie, récolte et post-récolte, transformation des olives, qualité et sécurité	443
Atelier 4. Biotechnologies pour la valorisation des co-produits et protection de l'environnement	467
Conclusions et recommandations des ateliers thématiques	509
Synthèse de clôture	517
Comités	521
Liste des participants	525
Table des matières	531

Préface

La Méditerranée constitue le berceau d'origine pour la culture de l'olivier. Autrefois, on disait que l'olivier s'arrête là où la Méditerranée s'arrête. Aujourd'hui l'olivier a pu dépasser les frontières de la Méditerranée pour aller conquérir d'autres régions du Globe! Mais il semble que les qualités distinctives intrinsèques sont difficiles à reproduire ailleurs.

Le potentiel mondial oléicole est d'environ 9.000.000 ha plantés avec 800 millions d'oliviers, faisant travailler 7 millions de familles et procurant plus de 7 milliards \$ pour une production mondiale d'huile d'olive aux alentours de 2.151.000 tonnes.

Au Maroc, la culture de l'olivier est considérée parmi les cultures les plus anciennes du fait de sa large adaptation aux différents microclimats. Ainsi, l'olivier s'est bien adapté aux conditions édapho-climatiques du Royaume et constitue aujourd'hui la deuxième essence fruitière du pays avec 600.000 ha repartis en 400.000 exploitations agricoles. La culture de l'olivier contribue à la valorisation des terres marginales et à la protection de l'environnement. Elle constitue aujourd'hui l'une des bases essentielles du développement rural avec une production d'environ 600.000 tonnes d'olives. La filière assure une couverture à hauteur de 16 % des besoins en huiles alimentaires du pays et demeure un pourvoyeur important d'emploi en milieu rural et urbain avec la création de 15 millions de journées de travail, soit l'équivalent de 60.000 emplois permanents. Sur le plan économique, la filière contribue aussi à l'équilibre de la balance commerciale en procurant une entrée en devises équivalente à 100 millions \$ par l'exportation d'olives de table et d'huiles d'olive.

La mise en place en 1998 du Plan National Oléicole (PNO) pour le développement du secteur oléicole est venue pour accompagner et appuyer les efforts des différents acteurs visant l'amélioration de la productivité et de la qualité des productions. Partant d'une vision globale en associant les différents maillons de la production, de la transformation et de la commercialisation, le PNO vise essentiellement:

- La mobilisation des potentialités existantes en matière d'extension.
- L'amélioration des performances des différentes composantes de la filière oléicole.
- La contribution à la satisfaction des besoins du pays en huiles alimentaires.
- La participation à l'équilibre de la balance commerciale.
- La création de l'emploi en milieu rural.
- La mise en valeur agricole des zones marginales et protection de l'environnement.

Le premier séminaire sur les Biotechnologies et Qualité des Produits de l'Olivier dans le Bassin Méditerranéen (Olivebioteq-2004) a eu lieu du 22 au 24 novembre 2004 à Errachidia au Maroc. Il a été organisé par le Ministère de l'Agriculture, du Développement Rural et des Pêches Maritimes (MADRPM), l'Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II (IAV Hassan II) de Rabat, l'Office Régional de Mise en

Valeur Agricole de Tafilalet (ORMVAT) en collaboration avec l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD, France), le Conseil Oléicole International (IOOC), la Province d'Errachidia, le Centre des Études et Recherches Sahariennes d'Errachidia (CERS) et le Centre International de Hautes Études Agronomiques Méditerranéennes (CIHEAM). Ce séminaire, le premier de son genre, a rassemblé plus de 180 participants dont 85 représentants des pays du bassin méditerranéen, d'Asie, ...

Olivebioteq-2004 s'était fixé quatre thématiques:

- Génétique, marqueurs moléculaires, variétés d'oliviers adaptés à l'aridité;
- Agronomie, résistance au stress hydrique, développement durable des zones arides;
- Transformation des olives, qualité et sécurité;
- Biotechnologie pour la valorisation des sous-produits et protection de l'environnement.

L'organisation de cette manifestation à Errachidia, berceau de la dynastie alaouite, recèle de nombreuses considérations culturelles et économiques du fait que cette région a participé durant des siècles à la diffusion de la culture de l'olivier dans le bassin méditerranéen.

Les organisateurs se sont proposés de favoriser le rapprochement de différents acteurs de la filière de l'olivier dans le bassin méditerranéen, d'amorcer une réflexion sur le développement régional durable des zones arides et semi-arides, de procéder à un échange d'informations et de connaissances et d'optimiser les progrès scientifiques et techniques dans ce domaine en vue de renforcer la coopération nord-sud, de promouvoir l'avancement et la diffusion technologique sur le traitement post-récolte des olives pour un développement durable et d'établir des partenariats entre les professionnels du secteur dans les pays méditerranéens.

D'ailleurs, la pérennisation de cet événement a été approuvée à travers une organisation biennale de cette manifestation. Ainsi, la seconde édition Olivebioteq-2006 sera organisée à Palerme en novembre 2006.

Comme réconfort, l'olivier et ses produits retiennent de plus en plus l'attention des chercheurs. On ne peut que se féliciter de la belle moisson de communications riches et diversifiées réunie dans cet ouvrage de 562 pages. Une telle moisson ne pouvait avoir lieu sans le soutien des différentes organisations et départements nationaux et internationaux et sans la persévérance et le courage des deux instigateurs et fondateurs de ce grand événement en la personne du Dr. S. Roussos et Pr. Ismaili Alaoui My Mustapha auxquels nous voudrions rendre un vibrant hommage. Nos remerciements s'adressent aussi à toutes les organisations internationales et les structures nationales qui ont apporté une contribution inestimable pour que cette manifestation puisse être un succès.

Monsieur Tarik SIJILMASSI
Président Directeur Général
Crédit Agricole, Maroc

Pr. Fouad GUESSOUS
Directeur de l'Institut Agronomique
et Vétérinaire Hassan II, Rabat

Identification of olive (*Olea europaea* L.) genotypes using SSR and RAPD markers

Michele LA MANTIA ¹, Jennifer GUERIN ², Margaret SEDGLEY ²
& Ettore BARONE ¹

¹ Dipartimento di Colture Arboree, University of Palermo, Viale delle Scienze, 11 - 90128 Palermo

² School of Agriculture and Wine, University of Adelaide, PMB1 Glen Osmond, 5064 South Australia

⁰ Corresponding author, e-mail: mlamantia@unipa.it

1. INTRODUCTION

Olive (*Olea europaea* L.) is one of the most ancient cultivated fruit tree species in the Mediterranean basin. It is a predominantly allogamous species showing a high degree of outcrossing which leads to considerable levels of heterozygosity and DNA polymorphism among individuals (Angiolillo *et al.*, 1999; Rallo *et al.*, 2000). The wide genetic patrimony and the large number of synonyms and homonyms in olive require precise methods of discrimination for cultivar identification and classification. Different techniques have been used to evaluate olive diversity. Morphological, agronomical or biochemical characterisation has been adopted for variability evaluation (Barone *et al.*, 1994; Barranco *et al.*, 2000; Ouazzani *et al.*, 1993; Trujillo *et al.*, 1995). The introduction of DNA markers provided a good discriminatory system, independent of environmental conditions. The random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique has been applied in several studies to successfully distinguish between olive cultivars (Belaj *et al.*, 2001; Fabbri *et al.*, 1995; Guerin *et al.*, 2002; Mekuria *et al.*, 1999). Nowadays simple sequence repeat (SSR) have been proven to be very suitable markers for cultivar identification and identity typing in olive as they are transferable, highly polymorphic and co-dominant markers (Carriero *et al.*, 2002; Cipriani *et al.*, 2002; Rallo *et al.*, 2000).

The objectives of this paper are: (1) to identify by SSR and RAPD markers DNA fingerprints of 100 accessions of olive trees; (2) to compare the above-mentioned markers for their ability to discriminate between genotypes; (3) to verify cultivar identities using a database of DNA fingerprints.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Plant material and DNA extraction

All the samples were obtained from the National Olive Variety Assessment (NOVA) collection, located at the University of Adelaide, Roseworthy Campus (South

Australia). Ten presumed Mission olive cultivar samples were obtained from cultivated olives planted around the early Mission sites in the USA.

For the RAPD and SSR analysis, total genomic DNA was isolated from fresh leaf material following the procedure previously described by Guerin *et al.* (2002).

2.2. RAPD analysis

Four random 10-mer primers were used in the study: GC01, GC05, OPZ11 and GC18. RAPD amplifications and NOVA cultivar identification were performed as described by Guerin *et al.* (2002).

2.3. SSR analysis

Nine primer pairs for olive microsatellite loci were used in the analysis; the sequences were obtained from previously published papers: UDO-006, UDO-008, UDO-024, UDO-031 (Cipriani *et al.*, 2002), EMO-2 (De La Rosa *et al.*, 2002), SSR-3, SSR-4, SSR-14 and SSR-16 (Sefc *et al.*, 2000). The forward primers were labelled with fluorescent tags, FAM, NED and HEX. PCR reactions were performed in a total volume of 20 µl containing 40 ng genomic DNA, 1 Buffer PCR, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM of each dNTP, 0.5 M of forward and reverse primers and 1.25 units of Taq Polymerase (Invitrogen), adopting the following profile: initial denaturation at 95°C for 5 min, 34 cycles of 45 s at 95°C, 45 s at the annealing temperature depending on the primer pair (from 50 to 57°C), 45 s at 72°C, followed by a final extension step of 45 min at 72°C. PCR products were first checked on 1.75% agarose gel and then analysed using an automated sequencer (96 capillary ABI Prism 3700 DNA Analyser - Applied Biosystems, USA). The results were scored by Genscan software version 3.5.1 and the presence or absence of alleles was translated to a binary matrix by allocating 1 or 0 for presence or absence of alleles, respectively. A similarity matrix among accessions was calculated using SIMQUAL (Similarity of Qualitative Data), cluster analysis was performed on the estimated similarities using the unweighted pair group method with arithmetic average (UPGMA) and SHAN algorithm, and the resulting clusters were expressed as a dendrogram using NTSYS-pc (Exeter Software v.2.02k).

2.4. Identification of Mission samples

The genetic database established from NOVA DNA fingerprints was used to identify 10 presumed Mission samples. Six of the 9 above-mentioned microsatellite primers were tested: UDO-006, UDO-008, UDO-031, EMO-2, SSR-3 and SSR-16. Dendrogram showing genetic similarities was constructed using UPGMA.

3. RESULTS

3.1. RAPD and SSR

Both molecular markers, RAPD and SSR, proved to be highly effective in discriminating the 100 NOVA cultivars analysed. The four 10-mer RAPD primers, as

reported by Guerin and co-workers (2002), generated 26 polymorphic bands which allowed 58 different genotypes to be distinguished. Fifteen groups, each of them containing cultivars with different names but the same DNA fingerprint (synonyms), were found in the NOVA collection. Eight of these groups have been identified as being genetically similar to known cultivars obtained from international collections, whereas seven groups remain unidentified.

All nine microsatellite markers were polymorphic, revealing a total of 64 alleles, ranging from 4 to 10 alleles per locus with a mean value of 7.1 alleles per locus.

The dendrogram obtained with SSR markers (Figure 1) was similar to that obtained with RAPDs. The following differences were observed: cultivars Pueblana, WA Mission, Paragon and Bouteillon that produced the same fingerprint as Frantoio (Italy) using RAPDs were distinguished with SSRs; however Paragon still had the same genotype as Bouteillon; cultivar Gros Reddeneau that had the same fingerprint as other four accessions using RAPD markers was discriminated with SSRs.

3.2. Mission identification

After comparison of the Mission samples to the database, genetically similar groups were identified and are shown in figure 2: the samples in Group 1 are all similar to each other and to Manzanillo from Cordoba, Spain; the samples in Group 2 were similar to each other and to the Mission sample from UC Davis, USA; the sample from San Louis (Group 3) was similar to Nevadillo Blanco from UC Davis; however, San Diego "AB" and San Francisco Solano 3 did not match any of the other samples.

4. CONCLUSION

Guerin and co-workers (2002) have demonstrated the capacity of 26 polymorphic bands from four RAPD markers to assess the identity of the accessions in the NOVA collection; this result is in accordance with previous studies (Belaj *et al.*, 2001; Mekuria *et al.*, 1999).

However, the co-dominant nature of microsatellite markers permitted the discrimination of a higher number of genotypes, as indicated in other studies (Belaj *et al.*, 2003; Powel *et al.*, 1996). Belaj *et al.* (2003) also found that SSRs discriminated between two cultivars Frantoio and Cellina that had the same fingerprint generated by RAPDs and AFLPs. The group of 11 individuals that had the same DNA fingerprint as cultivar Frantoio was confirmed, using SSRs, the largest group of synonyms in NOVA collection.

The DNA fingerprints collected from NOVA collection have been used for the construction of a genetic database that was used to identify eight out of ten presumed Mission olive cultivars.

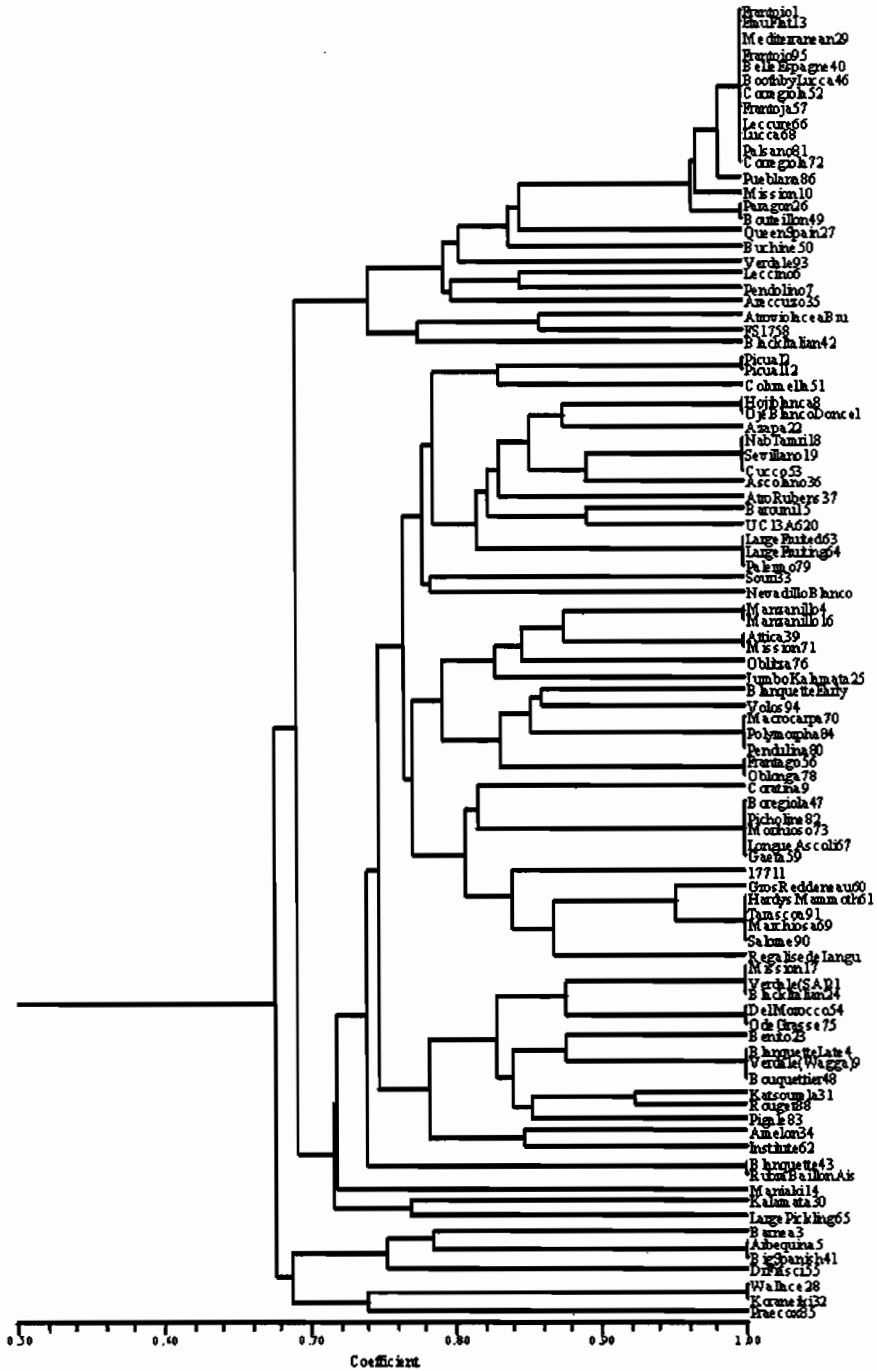


Figure 1. Dendrogram of genetic similarity of 100 NOVA collection accessions using 9 SSRs

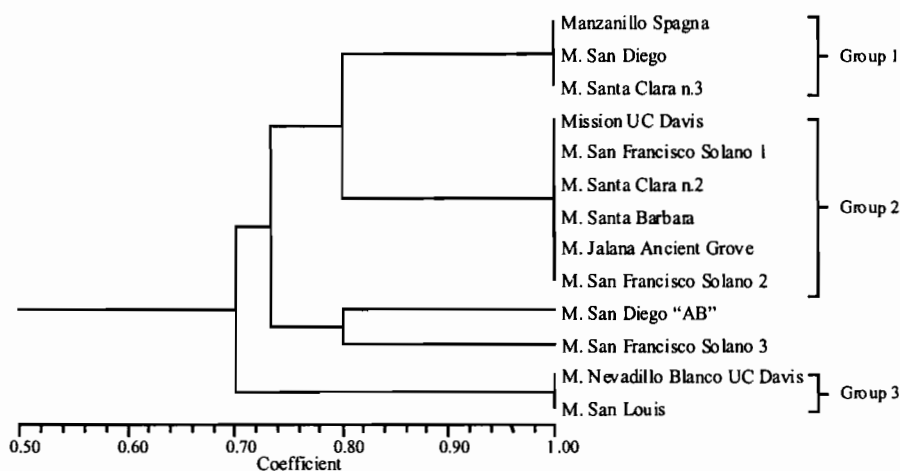


Figure 2. Dendrogram of genetic similarity of ten Mission samples, Manzanillo (Spain), Mission (UC Davis) and Nevaldillo Blanco (UC Davis)

5. ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Susan Sweeney of PIRSA (Primary Industries and Resources South Australia) for access to the NOVA site; Bill Krueger, tree crops Farm Advisor UCCE Glenn County USA, and MOPREP (Mission Olive Preservation, Restoration and Education Project) members for providing Mission samples.

6. REFERENCES

- Angiolillo A, Mencuccini M & Baldoni L (1999) Olive genetic diversity assessed using amplified fragment length polymorphisms. *Theor. Appl. Genet.* 98: 411-421.
- Barone E, Di Marco L, Motisi A & Caruso T (1994) The Sicilian olive germplasm and its characterization by using statistical methods. *Acta Horticulturae* 356: 66-69.
- Barranco D, Cimato A, Fiorino P, Rallo L, Touzani A, Castaneda C, Serafin F & Trujillo I (2000) World catalogue of olive varieties. Consejo Oleicola Internacional, Madrid.
- Belaj A, Trujillo I, Rosa RDL & Rallo L (2001) Polymorphism and discrimination capacity of randomly amplified polymorphic markers in an olive germplasm bank. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 126(1): 64-71.
- Belaj A, Satovic Z, Cipriani G, Baldoni L, Testolin R, Rallo L & Trujillo I (2003) Comparative study of the discriminating capacity of RAPD, AFLP and SSR markers and of their effectiveness in establishing genetic relationships in olive. *Theor. and Appl. Genet.* 107: 736-744.
- Carriero F, Fontanazza G, Cellini F & Giorio G (2002) Identification of simple sequence repeats (SSRs) in olive (*Olea europaea L.*). *Theor. Appl. Genet.* 104: 301-307.

- Cipriani G, Marrazzo MT, Marconi R, Cimato A & Testolin R (2002) Microsatellite markers isolated in olive are suitable for individual fingerprinting and reveal polymorphism within ancient cultivars (*Olea europaea* L.). *Theor. Appl. Genet.* 104: 223-228.
- De La Rosa R, James CM & Tobutt KR (2002). Isolation and characterization of polymorphic microsatellite in olive (*Olea europaea* L.) and their transferability to other genera in the Oleaceae. *Molecular Ecology Notes* 2: 265-267.
- Fabrizi A, Hormaza JI & Polito VS (1995) Random amplified polymorphic DNA analysis of olive (*Olea europaea* L.) cultivars. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 120(3): 538-542.
- Guerin J, Sweeney S, Collins G & Sedgley M (2002) The development of a genetic database to identify olive cultivars. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 127(6): 977-983.
- Mekuria G, Collins G & Sedgley M (1999) Genetic variability between different accessions of some common commercial olive cultivars. *J. Hort. Sci. Biotech.* 74(3): 309-314.
- Ouazzani N, Lumaret R, Villemur P & Giusto FD (1993) Leaf allozyme variation in cultivated and wild olive trees (*Olea europaea* L.). *J. Hered.* 84: 34-42.
- Powell W, Morgante M, Andre C, Hanafey M, Vogel J, Tingey S & Rafalski A (1996) The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Mol. Breed.* 2: 225-238
- Rallo P, Dorado G & Martin A (2000) Development of simple sequence repeats (SSRs) in olive tree (*Olea europaea* L.). *Theor. Appl. Genet.* 101: 984-989.
- Sefc KM, Lopes MS, Mendonça D, Rodrigues Dos Santos M, Laimer Da Câmara Machado M & Da Câmara Machado A (2000) Identification of microsatellite loci in olive (*Olea europaea*) and their characterization in Italian and Iberian olive trees. *Mol. Ecol.* 9: 1171-1173.
- Trujillo I, Rallo L & Arus P (1995) Identifying olive cultivars by isozyme analysis. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 120: 318-324.

Identification of olive (*Olea europaea* L.) genotypes using SSR and RAPD markers

SSR and RAPD markers were used to identify DNA fingerprints of 100 accessions of olive trees (*Olea europaea* L.) from the National Olive Variety Assessment (NOVA) collection, located at the University of Adelaide, Roseworthy Campus (South Australia). The markers were compared for their ability to discriminate between genotypes and their level of polymorphism per marker. The results were similar for both types of markers, and it was shown that several cultivars in the collection had similar genotypes. However, SSRs were more discriminatory as more genotypes were identified with these, than with RAPD markers. The DNA fingerprints collected have been used for the construction of a genetic database that was used to identify eight out of ten presumed Mission olive cultivar samples obtained from cultivated olives planted around the early Mission sites in the USA.

Effets du type d'explant, de l'acide tri-iodobenzoïque et du nitrate d'argent sur le micro bouturage de l'olivier

Dou el Macane WALALI LOUDIYI, Abdelhadi ABOUSALIM & Asma SERHANI

Département d'Horticulture, Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, BP 6202-Instituts, Madinate Al Irfane, 10101 Rabat, Maroc
Auteur correspondant, courriel: l.walali@iav.ac.ma

1. INTRODUCTION

Le choix judicieux du matériel végétal de base détermine en grande partie la réussite de la culture *in vitro* de l'olivier. Par ailleurs, l'inhibition corrélative des bourgeons axillaires par le bourgeon apical est très marquée chez l'olivier. L'acide tri-iodobenzoïque (TIBA) qui bloque le transport basipète des auxines, jugées être à l'origine de l'inhibition, a été utilisé dans cet essai pour stimuler le débourrement des bourgeons axillaires.

Sur un autre plan, et en culture *in vitro*, le stress subit par l'explant isolé de son pied-mère, ou occasionné par une concentration élevée d'auxine dans le milieu de culture, stimule la synthèse d'éthylène. Ceci entraîne un effet dépressif sur la croissance et le développement des explants dans ce milieu confiné. Les effets des inhibiteurs d'action de l'éthylène sur les tissus en culture ont été étudiés en vue de contrecarrer son action ou de séparer les influences respectives des auxines et de l'éthylène (Geneve *et al.*, 1989). Parmi ces inhibiteurs figure l'ion Ag⁺ (Vain *et al.*, 1989).

Les essais menés ont eu pour but d'étudier les effets de la nature de l'explant, du TIBA et de l'AgNO₃ sur le comportement des microboutures *in vitro*.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

Trois types de matériel végétal d'âges différents ont été utilisés en tant que source de prélèvement de microboutures:

- des jeunes plants de deux ans (S1);
- des souquets (S2): protubérances prélevées au niveau du tronc d'olivier et cultivées dans un mélange sable - tourbe v/v; au bout de 20 jours de latence, les souquets émettent des pousses qui sont prélevées pour culture, une fois ayant atteint 5 à 6 cm de longueur;
- des oliviers adultes (S3): des boutures de l'année sont prélevées à différentes positions des arbres, enveloppées dans des sacs humidifiées et amenées au laboratoire.

Les plants de deux ans, les souquets ainsi que les boutures provenant des arbres adultes sont régulièrement traitées avec un fongicide, le cryptonol, à raison de 100 g/l.

Les boutures prélevées sur ce matériel végétal sont effeuillées et subdivisées en sections uni nodales (micro boutures) de 1,5 à 2 cm de longueur. Celles-ci sont trempées dans l'eau courante durant deux heures pour lessiver les contaminants de surface et les produits phénoliques. Leur désinfection a lieu par un trempage dans $HgCl_2$ à 677 mg/l pendant 3 min. en présence de 2 - 3 gouttes d'un émulsifiant, le Tween 20 suivi d'un rinçage 3 fois à l'eau distillée stérile.

La mise en culture se fait sur le milieu de Murashige & Skoog (1962) dilué de moitié et sans hormone pendant une semaine, suivie d'un transfert sur le même milieu additionné de 1 mg/l de zéatine.

Trois concentrations de TIBA: 1, 5, et 10 mg/l ont été testées dans le même milieu décrit précédemment, en comparaison avec un témoin sans TIBA. Les essais ont été conduits sur des microboutures issues de plants de deux ans et de souquets

L'effet de l'ion Ag^+ , sous forme de nitrate d'argent ($AgNO_3$) et à des doses de 0, 1, 5 et 10 mg/l a été testé sur le débourrement et le développement des bourgeons axillaires.

Les principaux critères de mesure retenus sont les suivants:

- nombre de bourgeons ayant débourré;
- nombre de pousses néoformées;
- longueur moyenne de pousses néoformées = somme des longueurs / nombre de pousses développés;
- indice de callogenèse;
- % de débourrement = nombre de bourgeons débourrés / nombre de bourgeons en culture;
- % de pousses néoformées = nombre de bourgeons ayant développé des pousses / nombre de bourgeons en culture;
- % de brunissement = nombre de plants brunis / nombre d'explants en culture.

La comparaison des proportions a été réalisée à l'aide du test ² d'hétérogénéité ou d'indépendance. (Cochran & Cox, 1957)

3. RÉSULTATS ET DISCUSSION

3.1. Potentiel comparé des différentes sources d'explants à développer des bourgeons axillaires

Le tableau 1 présente les résultats du débourrement et de développement ultérieur des bourgeons axillaires.

Tableau 1. Effet de la source d'explants sur le débourrement et le développement ultérieur des bourgeons axillaires

S*	Nec*	NBo*	NBd*	Db*	NPf*	Pf*	LMP*	Ic*	Bru*
S1	10	20	9	45 b	6	30 b	4.2 ± 0.32	-	16.6 ab
S2	18	36	36	100 a	27	75 a	5.6 ± 0.26	-	10 b
S3	20	40	10	25 b	1	2.5 c	3	+	44.4 a
A*				P<0.001*		P<0.001*		P<0.001*	

* S: Source d'explants; Nec: Nombre d'explants en culture; NBo: Nombre de bourgeons observés; NBd: Nombre de bourgeons débourrés; Db: % de débourrement; NPf: Nombre de pousses formées; Pf: % de pousses formées; LMP: Longueur moyenne des pousses (mm); Ic: Indice de callogenèse: - absente; + faible; ++ modérée; +++ élevée; Bru: % de brunissement
*A: ANOVA; les valeurs suivies de la même lettre ne diffèrent pas significativement à 5%.

L'analyse des résultats du tableau 1 montre l'existence de différences très hautement significatives entre les trois sources d'explants quant au taux de débourrement et de formation des pousses et significatives pour le taux de brunissement.

Les explants provenant des jeunes plants et souquets présentent des taux de débourrement proches mais leur taux de prolifération ont différé significativement. Le matériel adulte a montré, par contre, une réactivité beaucoup plus faible et une exudation des produits phénoliques plus élevée.

Des différences sont également notées au niveau de la callogenèse et du développement des pousses formées. Les micro boutures issues de souquets et de plants de 2 ans n'ont pas développé de cals au bout d'un mois et demi de culture. Toutefois après la septième semaine, de petits cals pétiolaires et basales sont apparues (Tableau 2).

Les explants issus des arbres adultes ont montré par contre une callogenèse plus précoce qui a augmenté au cours de la culture. La croissance des pousses néoformées a été plus active chez les explants issus de souquets et des plants de 2 ans. Ces pousses par contre, manifestent une croissance très faible quand elles proviennent des arbres adultes (Tableau 2).

Tableau 2. Évolution de la croissance moyenne des pousses et manifestation de la callogenèse chez les explants issus des 3 sources de plants

Sources*	4S*	4S*	6S*	6S*	8S*	8S*	10S*	10S*
	LM*	Cal*	LM*	Cal*	LM*	Cal*	LM*	Cal*
Souquets	3.5	-	5.6 ± 0.26	-	6.2 ± 0.43	+	10 ± 0.9	+
Plants*	0	+	4.2 ± 0.32	-	5.0 ± 0.50	+	8.0 ± 0.74	++
Arbres*	0	+	3	+	4.4	++	4.8	+++

* Sources d'explants; Plants de 2 ans; Arbres adultes; S: semaines de culture; LM: Longueur moyenne en mm; Cal: Callogenèse: - absente; + faible; ++ modérée; +++ élevée.

Ces résultats illustrent la réactivité élevée des explants issus des souquets qui s'est maintenue durant les 10 semaines de culture. Chez les explants issus de l'arbre adulte, la croissance a été faible et après la 10^{ème} semaine de culture, un brunissement a gagné les jeunes pousses.

L'examen de l'écart type de la distribution de la longueur des pousses a montré que les différences de croissance pour la même source s'accroissent avec le temps. Ceci pourrait être expliqué par la restauration de la dominance entre les deux bourgeons axillaires de l'explant en culture. En effet, souvent le bourgeon axillaire situé à un niveau élevé de la microbouture génère des pousses plus développées. Des constatations similaires ont été observées chez d'autres espèces fruitières (Miller & Drew, 1990).

Les pousses issues de souquets présentent une croissance plus rapide comparativement aux autres sources. Ceci s'explique par le degré de juvénilité élevé des souquets qui génèrent des pousses plus réactives, la capacité morphogénique et organogène diminuant avec l'âge.

Ces variations de réponses liées à la source des explants ont été rapportées aussi chez le châtaignier (Vieitez *et al.*, 1983) et le pommier (Pua & Chong, 1985).

À la 10^{ème} semaine de culture, le développement des cals est faible chez les explants issus de souquets, modéré chez ceux provenant des plants de deux ans et élevé chez le matériel végétal des arbres adultes. Des résultats similaires ont été constatés chez le pistachier (Barghchi & Alderson, 1985) où les micro boutures provenant des arbres adultes présentent des cals à la base et arrivent rarement à développer des pousses.

Ces différences de réactivité entre le matériel juvénile et adulte pourraient être expliquées par les variations des teneurs endogènes en hormones et en inhibiteurs de croissance et aussi par le degré de différenciation des cellules, les tissus les plus âgés demandent plus de temps pour que les cellules qui les constituent se dédifférencient.

3.2. Effet de l'acide 2,3,5- tri-iodobenzoïque (TIBA) sur le débourrement des bourgeons axillaires

Après un mois et demi de mise en culture, les résultats de cet essai ont été reportés sur le tableau 3.

L'analyse des résultats obtenus permet de déceler des différences significatives entre les quatre traitements appliqués aux deux catégories d'explants et pour les taux des pousses néoformées. Pour le taux de débourrement, la différence n'a été significative que dans le cas des plants de deux ans. Globalement, la réponse des deux types d'explants a été optimale à la concentration de 1 mg/l de TIBA. À cette concentration, les résultats diffèrent significativement de ceux des autres traitements dans le cas des plants de deux ans.

Le pourcentage des pousses formées a été également supérieur dans le milieu contenant 1mg/l de TIBA comparativement au témoin. La dose de 10 mg/l a provoqué une diminution significative des taux de débourrement et des pousses formées chez les deux types d'explants.

D'autre part, le TIBA à 1 mg/l a provoqué une croissance relativement plus importante des pousses néoformées, mesurés par leur longueur moyenne. L'apparition de cals pétiolaires a été observée suite à la présence du TIBA, en particulier, aux doses de 5 et 10 mg/l et chez les explants issus des plants de 2 ans. La callogenèse a été par contre absente chez les explants provenant des souquets.

Tableau 3. Effet du TIBA sur le débourrement et le développement des bourgeons axillaires de l'olivier

Source*	CTIBA*	NBo*	NBd*	Db*	NPf*	Pf*	LMP*	Obs*
Plants de 2ans	0	20	10	50 b	11	55 b	3.4±0.21	Petits cals à la base de 2 explants.
	1	20	17	85 a	15	75 a	5.8±0.26	Cals pétiolaires très peu développés
	5	18	12	66.6b	6	33.3b	5.1±0.3	idem
	10	20	12	60 b	6	30 b	3.0±0.18	idem
Souquets	0	36	34	94.4	27	75ab	5.8±0.12	Absence de cals
	1	12	12	100	10	83a	7.4±0.3	Absence de cals
	5	16	12	75	10	62.5ab	5.4±0.36	Absence de cals
	10	16	8	50	8	50b	3.2±0.15	Absence de cals
ANOVA					P<0.001*			

* Source: Source des explants; CTIBA: Concentration du TIBA (mg/l); NBo: Nbre de bgs observés; NBd: Nbre de bgs débourrés Db: % de débourrement; NPf: Nombre de pousses formées; Pf: % de pousses formées; LMP: Longueur moyenne des pousses (mm); Obs: Observations

* Les valeurs suivies de la même lettre ne diffèrent pas significativement à 5%.

L'évolution du comportement des micro boutures a été suivie au cours des subcultures. Les résultats, recueillis après 2 mois et demi de culture, sont résumés dans le tableau 4

À la dose de 1 mg/l, le TIBA a favorisé un allongement important des pousses comparativement aux autres traitements. Le développement du cal basal est prononcé chez les explants cultivés sur le milieu témoin sans TIBA. Sur les milieux contenant 5 et 10 mg/l de TIBA, les pousses néoformées se sont développées très faiblement et ont montré un brunissement qui s'est accentué avec l'augmentation de la dose.

L'allongement des pousses, favorisé par le TIBA à 1 mg/l, pourrait être, en partie, lié à la levée de l'inhibition par l'action de ce produit et par l'absence de cals à la base des explants. En effet, la perte du potentiel de prolifération des pousses en culture *in vitro* a souvent été associée à la production de cals (Clayton *et al.*, 1990). Le TIBA restaure la production des pousses et peut même parfois la stimuler fortement chez certaines espèces quand il est associé au N6-benzyladénine ou le thidiazuron (Nakado, 2000 in Agricell Report 2000).

Tableau 4. Évolution du comportement des micro boutures après 5 subcultures sur un milieu contenant du TIBA à différentes doses

Sources*	Plants de 2 ans	
	TIBA*	Emb*
0	8 ± 1.8	Gros cals à la base des explants. Développement asynchrone des pousses du même nœud.
1	10.2 ± 1.3	Petits cals pétiolaires Développement ± synchronisé des pousses du même nœud.
5	6.1 ± 1.4	Développement faible des pousses; début de brunissement.
10	4.2 ± 0.3	Pas d'évolution de développement des pousses

TIBA*	Souquets	
	LMP*	Emb*
0	9.2 ± 2.5	Cals développés à la base des explants. Développement asynchrone des pousses du même nœud
1	15 ± 2.3	Absence de cals Développement de quelques bourgeons surnuméraires en pousses.
5	7.4 ± 2.1	Faible développement des pousses. Début de brunissement.
10	4.8 ± 1.0	Développement très faible des pousses. Brunissement important des explants

* Sources: Sources d'explants; TIBA: Doses de TIBA (mg/l); LMP: Longueur moyenne de pousses (mm); Emb: Etat des microboutures

Une asynchronisation accentuée de la croissance des pousses latérales de l'olivier a été également observée en absence du TIBA. Celle-ci serait vraisemblablement due à la restauration de la dominance entre les pousses axillaires. Ce phénomène a été rapporté également chez le noyer (Penuela *et al.* 1988).

Les résultats obtenus confirment ceux rapportés par Bartolini *et al.*, 1990 sur le cultivar 'Marino' d'olivier pour qui l'incorporation de 0.5 mg/l du TIBA au milieu de culture, provoque une augmentation du nombre de nœuds formés et favorise l'allongement des pousses.

3.3. Effet du nitrate d'argent sur le débourrement et le développement des bourgeons axillaires

Les résultats obtenus après un mois et demi de culture sont rapportés dans le tableau 5.

L'analyse de ces résultats a révélé des différences significatives entre les concentrations testées pour le pourcentage de débourrement. Les doses croissantes d'AgNO₃ ont ainsi provoqué une réduction significative du taux de débourrement à partir de 5 mg/l d'AgNO₃. Par ailleurs, le pourcentage de bourgeons évoluant en pousses a été nul,

en particulier en présence de 5 et 10 mg/l d'AgNO₃. L'inhibition par l'Ag⁺ de la croissance des bourgeons latéraux d'explants décapités a été rapportée chez d'autres espèces (Yeang & Hillman, 1982). Par contre, l'application d'Ag⁺ à des explants intacts n'a pas produit le même effet. Ceci a permis de conclure que l'éthylène est essentiel au maintien de la croissance des bourgeons libérés de la dominance de l'apex chez de nombreuses espèces (Dewilde, 1971). En revanche, l'ion Ag⁺, exerce un effet phytotoxique sur les tissus végétaux (Peach *et al.*, 1987). Celui-ci pourrait être à l'origine de la répression du débourrement et du développement des bourgeons axillaires.

Tableau 5. Effet du nitrate d'argent sur le débourrement et le développement des bourgeons axillaires

AgNO ₃ *	NBo*	NBd*	Deb*	NPf*	Pf*	LMP*	Observations
0	12	8	66.6 a	5	41.6	44±0.3	Développement normal des pousses. Petits cals à la base
1	16	6	37.5 ab	1	6.26	3.2	Brunissement des explants suivi de leur mort
5	16	4	25 b	0	0	-	Brunissement prononcé et mort des explants
10	20	4	20 b	0	0	-	Mêmes observations

ANOVA

P<0.001**

* AgNO₃ (mg/l); NBo: Nombre de bourgeons observés; NBd: Nombre de bourgeons débourrés; Deb: % de débourrement; NPf: Nombre de pousses formées; Pf: % de pousses formées; LMP: Longueur moyenne de pousses (mm).

** Les valeurs suivies de la même lettre ne diffèrent pas significativement à 5%.

4. CONCLUSION

Autant le type de matériel végétal que les conditions de culture sont déterminants sur l'expression de la croissance et le développement des explants *in vitro*. L'étude des potentialités et de la réactivité des microboutures d'olivier en fonction de leur origine a révélé que les souquets et les plants juvéniles sont beaucoup plus réactifs que le matériel adulte.

De l'étude des facteurs influençant la prolifération des bourgeons axillaires, il ressort que:

- l'acide tri-iodobenzoïque à la dose de 1 mg/l favorise les meilleurs débournements, prolifération et allongement des pousses néoformées comme il empêche le développement des cals à la base des explants.
- Le nitrate d'argent inhibe la croissance des bourgeons axillaires particulièrement à des doses élevées.

5. RÉFÉRENCES CITÉES

Barghchi M. & Alderson P.G. (1985) *In vitro* propagation of *Pistacia vera* L. and the commercial cultivars Ohadi and Kallegochi. *J. of Hort. Sc.* 60 (3): 425-430.

- Bartolini G., Leva A.R. & Benelli A. (1990) Advances in *in vitro* culture of the olive : propagation of cv Maurino. *Acta Hort.* 286: 41- 44
- Clayton P.W., Hubstenberger J.F. & Phillips G.C. (1990) Micropropagation of *Cactaceae subtriba cactinae*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 113 (1): 160- 163.
- Cochran W.G. & Cox G.M. (1957) Experimental Designs, Wiley publication in applied statistics - Second edition 611p
- Delwilde R.C. (1971) Practical application of (2-chloroethyl) phosphonic acid in agricultural production. *Hort. Sci.* 6: 364- 370.
- Geneve R.L., Hackett W. P. & Swanson B. (1989) Root initiation in debladed petioles from juvenile and mature English Ivy in response to inhibitors of ethylene biosynthesis and action. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 115(1): 128- 131.
- Murashige T. & Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15: 473- 497.
- Miller R.M. & Drew R.A. (1990) Effect of explant type on proliferation of *Carica papaya* L. *In vitro Plant cell, tissue and organ culture* 21: 39- 44.
- Nakado M. (2000) TIBA restores regeneration potential in old cell cultures of *Lilium formosanum*. in *Agricell Report* (2000) Vol. 35 (5): 34.
- Peach J.C., Latache A., Puigros N., Torres L., Molinier J., Mouloungui Z., Gazet A. & Delmas M. (1987) Contrôle de la synthèse et des effets de l'éthylène. 2^{ème} colloque sur les régulateurs de croissance et leur utilisation en agriculture. *ANPP Annales* 1(3): 112- 122.
- Penuela R., Garavito C., Sanchez- Tames R. & Rodriguez R. (1988) Multiple shoot- bud stimulation and rhizogenesis induction of embryogenic and juvenile explants of walnut. *Acta Hort.* 227: 457- 459.
- Pua E.C. & Chong C. (1985) Regulation of *in vitro* shoot and root regeneration in Macspur apple by sorbitol (D- glucitol) and related carbon sources. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 110 (5): 705- 709.
- Vain P., Yean H. & Flament P. (1989) Enhancement of production and regeneration of embryogenic type II callus in *Zea mays* L. by AgNO₃. *Plant cell, tissue and organ culture* 18: 143- 151.
- Vieitez A. M. & Ballester A. (1983) *In vitro* plantlet regeneration of mature chestnut. *J. of Hort. Sci.* 58(4): 457- 463.
- Yeang H. Y. & Hillman J. R. (1982) Lateral bud growth in *Phaseolus vulgaris* L. and the levels of ethylene in the bud and adjacent tissue. *J. Exp. Bot.* 33: 111- 117.

Effects of explant types, tri-iodo benzoic acid and silver nitrate on growth and development of olive microcutting

The expansion of *in vitro* olive auxiliary buds and their development to shoots is still difficult. The type of explants reactivity in culture medium and the attenuation of the strong apical dominance of olive shoots are among the factors that control these processes. The comparison of explants taken from sphaeroblasts (adventitious buds which develop masses of miniature shoots), and from two years and mature olive trees ended up of choosing the most reactive type of explants. Comparatively to an untreated check, applying some treatments to the microcuttings in order to attenuate their apical dominance resulted in a beneficial effect on bud expansion and a rapid growth of neoformed shoots.

Keywords: Microcutting - Moroccan Picholine - Olive - Explants sources - Tri-iodobenzoic acid - Silver nitrate

Improving micropropagation and somatic embryogenesis protocols for olive tree (*Olea europaea* L.) cv. 'Moroccan Picholine'

Abdelhadi ABOUSALIM & Dou el Macane WALALI LOUDIYI

Laboratoire de culture *in vitro*, Département d'Horticulture, Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, BP 6202-Instituts, Madinate Al Irfane, 10101 Rabat, Morocco
Corresponding author, e-mail: a.abousalim@iav.ac.ma

1. INTRODUCTION

Olive tree, *Olea europaea* L. is a fruit tree of socio-economical and environmental importance to countries of the mediterranean basin. This species is commercially propagated mainly through rooting semi-hardwood leafy cuttings under mist system. However, there is an incessant need for developing a more efficient mass propagation system to meet increasing demands for performant as well as newly selected clones or varieties, to propagate recalcitrant genotypes, to produce certified and disease-free plants and to extend the very short production season.

For these and other reasons, biotechnological approaches are worth considering. Tissue culture techniques are confirmed powerful tools not only in the field of propagation but also for genetic improvement of many species. Recovery of somaclonal variants and of transgenis plants are examples of the latter potential applications. Successful plant regeneration systems via organogenesis and somatic embryogenesis have been developed for many species including fruit and forest tree species, but little progress has been made in the case of olive tree.

A survey of the published data related to micropropagation and somatic embryogenesis of *Olea europaea* L. shows that successful protocols are still limited and advances made concern only certain cultivars and predominantly juvenile plant material (Cañas *et al.*, 1992; Cimato, 1999; Leva *et al.*, 2004; Rugini & Lavee, 1992). Field evaluation of micropropagated olive is recent and the obtained results are more than promising. The protocol recently developed showed that growth and yield of *in vitro* propagated plants are similar to those of plants obtained through conventional rooting of cuttings and no genetical modifications were observed (Leva *et al.*, 2004). The authors suggested the developed protocol can be used at commercial level.

Our team has conducted diverse investigations on 'Moroccan Picholine', the quasi dominant cultivar in Morocco appreciated both for oil and table olive production; Morocco being among the leading exporting countries of table olive. When compared with other mediterranean cultivars, 'Moroccan Picholine, can be considered as medium to root (Abousalim & Mansouri, 1991; Abousalim *et al.*, 1993).

Previous studies successfully achieved micropropagation of juvenile plant material. Explants taken directly from the recalcitrant bearing olive tree were, however, difficult to establish, to propagate and to root *in vitro* (Walali, 1989; Walali & Abousalim, 1993). To our knowledge, no other publication is available on successful micropropagation system developed for this cultivar from mature plant material. In the present paper, subsequent improvements in micropropagation and somatic embryogenesis of 'Moroccan Picholine' made by our team is presented.

2. MICROPROPAGATION

Several factors have been investigated with a view to improve the micropropagation system using microcutting explants from mature plant material. These factors included the physical status of the culture medium and control of apical dominance during the establishment stage, composition of the basal medium, the type and concentration of cytokinin at the proliferation stage, and the type of explant used, the composition of the culture medium and, the type and concentration of auxin at the rooting stage.

2.1. Improving the establishment and the reactivity of mature explants

The physical status of the culture medium was found to be critical. The conventional medium solidified with agar was compared with liquid and double phase systems (Walali *et al.*, 2006a). Using liquid medium during the early stages of micropropagation but only for a short period of time to prevent vitrification, is recommended. It has the advantage of washing out inhibiting substances including phenolics which proved to be detrimental to the *in vitro* establishment of explants of mature origine. This system also significantly improved sprouting of axillary buds, speeded up their development and increased shoot length.

Subsequent frequent subculturing, of five days interval, was also of benefit to the establishment of mature plant material. In addition, this practice resulted in rejuvenation of explants taken from two-year-old plants which have seen their growth improved and became similar to that of the juvenile sphaeroblast material.

Ways to prevent or reduce the strong apical dominance inhibiting sprouting of olive axillary buds were also investigated. A reduction of this phenomenon was achieved when 1 mg/l of TIBA (tri-iodobenzoic acid) was added to the culture medium. This resulted in better bud development and shoot elongation. Noticeably, this product prevented callus development at the basis of microcuttings grown *in vitro* (Walali *et al.*, 2006b).

2.2. Improving shoot proliferation

Several basal media were compared and their effect on proliferation of mature plant material was studied with a view to replace MS (Murashige & Skoog, 1962) medium previously found not suitable (Brhadda *et al.*, 2003a). These included 1/2 MS, WPM (Lloyd & McCown, 1981), 1/2 Miller (1967), K&H (macronutrients of Knop (1965, *In*: George & Sherrington (1984) plus micronutrients of Heller (1953)) and OM (Rugini, 1984).

The obtained results showed that OM and Ω MS were the most effective in the early stages, but later OM permitted better shoot growth with no vitrification. Also, shoot elongation was best with OM, followed by 1/2 MS. Important callus production, leaf chlorosis and reduced shoot growth were characteristics of the other tested media. These results would indicate specific nutritional requirements of 'Moroccan Picholine' as other formulation proved to be more appropriate in the case of other cultivars.

Zeatine is commonly the most used and appropriate cytokinin in olive micropropagation. Other cytokinins have been tested in order to search for alternatives to this very expensive product. BA, 2ip, Kinetine and Zeatine were compared at different concentrations. We fortunately found that 2iP at 5 mg/l can be used in the case of mature 'Moroccan Picholine' with no significant differences with Zeatine.

2.3. Improving in vitro rooting

A break through has been made with regard to rooting mature plant material obtained from 30-year-old selected trees (Figure 1).

The protocol developed is based first, on rejuvenating the plant material and second, on using the appropriate basal medium and type and concentration of auxin. The novel medium we called OM-BAW is the result of modifications brought to the OM medium previously developed for olive by Rugini (1984).

Details of the procedure which permitted to obtain 92% *in vitro* rooting and 80 % survival following their establishment under soil conditions are presented in a separate publication (Abousalim *et al.*, 2006a). The obtained results are approaching those of juvenile explants (100%).

3. SOMATIC EMBRYOGENESIS

For the first time, plants of the cultivar 'Moroccan Picholine' and other genotypes have successfully been regenerated via somatic embryogenesis and established in soil (Figure 2).

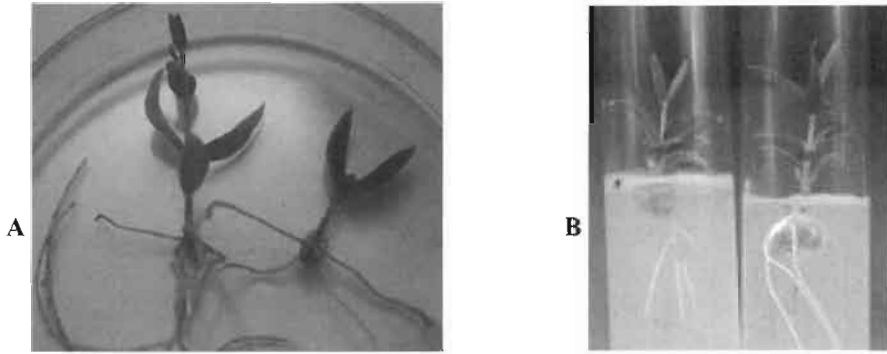


Figure 1. Examples of rooting systems developed for juvenile (A) and adult (B) 'Moroccan Picholine' cultivar

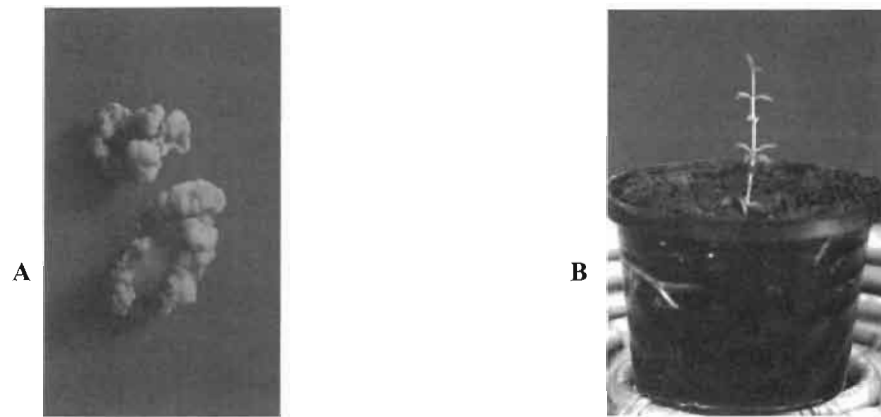


Figure 2. Regeneration of 'Moroccan Picholine' plants via somatic embryogenesis. Embryogenic callus induction stage (A) and established plantlets in soil (B)

In a first step, several factors have been investigated in order to stimulate the induction and the development of somatic embryos from olive. Other parameters have been considered, in a second step, to improve the developed protocol. These included explant type, genotype, culture medium, physical status of the medium, auxin type and concentration, sugar type and concentration and light.

The protocol developed for 'Moroccan Picholine' permitted 40% regeneration of plantlets via somatic embryogenesis and 94% survival following acclimatization (Brhadda *et al.*, 2003b). Somatic embryos have been induced from cotyledon explants excised from mature seeds cultured on medium supplemented with 2 mg/l NAA

(α -naphthaleneacetic acid). Proximal parts of the cotyledon showed better results than distal ones. Among several basal media tested (MS, OMc, BN, HS), MS (1962) proved to be the best for callus induction and somatic embryo development and no morphogenesis was observed when OMc was used. Light during the induction stage was inhibitory to somatic embryogenesis.

The type of sugar included in the medium was also varied and significant differences were observed. Although mannitol was good for somatic embryo induction, sucrose was better during the development stage and resulted in 37% plantlet regeneration. The best results were obtained with 30 g/l when compared with the other concentrations tested. No regeneration was observed with sorbitol. Details of these experiments are presented ahead in this document (Abousalim *et al.*, 2006b). The results concerning the effects of other factors on somatic embryogenesis are being published elsewhere.

It is to be mentioned that *in vitro* germination of zygotic embryos has also been investigated and the effect of temperature pre-treatment on dormancy and germination studied (Brhadha *et al.*, 2000).

Investigations on micropropagation and somatic embryogenesis are continuing with the aim to further improve the previously developed protocols and to render these techniques economically applicable to propagation and genetic improvement of this important species.

4. REFERENCES CITED

- Abousalim A. & Mansouri L. (1991) Utilisation des tablettes chauffantes en bouturage semi-ligneux de cultivars d'olivier en automne. *Actes Inst. Agron. Vet. (Maroc)* 11(3):17-22.
- Abousalim A., Walali L.D. & Slaoui K. (1993) The effect of the phenological stage on rooting of semi-hardwood cuttings of olive using bottom-heated propagators. Effet du stade phénologique sur l'enracinement des boutures semi-ligneuses de l'olivier en tablettes chauffantes. *Olivae* 46: 30-37.
- Abousalim A. Brhadha N., Walali Loudiyi D.M. & Benali D. (2006a) Enracinement *in vitro* et production de vitroplants d'olivier (*Olea europaea* L.) à partir d'arbres adultes. *Cf.* pp. 45-52.
- Abousalim A., Walali Loudiyi D.M. & Brhadha N. (2006b) Effets du type et de la concentration de sucres sur l'induction et le développement des embryons somatiques chez l'olivier cv. Picholine marocaine. *Cf.* pp. 39-44.
- Brhadha N., Walali Loudiyi D.M., Abousalim A. & Benali D. (2000) Effet de la température et de l'endosperme sur la dormance et la germination des embryons d'olivier *Olea europaea* L. variété Picholine marocaine. *Agronomie* 20: 643-653.
- Brhadha N., Abousalim A., Walali Loudiyi D.M. & Benali D. (2003a) Effets du milieu de culture sur le microbouturage de l'olivier (*Olea europaea* L.) cv. Picholine marocaine. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 7(3-4): 177-182.

- Brhadda N., Abousalim A. & Walali Loudiyi D.M. (2003b) Effets du milieu de culture et de la lumière sur l'embryogenèse somatique de l'olivier (*Olea europaea* L.) cv. Picholine marocaine. *Fruits* 58(3): 167-174.
- Cañas L.A., Avila J., Vicente M. & Benbadis A. (1992) Micropropagation of olive (*Olea europaea* L.). In: Bajaj Y.P.S. (ed). *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol.18, pp. 493-505, Springer-Verlag, Berlin Helderberg.
- Cimato A. (1999) L'élevage des plants d'olivier en pépinière. In: Cimato A. (ed). *Propagation et certification des plants. Séminaire International sur les Innovations scientifiques et leur application en oléiculture et oléotechnie*. Florence, 10-12 mars 1999. COI. pp. 1-29.
- George, E. F. & Sherrington, P. D. (1984) *Plant propagation by tissue culture. Handbook and directory of commercial laboratories*. Excegetics Ltd.
- Heller, R. (1953) Recherches sur la nutrition minérale des tissus cultivés in vitro. *Ann. Sci. Nat. Biol. Vég.* 14: 1-223.
- Leva A.R., Petruccelli, R. & Polsinelli L. (2004) La multiplication végétative *in vitro* de l'olivier: du laboratoire à la production. *Olivae* 101: 18-26.
- Lloyd, D. G. & Mc Cowi., B. H. (1981) A mineral nutrient formulation for microculture of woody plant species. *Hort. Sci.* 16 (3): 453.
- Miller, M. O. (1967) Cytokinins in *Zea mays*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 144: 250-257.
- Murashige, T. & Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15: 473-492.
- Rugini, E., 1984. *In vitro* propagation of some olive (*Olea europaea* L.) cultivars with different root-ability, and medium development using analytical data from developing shoot and embryo. *Scientia Horticulturae* 24: 123-134.
- Rugini E. & Lavee, S. (1992) Olive. In: Hammerslag FA. & Litz R.E. (eds), *Biotechnology of perennial fruit crops*, pp. 371-382, CAB International.
- Walali Loudiyi D.M. (1989) Chemical and physical factors influencing *in vitro* propagation of moroccan Picholine olive (*Olea europaea* L.). Ph.D. Thesis, Institut Agronomique et vétérinaire Hassan II, Rabat.
- Walali Loudiyi D.M. & Abousalim A. (1993) Olive tree propagation. In: Tantaoui - El Araki A. (ed.). *Proceedings of the first CNCPRST-CSIS seminar on oleaginous plants*. October 19-21. pp. 63-67, Rabat, Morocco.

Walali Loudiyi D.M., Abousalim A. & Serhani A. (2006a) Effets de l'état physique du milieu et des subcultures sur les paramètres de croissance *in vitro* des microboutures de la Picholine marocaine. *Cf.* pp. 31-38

Walali Loudiyi D.M., Abousalim A. & Serhani A. (2006b) Effets du type d'explant, de l'acide tri-iodobenzoïque et du nitrate d'argent sur le microbouturage de l'olivier. *Cf.* pp. 15-22

Improving micropropagation and somatic embryogenesis protocols for olive tree (*Olea europaea* L.) cv. 'Moroccan Picholine'

Protocols for micropropagation and regeneration of olive plants via somatic embryogenesis have been developed using, respectively, mature and juvenile plant material of the cultivar 'Moroccan Picholine'. In the first case, vitroplants have successfully been micropropagated using explants initially originating from 30-year-old trees. Several factors are found to improve the proliferation of microcuttings and these included the mineral composition of the culture medium and the type and concentration of cytokinin. High root induction was possible only after modification of the type of explant used, the composition of the culture medium and, the type and concentration of auxin. *In vitro* rooting reached 92% and survival following acclimatization reached 80%. Vitroplants were also successfully regenerated via somatic embryogenesis. Callus induction and somatic embryo development were dependent on genotype, mineral composition of the culture medium, type and concentration of sugar and auxins. Up to 40 % plants were regenerated and 94% survived soil establishment. A synthesis of the main studied parameters and obtained results is presented in this paper. The achievement made related to *in vitro* rooting of olive using adult plant material is promising and would permit mass propagation of 'Moroccan Picholine' and possibly other selected elite clones and varieties or newly created genotypes. Regeneration of plants via somatic embryogenesis is also of interest not only in the field of propagation but also for genetic improvement of olive such as in the case of regeneration of transgenic plants and in the case of *in vitro* selection studies.

Keywords: Micropropagation - Olive - *Olea europaea* - Moroccan Picholine - Somatic embryogenesis.

Amélioration des procédés de microbouturage et d'embryogenèse somatique de l'olivier (*Olea europaea* L.) cv. Picholine marocaine

Des procédés de microbouturage et d'embryogenèse somatique de l'olivier ont été développés, respectivement à partir de matériel adulte et de matériel juvénile du cultivar 'Picholine marocaine'. Le protocole de microbouturage mis au point a permis la production de vitroplants d'olivier à partir d'arbres âgés de 30 ans. La prolifération a été améliorée par divers facteurs, notamment la composition minérale du milieu de culture, le type et la concentration de cytokinine. L'induction racinaire obtenue n'a été possible qu'après modification du type d'explant utilisé, de la composition du milieu de culture et, du type et de la concentration d'auxine. L'enracinement *in vitro* a atteint 92% et l'acclimatation 80%. Des vitroplants ont également été régénérés par embryogenèse somatique. L'induction de cals embryogènes et le développement d'embryons somatiques ont varié selon le génotype, la composition minérale du milieu de culture, le type et la concentration de sucres et le type et la concentration d'auxine. Le taux de régénération atteint a été de 40% et la survie après acclimatation a été de 94%. Une synthèse des principaux facteurs étudiés et des résultats obtenus est présentée dans le présent article. L'enracinement *in vitro* de l'olivier à partir de matériel adulte ouvre de nouvelles perspectives pour une production en masse de plants de la 'Picholine marocaine', de clones ou de variétés sélectionnées et de génotypes nouvellement obtenus. La production de plants par embryogenèse somatique est d'intérêt non seulement pour la micropropagation, mais aussi dans le domaine d'amélioration génétique, notamment pour la régénération de plantes transgéniques et pour les travaux de sélection *in vitro*.

Mots clés: Olive - *Olea europaea* L. - Microbouturage - Embryogenèse somatique - Micropropagation - Picholine marocaine

N.B. Ce travail a été réalisé au Laboratoire de culture *in vitro*, Département d'Horticulture, Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Rabat.

Effets de l'état physique du milieu et des subcultures sur les paramètres de croissance *in vitro* des microboutures de la Picholine marocaine

Dou el Macane WALALI LOUDIYI, Abdelhadi ABOUSALIM & Asma SERHANI

Département d'Horticulture, Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, BP 6202-Instituts, Madinate Al Irfane, 10101 Rabat, Maroc
Auteur correspondant; e-mail: l.walali@iav.ac.ma

1. INTRODUCTION

Chez plusieurs espèces végétales, l'utilisation d'un milieu liquide au lieu du milieu gélosé, confère à l'explant une croissance plus rapide et un taux de multiplication élevé des pousses. Parfois un milieu en double phase ou en immersion temporaire (Damiano 1999), améliore ces paramètres. Certains travaux récents accusent les milieux à base d'agar solidifié d'être toxiques pour plusieurs espèces. L'agar, bien que largement utilisé, est asphyxiant à certaines concentrations. Il en résulte pour les explants qui ont l'agar comme support de culture, un développement d'un système racinaire peu ramifié, à racines secondaires très courtes, peu denses. Les plantules développées sur ces milieux présenteraient une activité photosynthétique faible comparativement à celles établies sur un milieu plus aéré comme la vermiculite ou la florialite (mélange de vermiculite et de fibre cellulosique) (Afreen- Zobayed in Agricell Report, 2000).

À la lumière de ces données, on a comparé trois états de milieu sur le débourrement et la prolifération de bourgeons axillaires d'olivier.

Aussi, la durée de séjour de la microbouture sur le milieu de culture influe grandement sur ses performances. En effet, la microbouture et le milieu où elle se trouve sont en continuelle interaction et si elle y puise des éléments nécessaires à sa croissance, elle y libère des métabolites qui peuvent s'avérer toxiques et influencer sur son développement.

Dans ce second essai, le comportement des microboutures d'olivier sur le même milieu a été comparé suite à des intervalles de transferts de durée variables.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. Effets de l'état physique du milieu

L'essai a porté sur des explants issus de souquets et de plants de deux ans de la Picholine marocaine, principal cultivar développé au Maroc.

Les trois états de milieu comparés sont les suivants:

- un milieu liquide où les microboutures sont supportées par un pont en papier filtre dont les extrémités inférieures trempent dans le milieu;
- un milieu gélosé à une concentration de 8 g/l d'agar;
- un milieu en double phase consistant à ajouter au milieu solide de base 1 ml du même milieu liquide stérile.

2.2. Effets de l'intervalle de transfert

Les microboutures utilisées dans cet essai sont issues de plants de 2 ans et de souquets de la Picholine marocaine. Les intervalles de transfert testés sont de 5 et 15 jours sur une durée de 45 jours.

3. RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

3.1. Effets de l'état physique du milieu

Les résultats présentés dans la figure 1 montrent que:

- Chez les explants issus des plants de 2 ans, seul le milieu liquide présente des différences significatives vis-à-vis du débourrement des bourgeons axillaires avec un taux de 81.3% contre 45% sur le milieu solide gélosé et 42.85% sur celui en double phase.
- Chez les microboutures prélevées sur les souquets, les taux de débourrement enregistrés sur les 3 types de milieux sont voisins et respectivement supérieurs à ceux qui proviennent des plants de 2 ans (Figure 1).
- La différence entre la constitution physique des 3 milieux n'a pas eu d'effet significatif sur le taux de pousses formées chez les explants issus de plants de 2 ans. Cependant, dans le cas des souquets, une légère amélioration en faveur de l'état liquide est notée (80% contre 77.75% sur le milieu solide et 62.5% sur celui en double phase) (Figure 2).
- L'élongation des pousses a été, en général, plus importante sur le milieu liquide que sur les deux autres.
- Au cours de la culture, la vitrification a été plus accentuée chez les explants multipliés sur le milieu liquide (Figure 3). Le transfert de ces explants sur un milieu solide sans hormones a permis à 70% d'entre eux de retrouver un état normal.
- Le brunissement des explants a été en général faible dans le cas des deux milieux solides et en double phase et nul dans le cas du milieu liquide (Figure 4). Le milieu liquide a favorisé le lessivage des produits phénoliques ce qui a permis d'éviter le brunissement des explants.

À l'issue de cet essai, il se révèle que le milieu liquide stimule le débourrement, en plus les éléments nutritifs sont plus facilement absorbés que dans le cas d'un milieu solidifié par l'agar et l'aération est facilitée. L'accumulation d'inhibiteurs de croissance au niveau de l'agar a aussi été avancée comme cause du faible taux de débourrement enregistré sur le milieu solide (Pâques & Boxus, 1987a).

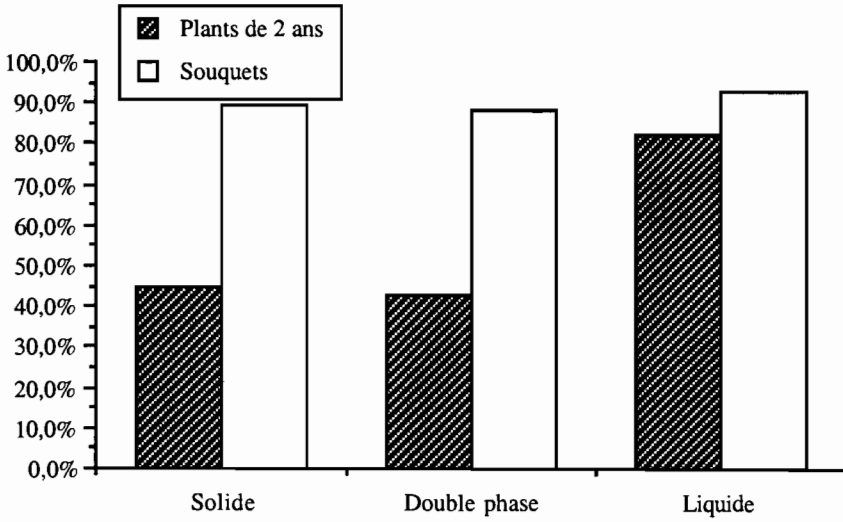


Figure 1. Effet de l'état du milieu sur le pourcentage de débourrement

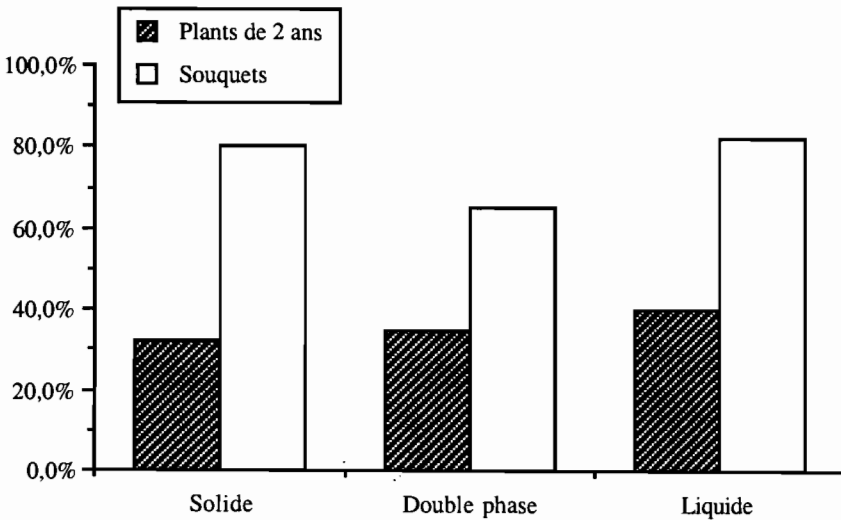


Figure 2. Effet de l'état du milieu sur le pourcentage de pousses formées

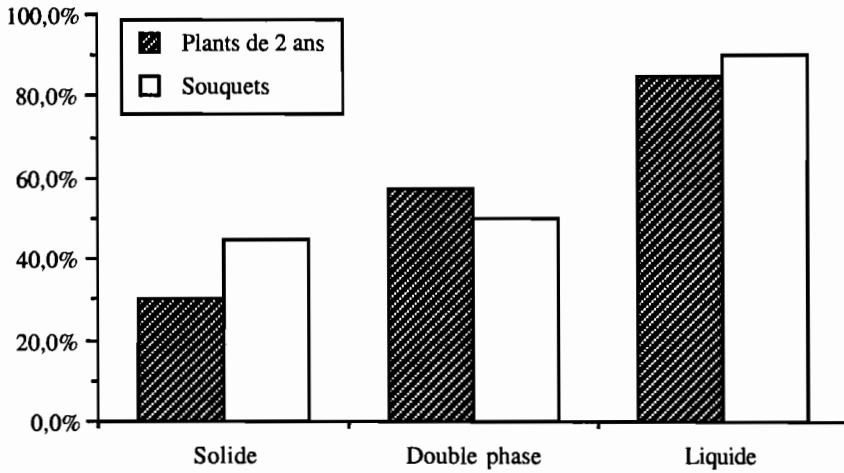


Figure 3. Effet de l'état du milieu sur le pourcentage de vitrification

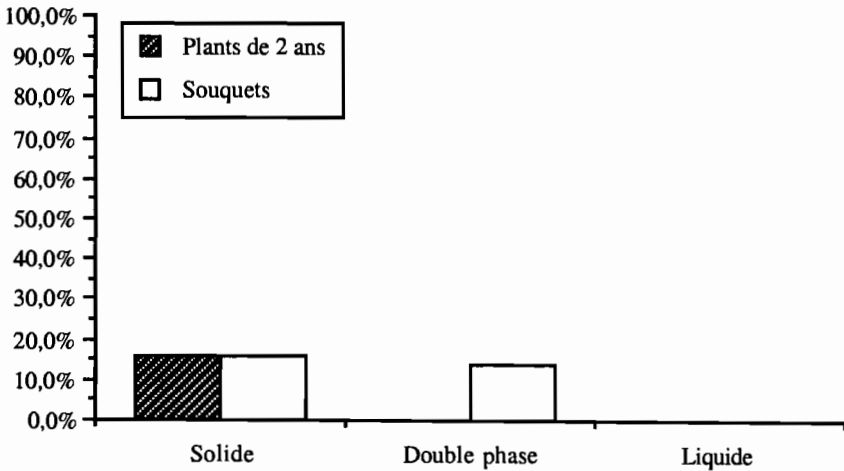


Figure 4. Effet de l'état du milieu sur le pourcentage de brunissement

La réponse des explants d'olivier à la culture sur un milieu liquide confirme les résultats obtenus sur d'autres espèces. Ainsi, chez *Pinus caribaea*, le taux d'accroissement de la longueur des pousses est passé de 32.2% en milieu solide à 46% en milieu liquide (Skidmore *et al.*, 1988). Chez des explants de bananier, le taux de prolifération a augmenté de 37.5% quand le milieu solide a été remplacé par un milieu liquide (Morel, 1989). De même, des essais qui ont porté sur la comparaison de 5 supports de culture pour des plantules de patate douce ont montré que la croissance la plus faible est observée sur le milieu gélosé. Sur un tel milieu, les explants présentent une faible densité de racines secondaires et une activité photosynthétique faible. Leur taux de reprise à l'acclimatation est de 79% alors que sur le milieu le plus performant, mélange de vermiculite et de fibre cellulosique, le taux de reprise a été de 97% (Afreen- Zobayed, in Agricell Report, 2000).

Le milieu en double phase a permis une amélioration, bien que non significative, du taux de prolifération des bourgeons chez les explants issus des plants de 2 ans. Des données similaires ont été rapportés avec des microboutures de châtaignier (Chauvin & Salesses, 1988) et de noisetier (Diaz-Sala *et al.*, 1990). Chez ces espèces, le nombre de pousses par explants et la longueur de celles-ci ont manifestement augmenté une fois qu'ils ont été transférés sur un milieu en double phase.

Le milieu liquide est celui qui a induit le taux de vitrification le plus élevé. De nombreux rapports confirment cette donnée. Ainsi, chez l'artichaut, le taux de vitrification des pousses en culture est passé de 0% en milieu gélosé à 60 – 90% en milieu liquide (Loreti & Pasqualetto, 1986). Chez le pommier, ce taux a également augmenté de 0 à 100%, une fois que les plantules aient été transférées du milieu solide au milieu liquide (Standardi & Micheli, 1988).

Comparativement au milieu solide, le milieu en double phase entraîne aussi une vitrification plus importante des pousses (Pâques & Boxus, 1987b). Ce désordre physiologique, étant essentiellement dû aux teneurs élevées de nitrate et de cytokinines, l'agar semble agir à travers la diminution du potentiel hydrique limitant ainsi la disponibilité et l'absorption de ces composés par l'explant (Pâques & Boxus, 1984). De ce fait, le retour à l'état normal a pu être obtenu par le transfert des microboutures sur un milieu solide dépourvu de régulateurs de croissance.

3.2. Effets de l'intervalle de transfert

Les observations faites au bout d'un mois et demi de culture sont reportées sur le tableau 1. L'analyse de ces données a révélé que seul le taux de débourrement a engendré des différences significatives entre les deux intervalles de transfert et ceci chez les explants issus des plants de 2 ans.

Ces transferts rapides ont en effet permis un accroissement du taux de débourrement de 50%. Les autres réponses ont été statistiquement similaires. Toutefois, les taux de brunissement et de vitrification ont été sensiblement réduits quand l'intervalle de transfert a été de 5 jours. Le taux de pousses formées a connu aussi dans ce cas une

amélioration chez les microboutures issues de plants de 2 ans. Ce taux est passé de 30% dans le cas de l'intervalle de 15 jours à 50% pour l'intervalle de 5 jours.

Tableau 1. Effet de l'intervalle de transfert sur le comportement de microboutures d'olivier

	Source d'explants			
	Plants de 2 ans		Souquets	
	Intervalle de transferts		Intervalle de transferts	
	5 jours	15 jours	5 jours	15 jours
NBo*	20	20	18	18
Db* (%)	90 a	45 b	94.4 a	88.9 a
Pf* (%)	50	30	72.2	77.75
Br* (%)	9 a	16.6 a	0 b	18.1 a
Vit* (%)	20	30	22.2	44.4
LMP*	5.6 ± 0.7	4.3 ± 0.5	5.8 ± 0.6	5.2 ± 0.7
ANOVA	P<0.001*			

* NBo: Nombre de bourgeons observés, Db: Débourrement; Pf: Pousses formées; Br: Brunissement; Vit: Vitrification; LMP: Longueur moyenne des pousses

* Les valeurs suivies de la même lettre ne diffèrent pas significativement à 5%.

En revanche, l'écart entre la réactivité des deux sources d'explants s'est manifestement atténué avec les intervalles de transferts courts. En effet, la différence des taux de débourrement entre les deux sources d'explants qui a été de 43.9% dans le cas des intervalles de 15 jours a été réduit à 4.4% dans le cas des transferts rapides (5 jours). De même, la différence entre les taux de pousses formées qui a été de 47.75% (intervalle de 15 jours) a diminué à 22.2% dans le cas de transfert rapide (5 jours).

En conséquence, la croissance des microboutures a été inhibée par un séjour prolongé dans le même milieu de culture (intervalle de transfert de 15 jours). L'origine de cette inhibition pourrait être due à la sécrétion par l'explant de métabolites toxiques, comme des composés phénoliques, dans le milieu de cultures. L'accumulation dans ce milieu confiné de substances telles que l'éthylène peut aussi contribuer à cette inhibition.

Ainsi, chez le figuier, Murrithi *et al.* (1982) ont rapporté que des transferts rapides à des intervalles de 1 à 2 jours activent la prolifération des pousses. Chez le noyer, la lenteur ou l'arrêt de croissance, la chlorose et l'abscission des feuilles peuvent être corrigés par des transferts rapides des explants sur des milieux frais (Granaham & Leslie, 1988). Le % de brunissement a été réduit de façon significative par des transferts rapides dans le cas des microboutures issues de souquets. Des données analogues ont été rapportées sur le pistachier (Alderson & Barghchi, 1982) et sur l'eucalyptus (Das & Mirta, 1990).

En conclusion, le milieu liquide, support des microboutures, a favorisé un débourrement important des bourgeons axillaires et initié plus de pousses que ce qui a été observé avec le milieu solide et en double phase. La dilution et/ou le lessivage des substances phénoliques et des inhibiteurs de croissance en milieu liquide pourraient expliquer ces résultats. En revanche, l'incidence de la vitrification a été plus élevée en milieu liquide et a affecté aussi bien la croissance que la qualité des pousses néoformées.

Les transferts rapides des explants sur un milieu frais stimulent le débourrement et le développement des pousses axillaires, diminuent le brunissement et la vitrification (Tableau 2). Néanmoins cette pratique exige une quantité de manipulation plus importante et occasionne plus de pertes de produits à cause du renouvellement plus fréquent du milieu de culture.

Tableau 2. Effet de l'état physique du milieu sur le débourrement et le développement des bourgeons axillaires de l'olivier après 45 jours de mise en culture

	Source d'explants					
Plants de 2 ans.....		Souquets.....		
	Solide	Double Phase	Liquide	Solide	Double phase	Liquide
NBo*	20	28	32	18	16	20
Db* (%)	45 b	42.85 b	81.3 a	88.9	87.5	90
Pf* (%)	30 a	32.14 a	37.5 a	77.75	62.5	80
LMP* (mm)	4.3 ± 0.5	5.2 ± 0.5	5.8 ± 0.7	5.2 ± 0.7	5.6 ± 0.9	6.7 ± 0.9
Vit* (%)	30 b	57.14 b	87.5 a	44.4	50	90
Bru* (%)	16.6	0	0	18.1	11	0

* NBo: Nombre de bourgeons observés, Db: Débourrement; Pf: Pousses formées; Br: Brunissement; Vit: Vitrification; LMP: Longueur moyenne des pousses

* Les valeurs suivies de la même lettre ne diffèrent pas significativement à 5%.

4. RÉFÉRENCES CITÉES

- Afreen- Zobayed F. (2000) Effects of supporting materials on *in vitro* growth and development in Agricell Report Vol. 34 (4):28.
- Alderson P.G. & Barghchi M. (1982) The potential of *Pistacia* propagation through shoot leaf and callus culture in Fujiwara A. (ed.) Proc. 5th. Intl. Cong. Plant tissue and cell culture. Ed. Akis Tokyo:730-740.
- Chauvin J.E. & Salesses G. (1988) Advances in chestnut micropropagation (*Castanea sp.*). *Acta Hort.* 227: 340- 345.
- Damiano L. (1999) Temporary immersion micropropagation of wild pear in Agricell Report 1999- Vol. 33 (4): 29.
- Das T. & Mirta G.C. (1990) Micropropagation of *Eucalyptus tereticornis* Smith. *Plant Cell Tissue and Organ culture* 3:95- 103.
- Diaz- Sala C., Rey M. & Rodriguez R. (1990) *in vitro* establishment of a cyclonal chain from nodal segments and apical buds of adult hazel (*Corylus avellana* L.). *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 23: 151- 157.
- Granaham G. Mc. & Leslie C. A. (1988) *In vitro* propagation of mature Persian walnut cultivars. *Hortscience* 23 (1): 220.
- Loreti F. & Pasqualetto P. L. (1986) Vitrification of plants cultured *in vitro*. *Proc. Plant Prop. Soc.* 36: 66- 71.
- Morel G. (1989) Contribution à la multiplication clonale *in vitro* du bananier. Mémoire de fin d'études. Complexe Horticole d'Agadir. 30- 50.

- Murrithi L.M., Rangan T.S. & Waite B.H. (1982) *In vitro* propagation of fig through shoot tip culture. *Hortscience* 17:86- 87.
- Pâques M. & Boxus P. (1984) Comparative study of vitreous and non vitreous plantlets of apple root stock M 26 cultivated *in vitro*. Absts. Book. 4th compress Feder. Europ. Soc. Plant Physiol., Stasbourg, pp. 282- 283
- Paques M. & Boxus P. (1987a) Vitrification: review of literature. *Acta Hort.* 212: 155- 166
- Pâques M. & Boxus P. (1987b) A model to learn 'vitrification', the root stock apple M 26, present results. *Acta Hort.* 212: 193- 210.
- Skidmore D.I., Simons A.J. & Bedi S. (1988) *In vitro* culture of shoots of *Pinus caribala* on a liquid medium. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 14: 129- 136.
- Standardi A. & Micheli M. (1988) Control of vitrification in proliferating shoots of M 26. *Acta Hort.* 227: 425- 427.

Effets de l'état physique du milieu et des subcultures sur les paramètres de croissance *in vitro* des microboutures de la Picholine marocaine

Trois états physiques de milieu de culture et leurs effets sur le débournement des bourgeons et la prolifération des pousses de la Picholine marocaine ont été comparés. Les explants utilisés sont issus de jeunes plants d'olivier et de souquets provenant d'arbres adultes. L'utilisation du milieu liquide a permis un lessivage des substances phénoliques et a favorisé un débournement important et précoce des bourgeons axillaires, l'effet étant significatif. Le développement de nouvelles pousses et leur élévation ont aussi été influencés par l'état physique du milieu de culture. L'utilisation prolongée du milieu liquide a, cependant, occasionné un développement important de la vitrification (87.5-90%) en comparaison avec le milieu solidifié avec l'agar ou le milieu en double phase. L'évolution du comportement des microboutures des différents traitements a aussi été comparée à la suite de subcultures successives.

Mots-clés: Olivier - Picholine marocaine - Culture *in vitro* - Microboutures.

The effects of physical composition of *in vitro* culture medium and subcultures on the parameters of growth of the Moroccan Picholine microcutting

Three physical states of medium culture and their effects on bud expansion and shoot proliferation of Moroccan Picholine microcutting were compared. Explants used were excised from two years old plant and from sphaeroblasts. Liquid nutrient solution allowed a washing out of phenolic substances and promoted a significant, important and precocious auxiliary bud expansion. Development of new shoots and their elongation were also promoted by the physical state of the nutrient medium. Extended use of liquid nutrient medium ended up with an important development of vitrification (85.5- 90%) compared to the agar solid and the two phase media. The behavior of the microcutting growth in the different media was compared following successive subcultures.

Keywords: Olive - Moroccan Picholine - Microcutting - *in vitro* culture

Effets du type et de la concentration de sucres sur l'induction et le développement des embryons somatiques chez l'olivier cv. Picholine marocaine

Abdelhadi ABOUSALIM ^{1*}, Dou el Macane WALALI-LOUDIYI ¹ & Najiba BRHADDA ²

¹ Laboratoire de culture *in vitro*, Département d'Horticulture, Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, B.P. 6202-Institus, Madinate Al Irfane, 10101 Rabat, Maroc

² Université Ibn Tofaïl, Faculté des Sciences, Département de Biologie, Laboratoire de Physiologie Végétale, Kénitra, Maroc

* Auteur correspondant, e-mail: a.abousalim@iav.ac.ma

1. INTRODUCTION

Le saccharose est la source de carbone la plus communément utilisée en culture *in vitro*. Un certain nombre de travaux ont, cependant, conclu que d'autres types de sucres permettent d'obtenir de meilleurs résultats chez plusieurs espèces aussi bien en micropropagation (Leva *et al.*, 1994; Pua & Chong, 1984) qu'en embryogenèse somatique (Dewald *et al.*, 1989) et peuvent, ainsi, substituer le saccharose. La concentration de sucres dans le milieu de culture est également déterminante en embryogenèse somatique (Dewald *et al.*, 1989; Tremblay & Tremblay, 1991).

L'objectif du présent travail est de rechercher, en plus de la concentration optimale de saccharose, des sucres alternatifs pour la régénération d'embryons somatiques de l'olivier 'Picholine marocaine', principal cultivar à huile et à olives de table au Maroc.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. Matériel végétal

Des fragments de cotylédons, excisés à partir des graines matures de la Picholine marocaine, ont été utilisés dans la présente étude. Le protocole de préparation et de désinfection des graines est celui précédemment décrit (Brhaddda *et al.*, 2003).

2.2. Milieu et conditions de culture

Les explants ont été mis en culture dans des boîtes de Pétri contenant 20 ml de milieu de culture solidifié par l'agar. Le milieu utilisé est celui de MS (Murashige & Skoog, 1962). Ce milieu est meilleur pour l'embryogenèse somatique comparativement à d'autres formulations minérales testées (Brhaddda *et al.*, 2003). Le milieu d'induction

a été additionné de 2 mg/l d'ANA (acide 1-naphtalène acétique) et le saccharose a été testé aux concentrations de 20, 30, 60 et 90 g/l.

Dans un second essai, le saccharose a été comparé au mannitol et au sorbitol à 30 g/l. La phase d'induction a lieu à l'obscurité, à $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Après six semaines de culture, les cals embryogènes obtenus ont été transférés dans un milieu de culture dépourvu d'auxines et placées à la lumière (3000 Lux, 16 h de photopériode) et ce afin de favoriser le développement des embryons somatiques.

2.3. Analyses statistiques

Les pourcentages d'induction de cals et de régénération de plantules par embryogenèse somatique ont été calculés et les résultats soumis à une analyse de la variance (ANOVA). Les pourcentages (p) ont subi au préalable la transformation $\arcsin \sqrt{p}$ et le test de Newman et Keuls, au seuil 5%, a été utilisé pour le classement des moyennes.

3. RÉSULTATS

3.1. Effets de la concentration de saccharose

3.1.1. Induction des cals

L'augmentation de la concentration du saccharose au-delà de 20 g/l a significativement ($P < 0.001$) amélioré l'induction des cals. Les valeurs obtenues ont dépassé 90% dans les milieux contenant 60 et 90 g/l (Figure 1).

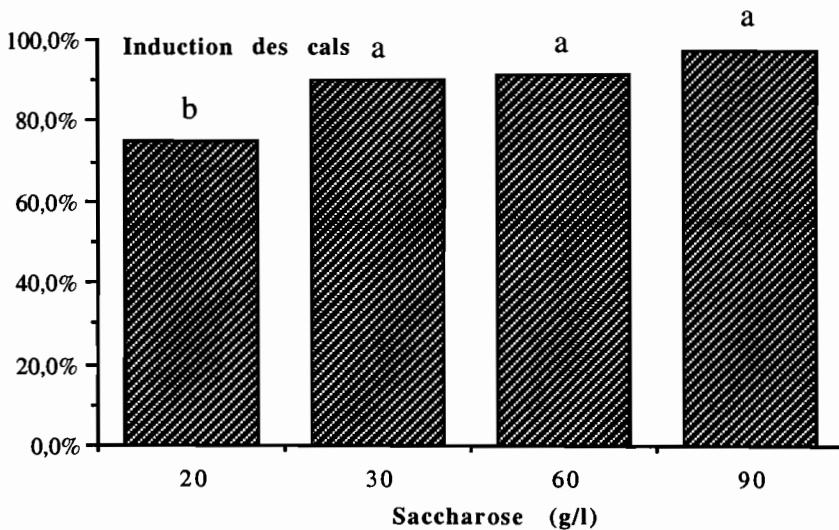


Figure 1. Effet de la concentration de saccharose sur l'induction des cals. Les valeurs suivies des mêmes lettres ne sont pas significativement différentes.

3.1.2. Développement des embryons somatiques et régénération des plantules

La régénération de plantules d'olivier a été observée dans les quatre milieux comparés. Toutefois, la différence est significative entre les concentrations testées. Les meilleurs résultats (37%) ont été obtenus en présence de 30 g/l et l'augmentation ou la réduction de la concentration ne fait que réduire, de façon significative, le rendement (Figure 2).

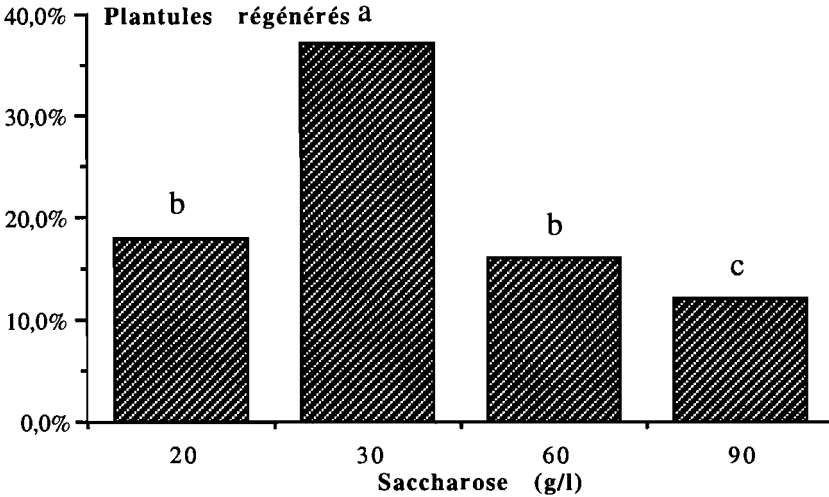


Figure 2. Effet de la concentration de saccharose sur la régénération des plantules par embryogenèse somatique. Les valeurs suivies des mêmes lettres ne sont pas significativement différentes.

3.2. Effets du type de sucre

3.2.1. Induction des cals

Les meilleurs résultats ont été obtenus en présence du mannitol (90.6%) suivi par le saccharose. L'utilisation du sorbitol a, cependant, réduit de façon significative ($P < 0.001$) l'induction des cals (Figure 3).

3.2.2. Développement des embryons somatiques et régénération des plantules

Seuls le mannitol et le sorbitol ont permis le développement d'embryons somatiques et la régénération de plantules d'olivier. Le résultat obtenu dans le cas du saccharose (37%) dépasse de façon significative celui obtenu dans le milieu contenant le mannitol (29%) (Figure 3).

4. DISCUSSION

Les résultats des essais menés dans la présente étude montrent bien la présence d'effets du type et de la concentration d'hydrates de carbone sur l'induction de cals et le développement d'embryons somatiques de l'olivier cv. 'Picholine marocaine'.

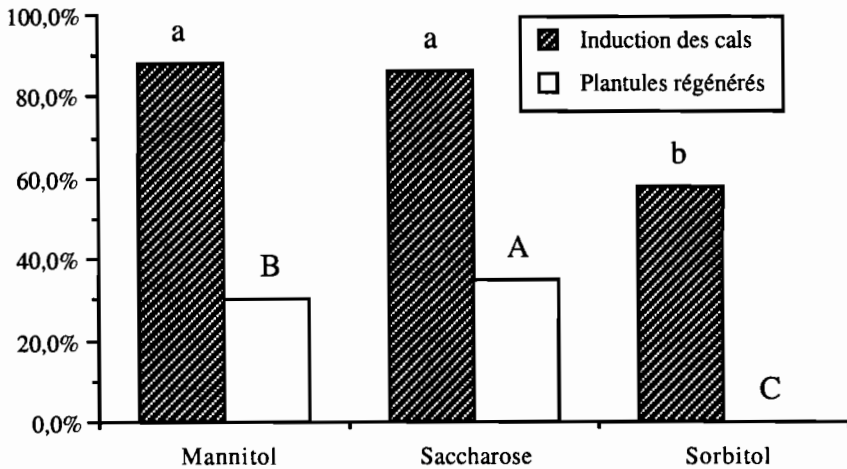


Figure 3. Effet du type de sucre sur l'induction des cals et la régénération des plantules par embryogenèse somatique. Les valeurs suivies des mêmes lettres ne sont pas significativement différentes.

Bien que des teneurs élevées (6 et 9%) de saccharose permettent une meilleure induction des cals, la concentration 3% demeure optimale pour le développement des embryons somatiques et la régénération de plantules de la Picholine marocaine. L'effet inhibiteur des niveaux élevés de sucres a aussi été confirmé chez d'autres espèces telle que le géranium (Gill *et al.* 1993). Il a, cependant, été rapporté que des concentrations élevées (5 et 6%, respectivement) sont mieux appropriées pour le développement des embryons somatiques d'autres espèces telles que le manguier (Dewald *et al.*, 1989) et le sapin (Tremblay & Tremblay, 1991).

Le mannitol et le saccharose se sont nettement distingués du sorbitol en favorisant la production d'embryons somatiques et la régénération de plantules d'olivier. Des études réalisées sur les cals de pêcher ont, par contre, montré que le sorbitol est plus approprié que le saccharose (Declerck & Korban, 1996).

En comparaison avec le saccharose, le mannitol a donné de meilleurs résultats en phase d'induction. Toutefois, la différence reste non significative. En phase de développement, c'est plutôt le saccharose qui a permis d'obtenir la meilleure régénération. Des essais de microbouturage menés chez l'olivier cv. Maurino ont montré que le mannitol est plus efficace que le saccharose (Leva *et al.*, 1994).

Les résultats obtenus peuvent ainsi traduire une différence d'affinité envers les diverses sources de carbones utilisées *in vitro* ainsi que des exigences différentes selon les espèces et selon le stade de développement.

5. RÉFÉRENCES CITÉES

- Brhadda N., Abousalim A. & Walali Loudiyi D.M. (2003) Effets du milieu de culture et de la lumière sur l'embryogenèse somatique de l'olivier (*Olea europaea* L.) cv. Picholine marocaine. *Fruits* 58(3): 167-174.
- Declerck V. & Korban S.S. (1996) Influence of growth regulators and carbone sources on callus induction, growth and morphogenesis from leaf tissues of peach (*Prunus persica* L. Batsch). *J. Hort. Sci.* 71(1): 49-50.
- Dewald S.G., Litz R.E. & Moore G.A. (1989) Optimizing somatic embryo production in mango. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 114(4): 712-716.
- Gill R., Gerrath J.M. & Saxena P.K. (1993) High frequency direct somatic embryogenesis in thin layer cultures of hybrid seed geranium (*Pelargonium x Hortorum*). *Can. J. Bot.* 71: 408-431.
- Leva A.R., Petruccioli R. & Bartolini G. (1994) Mannitol in *in vitro* culture of *Olea europaea* L. Cv. Maurino. *Acta Horticulturae* 356: 43-46.
- Murashige T. & Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-479.
- Pua E-C. & Chong C. (1984) Requirement for sorbitol (D-glucitol) as carbone source for *in vitro* propagation of *Malus robusta*. *Can. J. Bot.* 62: 1545-1549.
- Tremblay L. & Tremblay F.M. (1991) Carbohydrate requirement for the development of black spruce (*Picea mariana* Mill) and red spruce (*Picea rubens* Sarg) somatic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 27(1): 95-103.

Effets du type et de la concentration de sucres sur l'induction et le développement des embryons somatiques chez l'olivier cv. Picholine marocaine

L'effet des hydrates de carbones sur l'embryogenèse somatique de l'olivier a été étudié dans le présent travail. Des fragments de cotylédons excisés des graines matures de la Picholine marocaine ont été mis en culture dans un milieu d'induction additionné d'ANA (acide -naphthalène acétique). Le saccharose a été testé aux concentrations 20, 30, 60 et 90 g/l. Le saccharose a aussi été comparé au sorbitol et au mannitol. L'induction des cals a significativement ($P < 0.001$) été influencée par le type de sucre utilisé. Les meilleurs résultats ont été obtenus en présence du mannitol (62.3%). Cependant, le saccharose s'est distingué ($P < 0.001$) en phase de développement et le niveau de régénération de plantules par embryogenèse somatique a atteint 37%. La concentration de 30 g/l de saccharose peut être considérée comme optimale. Aucun développement d'embryons somatiques n'a été observé en présence du sorbitol à la concentration testée.

Mots-clés: Embryogenèse somatique - Olivier - *Olea europaea* L. - Picholine marocaine - Saccharose - Mannitol - Sorbitol

Effects of sugar type and concentration on olive cv. Picholine marocaine somatic embryos induction and development

The effect of carbohydrates on somatic embryogenesis of olive has been studied in the present work. Cotyledon portions taken from mature 'Picholine marocaine' seeds were cultured on an induction medium containing NAA (-naphthalene acetic acid). Sucrose was tested at the concentrations of 20, 30, 60 and 90 g/l. Sucrose was also compared with sorbitol and mannitol. Callus induction was significantly ($P < 0.001$) influenced by the sugar type added to the medium. The best results were obtained with mannitol (62.3%). However, sucrose was better in the development stage and the percentage of plantlets regenerated via somatic embryogenesis reached 37%. The concentration 30 g/l of sucrose seems to be the best. No somatic embryo development was observed on media supplemented with sorbitol at the tested concentration.

Keywords: Olive - *Olea europaea* L. - Picholine - Mannitol - Sucrose - Sorbitol - Somatic embryogenesis

N.B.: Le présent travail a été réalisé au laboratoire de culture *in vitro*, Département d'Horticulture, Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Rabat

Enracinement *in vitro* et production de vitroplants d'olivier (*Olea europaea* L.) à partir d'arbres adultes

Abdelhadi ABOUSALIM¹, Najiba BRHADDA²,
Dou el Macane WALALI LOUDIYI¹ & Doha BENALI²

¹ Laboratoire de culture *in vitro*, Département d'Horticulture, Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, B.P. 6202-Institus, Madinate Al Irfane, 10101 Rabat, Maroc

² Université Ibn Tofail, Faculté des Sciences, département de Biologie, Laboratoire de Physiologie Végétale, Kénitra, Maroc

Auteur correspondant, courriel: a.abousalim@iav.ac.ma

1. INTRODUCTION

La synthèse des études faites sur la micropropagation de l'olivier montre clairement que les travaux réalisés restent encore limités et que l'optimisation de l'efficacité du système demeure (Cimato, 1999). Aussi, les progrès réalisés ont surtout concerné le matériel juvénile alors que le matériel adulte reste récalcitrant *in vitro*. Dans le cas de la Picholine Marocaine, cultivar utilisé pour la production aussi bien d'olives à huile que de table et représentant près de 98% des plantations oléicoles au Maroc, les progrès réalisés ont surtout concerné l'enracinement des microboutures de matériel juvénile (Walali Loudiyi, 1989; Walali Loudiyi & Abousalim, 1993) et la régénération de plants par embryogenèse somatique à partir de cotylédons de graines matures (Brhadha *et al.*, 2003). La micropropagation du matériel adulte reste encore difficile et aucun procédé d'enracinement *in vitro* n'a encore été mis au point.

Les essais préliminaires qu'on a menés n'ont pas permis d'enraciner les microboutures issues directement d'arbres adultes de Picholine marocaine âgées de 30 ans. D'autres travaux s'imposent pour mettre au point un processus adéquat de microbouturage de matériel végétal sélectionné. Certaines procédures ont d'ailleurs été suggérées par certains auteurs pour améliorer l'enracinement chez l'olivier. Celles-ci incluent le maintien de la base des microboutures à l'obscurité, l'addition de polyamines au milieu de culture et l'inoculation avec *Agrobacterium rhizogenes* (Rugini *et al.*, 1987; Rugini & Fedeli, 1990). D'autres auteurs ont récemment réussi l'enracinement de l'olivier mais en utilisant des pousses établies *in vitro* pendant 5 ans (Mencuccini, 2003).

Dans le présent travail, une alternative simple, performante et rapide est testée pour enraciner *in vitro* des microboutures d'olivier obtenues à partir d'arbres adultes sélectionnés. Les résultats sont comparés à ceux des explants juvéniles.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. Matériel végétal utilisé et méthode de désinfestation

Le matériel végétal utilisé provient d'arbres adultes de la Picholine marocaine, âgés de 30 ans, et de vitroplants issus de germinations. Les explants du matériel adulte sont prélevés à partir d'un parc à bois reconstitué par bouturage semi-ligneux des arbres âgés sélectionnés et les plants ont été maintenus sous-serre. Des prélèvements ont été réalisés jusqu'à l'âge de 3 ans. Dans le cas du matériel juvénile, la germination des graines préalablement décortiquées et prétraitées à basse température a lieu *in vitro*, dans un milieu MS modifié, selon la procédure précédemment décrite (Brhadda *et al.*, 2000).

2.2. Milieux et conditions de culture

Les microboutures enracinées sont issues de la phase de prolifération, réalisée dans le milieu OM (Rugini, 1984) additionné de 30 g/l de saccharose et de 5 mg/l de zéatine. Cette composition minérale a d'ailleurs donné de meilleurs résultats comparativement à d'autres formulations (Brhadda *et al.*, 2003).

L'induction racinaire a lieu dans un milieu de base dénommé OM-BAW reconstitué par modification du milieu OM. Les modifications apportées au milieu OM ont concerné, entre autres, les macroéléments, les microéléments et les vitamines. Le milieu d'induction a été additionné ou non d'auxine. L'AIB (acide indole-3-butyrique) a été testé à 0, 4.9, 14.8 et 24.6 μM . Les explants ont ensuite été transférés dans un milieu frais dépourvu d'auxines. Le milieu de culture a été solidifié par l'agar et autoclavé, après ajustement du pH à 5.8, pendant 20 min. à 121°C. Les phases de prolifération et de développement racinaire ont eu lieu à la lumière, sous une photopériode de 16h, alors que l'incubation des pousses en phase d'induction racinaire a lieu à l'obscurité. La température a été maintenue à 25±2°C.

2.3. Acclimatation des vitroplants

Les microboutures enracinées ont été transplantées dans des pots contenant un substrat stérilisé à la vapeur et composé de tourbe, de sable et de vermiculite (2:1:2; v:v:v). Les plants ont été maintenus, pendant 45 jours, sous des conditions de température et d'humidité contrôlées avant leur transfert sous les conditions ambiantes d'une serre plastique. Les plants ont été régulièrement irrigués et des traitements anti-fongiques préventifs ont été appliqués.

2.4. Analyses statistiques

Un dispositif complètement aléatoire a été adopté et le nombre d'explants par traitement a été de 36. Les pourcentages 0 et 100 ont subi, respectivement, la transformation $(1/4n)$ et $(1-1/4n)$; n étant le nombre d'explants mis en culture, et les pourcentages ont

subi la transformation arc $\sin\sqrt{P}$ avant de procéder à l'analyse de la variance (ANOVA). Le test de Newman et Keuls, au seuil de 5%, a été utilisé pour le classement des moyennes.

3. RÉSULTATS

3.1. Interaction entre les concentrations d'auxine et l'âge de l'explant

3.1.1. Pourcentage d'enracinement

Une interaction significative ($P < 0.001$) a été notée entre les concentrations d'auxine dans le milieu d'induction et le matériel végétal utilisé (Tableau 1). En présence d'auxine, c'est la concentration 14.8 μM qui a permis d'obtenir les meilleurs résultats aussi bien pour le matériel juvénile (100%) que pour le matériel adulte prétraité (91.6%). L'enracinement des deux types d'explants a significativement été réduit en présence de 4.9 et 24.6 μM . Aucune formation de racines n'a été notée en l'absence d'auxine (Figure 1). Il est à noter que les niveaux d'enracinement peuvent être considérés comme satisfaisants en présence de 4.9 μM d'auxine après un mois de culture. Cependant, les racines produites sont très fines et leur longueur moyenne n'a pas dépassé 0.2 cm dans le milieu de développement.

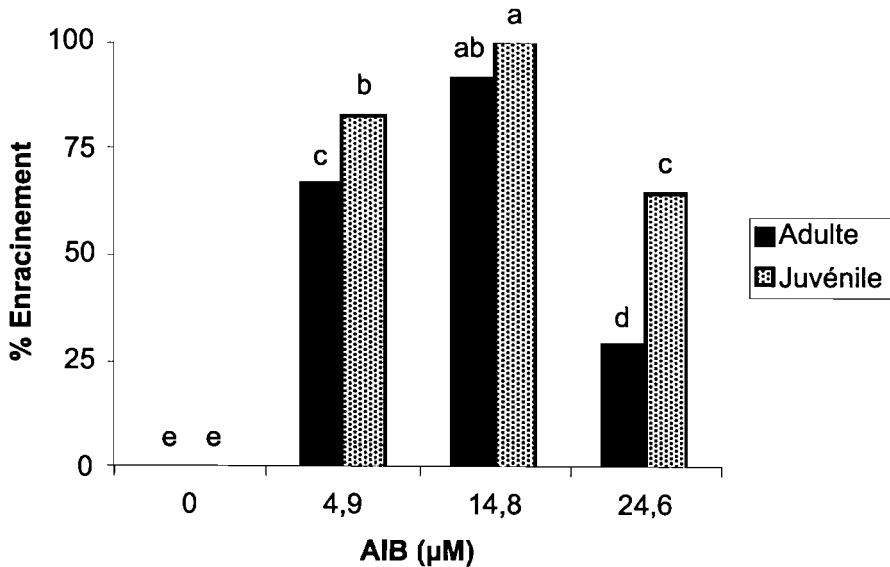


Figure 1. Effet de l'interaction de la concentration d'auxine et de l'âge de l'explant sur le pourcentage d'enracinement *in vitro* des microboutures de la Picholine marocaine. Les pourcentages suivis de la même lettre ne diffèrent pas significativement à 5%.

3.1.2. Nombre moyen de racines

Aucune interaction significative ($P < 0.05$) n'a été notée entre la concentration d'auxine et le type d'explant utilisé en matière de nombre de racines produites.

3.1.3. Effet de la concentration d'auxine

Le nombre de racines le plus élevé a été obtenu en présence de $14.8 \mu\text{M}$ d'AIB (3.8 racines par explant en moyenne) suivie par la concentration $24.6 \mu\text{M}$ (3 racines par explant); les plus faibles valeurs (1.8 racines par explant) étant observées dans le milieu additionné de $4.9 \mu\text{M}$ d'auxine (Tableau 1).

Tableau 1. Effet de la concentration d'auxine sur le nombre moyen de racines produites par microbouture

AIB (μM)	0	4.9	14.8	24.6
Nombre moyen de racines	0.0 d	1.8 c	3.8 a	3.0 b
ANOVA	P<0.001*			

* Les valeurs suivies de la même lettre ne diffèrent pas significativement à 5%.

3.1.4. Effet de l'âge de l'explant

Dans le cas du matériel juvénile, le nombre de racines par explant a été de 2.4 et ce nombre a diminué significativement ($P < 0.05$) pour atteindre 1.9 chez le matériel adulte (Tableau 2).

Tableau 2. Effet de l'âge de l'explant sur le nombre moyen de racines produites par bouture

Âge de l'explant	Juvenile	Adulte
Nombre moyen de racines	2.4 a	1.9 b
ANOVA	P<0.05	

* Les valeurs suivies de la même lettre ne diffèrent pas significativement à 5%.

3.1.5. Acclimatation des vitroplants

Les microboutures enracinées *in vitro* se sont parfaitement acclimatées aux conditions ambiantes après leur transplantation. Le taux de survie a été de 80%. Les plants développés n'ont présenté aucune anomalie apparente.

4. DISCUSSION

La micropropagation est une alternative très prometteuse pour une multiplication rapide et conforme des clones et variété sélectionnées ou nouvellement créées et dans le cas des espèces ou des cultivars présentant des difficultés de propagation végétative. La difficulté d'enracinement des espèces ligneuses pérennes et du matériel adulte est bien documentée et constitue une entrave certaine à l'application des techniques de culture de tissus à de nombreuses espèces d'intérêt commercial et environnemental telle que l'olivier.

D'ailleurs, une faible réactivité a précédemment été notée dans le cas d'utilisation d'explants provenant directement d'arbres adultes de la Picholine marocaine et aucun enracinement n'a auparavant été obtenu *in vitro* pour ce type de matériel (Walali Loudiyi & Abousalim, 1993). D'autres auteurs ont également rapporté la difficulté d'enracinement de différents types d'explants provenant d'oliviers âgés de 25 ans (Rokba *et al.*, 2000).

Le protocole développé dans la présente étude a ainsi permis, pour la première fois, d'obtenir un niveau d'enracinement très élevé (91.6%) à partir de matériel adulte de la Picholine marocaine, lequel résultat ne diffère pas significativement de celui obtenu chez le matériel juvénile. Le nombre moyen de racines par microbouture a été de 3.8. Aussi, l'acclimatation des vitroplants a été facile et a atteint 80%.

L'utilisation de jeunes plants obtenus par bouturage semi-ligneux à partir de parc à bois âgé de 30 ans et les prélèvements successifs auraient favorisé le rajeunissement du matériel végétal de départ et contribué à l'amélioration de son enracinement *in vitro*. Nos résultats montrent que ces plants expriment ce potentiel d'enracinement même après trois ans d'élevage sous-serre.

D'autres techniques ont d'ailleurs été adoptées pour favoriser le rajeunissement du matériel adulte et améliorer sa réactivité. La pratique de tailles sévères des pieds-mères, le greffage ou les subcultures successives *in vitro* en sont des exemples confirmés, respectivement, chez *Prunus* (Howard *et al.*, 1989), *Eucalyptus* (Franclet, 1979) et *Sequoia* (Fouret *et al.*, 1985).

Le présent protocole est basé sur l'utilisation, en plus des explants rajeunis, d'un milieu d'induction racinaire approprié additionné de 14.8 μM d'AIB. Le nouveau milieu de culture qu'on a mis au point, dénommé OM-BAW, est le résultat de modifications apportées au milieu OM ayant concerné, entre autres, les macroéléments, les micro-éléments et les vitamines.

Dans d'autres travaux, c'est plutôt l'ANA (acide -naphthalène acétique) à 1 mg/l, en comparaison avec l'AIB (acide indole-3-butyrique) et l'AIA (acide indole-3-acétique), qui a été le plus actif (Rugini, 1984). Il est aussi important de mentionner que notre procédé a l'avantage de favoriser un enracinement rapide des microboutures, sans

recours à un séjour prolongé des explants *in vitro*. D'ailleurs, l'enracinement réussi pour plusieurs cultivars d'olivier a nécessité l'utilisation de pousses établies *in vitro* pendant 5 ans en plus d'un obscurcissement du milieu de culture (Mencuccini, 2003).

Les résultats ainsi obtenus sont très prometteurs et ouvrent, certes, de nouvelles perspectives pour l'intégration des techniques de culture *in vitro* dans les programmes de propagation et d'amélioration génétique de l'olivier.

5. RÉFÉRENCES CITÉES

- Brhadda N., Walali L.D., Abousalim A. & Benali D. (2000) Effet de la température et de l'endosperme sur la dormance et la germination des embryons d'olivier (*Olea europaea* L.) variété Picholine marocaine. *Agronomie* 20:643-653.
- Brhadda N., Abousalim A. & Walali L.D. (2003) Effets du milieu de culture et de la lumière sur l'embryogenèse somatique de l'olivier (*Olea europaea* L.) cv. Picholine marocaine. *Fruits* 58(3) :167-174.
- Cimato A. (1999) L'élevage des plants d'olivier en pépinière. In: Cimato A. (ed.). Propagation et certification des plants. Séminaire International sur les Innovations scientifiques et leur application en oléiculture et oléotechnie. Florence, 10-12 mars 1999. *COI* pp. 1-29.
- Fouret A., Arnaud Y. & Larrieu C. (1985) Rajeunissement *in vitro* de *Sequoia sempervirens*: effet du nombre et de la fréquence des subcultures, recherche de critères précoces de juvénilité. *AFOCEL* pp.112-137.
- Francllet A. (1979) Rajeunissement des arbres adultes en vue de leur propagation végétative. *AFOCEL, Etudes et Recherches* 12: 3-8.
- Howard B.H., Jones O.P. & Vasek J. (1989) Long-term improvement in the rooting of plum cuttings following rejuvenation. *J. Hort. Sci.* 64(2):147-156.
- Mencuccini M. (2003) Effect of medium darkening on *in vitro* rooting capability and rooting seasonality of olive (*Olea europaea* L.) cultivars. *Scientia Horticulturae* 97 (2): 129-139.
- Rokba Z.A., Loxou V.K. & Lionakis S.M. (2000) Regeneration of olive (*Olea europaea* L.) *in vitro*. COST 843, WG1: Developmental Biology of Regeneration. 1st meeting, 12-15 oct., Geisenheim, pp. 25-26.
- Rugini E. (1984) *In vitro* propagation of some olive (*Olea europaea sativa* L.) cultivars with different root ability, and medium development using analytical data from developing shoots and embryos. *Scientia Horticulturae* 24:123-134.
- Rugini E., Jacoboni A. & Bazzoffia A. (1987) A simple *in vitro* method to avoid the initial dark period and to increase rooting in woody species. *Acta Horticulturae* 227:438-440.

Rugini E. & Fedeli E. (1990) Olive (*Olea europaea* L.) as an oilseed crop. In: Bajaj Y.P.S. (ed.). Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 10. Legumes and Oilseed Crop. Springer-Verlag, Berlin, pp. 593-641.

Walali Loudiyi D.M. (1989) Chemical and physical factors influencing *in vitro* propagation of moroccan Picholine olive (*Olea europaea* L.). Ph.D. Thesis, Institut Agronomique et vétérinaire Hassan II, Rabat.

Walali Loudiyi D.M. & Abousalim A. (1993) Olive tree propagation. In: Tantaoui - El Araki A. (ed.). Proceedings of the first CNCPRST-CSIS seminar on oleaginous plants. October 19-21. pp. 63-67, Rabat, Morocco.

Enracinement *in vitro* et production de vitroplants d'olivier (*Olea europaea* L.) à partir d'arbres adultes

Un procédé rapide et efficace d'enracinement *in vitro* de microboutures d'olivier a été développé à partir de matériel adulte, considéré jusqu'à nos jours comme récalcitrant. Le matériel végétal initial provient d'arbres de 'Picholine marocaine' âgés de 30 ans. Ce protocole est basé sur le rajeunissement, par bouturage semi-ligneux, du matériel adulte avant son établissement *in vitro* et sur l'utilisation d'un milieu d'induction racinaire approprié. Le nouveau milieu de culture développé, dénomé OM-BAW, est le résultat de modifications apportées au milieu OM, ayant concerné, entre autres, les macroéléments, les microéléments et les vitamines. Différentes concentrations d'AIB (acide indole-3-butérique) ont été testées et l'enracinement *in vitro* a été optimal à 14.8 µM. Un pourcentage d'enracinement de 92% a été obtenu et l'acclimatation des microboutures enracinées a atteint 80%. Ce protocole a permis l'enracinement de microboutures provenant de plants du parc à bois reconstitué à partir d'arbres adultes, exploité avec succès même après trois ans, et sans avoir recours à un séjour prolongé *in vitro* des cultures avant l'induction racinaire. Les résultats obtenus sont comparés à ceux du matériel issu de germinations. L'enracinement *in vitro* de l'olivier à partir de matériel adulte ouvre ainsi de nouvelles perspectives pour une production en masse de plants de qualité à partir de génotypes sélectionnés.

Mots-clés: Acclimatation - Enracinement - Matériel adulte - Micropropagation - *Olea europaea* L. - Olivier - Picholine marocaine

***In vitro* rooting and vitroplant production from adult plant material of Olive (*Olea europaea* L.).**

An efficient protocol for rapid *in vitro* rooting of microcuttings of the recalcitrant adult olive tree has been developed. The initial plant material used is taken from 30-year-old 'Picholine marocaine'. This protocol is based, first, on rejuvenation through rooting semi-hardwood cuttings taken from the adult plant material and, second, on using an appropriate root induction medium. The new developed medium is the result of modifications of OM medium which concerned elements including macronutrients, micronutrients and vitamins. Different IBA (indole-3-butyric acid) concentrations were tested and 14.8 μM was optimal. A rooting percentage of 92% has been obtained and acclimatation of rooted microcuttings reached 80%. Using this method, it was possible to root microcuttings taken from a recreated parc-à-bois, exploited with success even after three years, and with no need for a prolonged subculturing *in vitro*. A successful *in vitro* rooting of olive from adult plant material is promising for mass propagation of elite and selected genotypes.

Keywords: Acclimatization - Rooting - Adult plant material - Micropropagation - *Olea europaea* L. - Olive tree - Moroccan Picholine

N.B. Le présent travail a été réalisé au laboratoire de culture *in vitro*, Département d'Horticulture, Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Rabat.

Le secteur oléicole dans le Tafilalet. Situation actuelle et perspectives

Mohamed ZEDDOUK

ORMVA du Tafilalet, BP17, Errachidia; e-mail: mzeddouk@hotmail.com

1. INTRODUCTION

L'olivier, espèce multiculturelle, ne cesse de se développer dans le Tafilalet. En effet, sa capacité d'adaptation à une large gamme de types du sol et sa relative résistance aux caprices extrêmes des conditions climatiques ont permis son expansion dans la zone. Cet arbre, qui constitue la deuxième espèce arboricole dans les oasis après le palmier, tant sur le plan importance socio-économique que sur le plan de stratification végétale, subit les affres du vieillissement et des effets de la sécheresse.

La promotion du secteur oléicole dans le Tafilalet ne peut s'imaginer que dans le cadre d'un développement durable qui respecte l'environnement oasien. Trois axes d'amélioration se profilent à l'horizon:

- l'amélioration de l'existant (plantations et produits),
- la modernisation du secteur par le biais des vergers basés sur l'irrigation à économie d'eau,
- la production de produits de haute qualité aux dépens de la quantité.

Cette intervention essayera, autant se peut, d'analyser la situation actuelle de l'oléiculture dans le Tafilalet avant de déboucher, tout naturellement, sur les perspectives dont les éléments sont décelables dans le présent (une conduite proche de la production biologique) et dont les premiers jalons sont posés à travers les études en cours (convention avec l'Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II).

2. SITUATION ACTUELLE

2.1. Évolution des effectifs de l'olivier plantés

Avec un effectif de 1.120.000 pieds, la culture de l'olivier représente environ 36% de l'effectif arboricole planté dans la zone. La figure 1 reflète l'évolution des effectifs de l'olivier au cours des 15 dernières années du siècle dernier et les premières années du siècle actuel. En 19 ans, l'effectif d'oliviers plantés dans la zone a connu une évolution importante. Cet effectif est passé de 695.000 pieds en 1986/87 à 1.120.000 arbres en 2004/05, sur une superficie d'environ 6.700 ha totalement en irrigué, soit une augmentation de 61%. Cette progression est due, d'une part, à la grande importance accordée tant par les pouvoirs publics que par les producteurs à la culture de l'olivier dans la zone et, d'autre part, à la large adaptation de l'olivier aux conditions pédo-climatiques diverses et souvent critiques (piémont montagneux, zone de plateau au centre et plaine du Tafilalet).

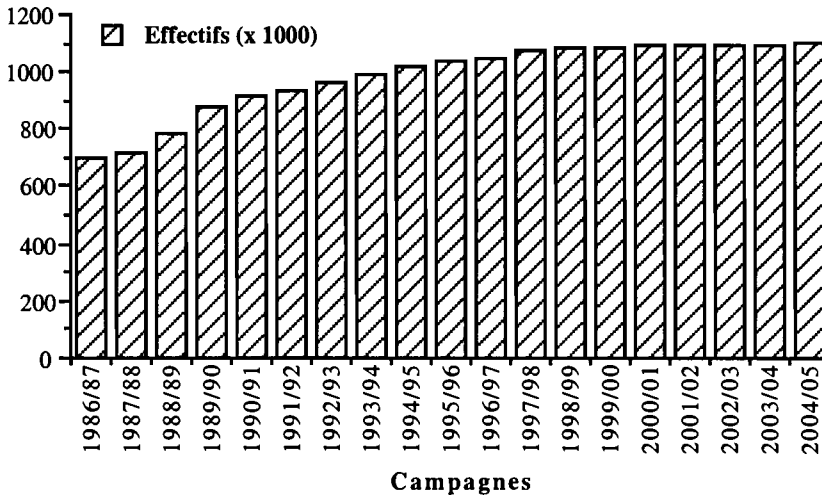


Figure 1. Évolution des effectifs de l'olivier dans le Tafilalet

2.2. Profil variétal

Le profil variétal est dominé, à l'instar des oliveraies nationales, par la Picholine marocaine, variété population à double fin: huile et olives de table. D'autres variétés comme Dahbia, Haouzia et Menara ont été introduites par l'Office et plantées dans les extensions durant les dernières années.

2.3. Production oléicole et sa destination

La production oléicole moyenne dans la zone est de 13.000 tonnes. La figure 2 montre l'évolution de cette production durant les dernières années.

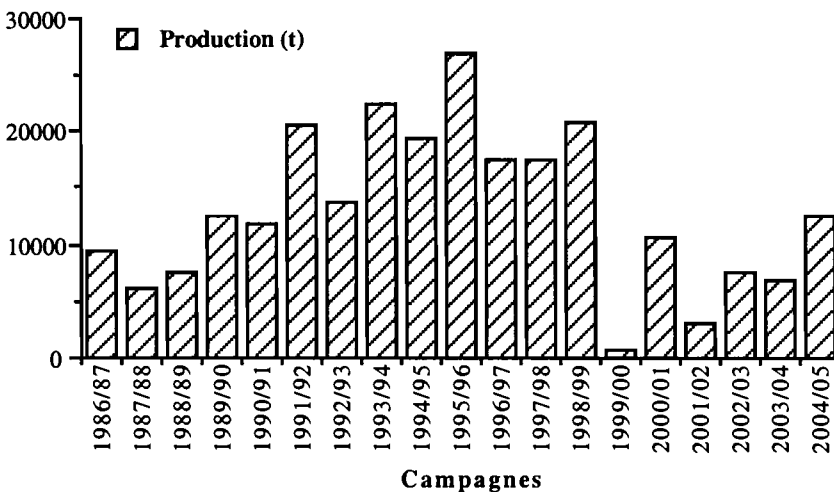


Figure 2. Évolution de la production oléicole dans le Tafilalet

Cette production oléicole en dents de scie traduit le caractère alternant de la Picholine marocaine accentué par diverses contraintes dont notamment les périodes de sécheresse récurrentes qui sévissent dans la zone.

Plus de 95% de la production est destinée à la trituration et le taux d'extraction d'huile varie de 16% (Maâsra) à 20% (unités industrielles). Le taux de transformation dans la zone est estimé à environ 46% de la production totale d'olives. Quant aux 54% restants, ils sont vendus hors province notamment à Meknès et Fès.

Cette faible transformation d'olives au niveau local s'explique par l'absence des unités de conserve et par la faible capacité des unités de trituration qui englobent 488 Maâsra traditionnelles, 2 huileries semi-modernes et 6 micro-huileries modernes introduites récemment par l'Office.

2.4. Rôle socio-économique de l'olivier

La valeur de la production oléicole dans la zone est estimée à 45,5 millions de dirhams. Elle contribue ainsi, d'une manière substantielle, au revenu des producteurs de la zone. Aussi, le secteur oléicole procure environ 1,5 Millions de journées de travail. Il est considéré à ce titre comme un important pourvoyeur d'emplois. Il contribue ainsi à la limitation de l'exode rural par la fixation des jeunes, en leur procurant du travail, dans leur milieu d'origine.

2.5. Répartition spatiale des oliveraies dans la zone

La culture de l'olivier est concentrée essentiellement dans les plateaux de la partie intermédiaire de la zone où elle constitue, avec le palmier et les cultures sous-jacentes, un système oasien harmonieux à trois strates (Errachidia et Goulmima (56%)) et le piémont de la zone montagneuse (Rich et Beni-Tadjit (46%)). Quant à la zone de plaine, elle n'abrite que 4% des effectifs

La figure 3 donne la répartition des plantations oléicoles dans la zone.

2.6. Contraintes

L'oléiculture dans le Tafilalet subit les affres d'un contingent de facteurs contraignants qui freinent son essor. Le poids de ces contraintes diffère d'une zone oléicole à l'autre ainsi que d'un type de plantations à l'autre. Les obstacles les plus importants sont:

- le vieillissement des plantations;
- la dominance de matériel végétal peu performant;
- le manque d'entretien;
- les techniques de récolte mal conduites;
- la trituration traditionnelle.

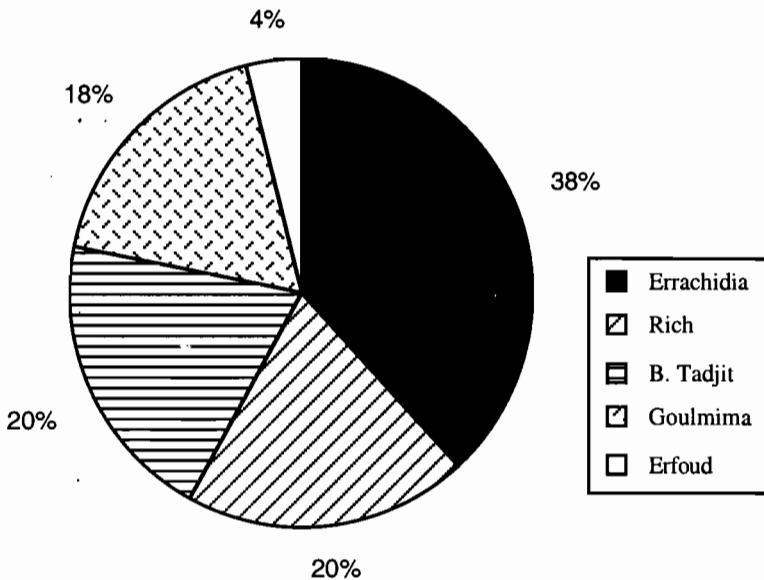


Figure 3. Répartition spatiale de l'olivier dans le Tafilalet

2.6.1. Vieillessement des plantations

À l'instar d'autres espèces arboricoles de la zone, l'olivier est considéré localement comme arbre providentiel donnant l'ombre et les fruits sans soins. Ce manque d'entretien couplé aux effets de périodes de sécheresse récurrentes ont accéléré le vieillissement du patrimoine. Ainsi, on peut distinguer trois types d'oliveraies, selon le facteur âge:

Type 1. Plantations âgées de moins de 15 ans se trouvant partout où les conditions sont favorables à une conduite adéquate (climat, eau et densité). Il s'agit des plantations réalisées dans le cadre de la promotion de la production oléicole nationale. Ces oliveraies représentent 10% des effectifs.

Type 2. Oliveraies âgées de 15 à 50 ans. Ces plantations sont localisées dans des zones moins loties que celles du premier type, mais offrent néanmoins des conditions permettant une culture d'olivier. Il s'agit de la plaine de Tiallaline, périmètre de recasement, Bour Khorbat, extension Beni-Tadjit et Boudnib. Ces zones constituent 45% de l'effectif.

Type 3. Oliveraies âgées de plus de 50 ans. Ces plantations sont localisés dans les zones à tradition oléicole ancestrale. Ce sont les oliveraies limitrophes de la ville d'Errachidia (Kheng et M'daghra) et de Goulmima. Ce type représente également 45% de l'effectif.

2.6.2. Dominance de matériel végétal peu performant

L'essentiel des effectifs est représenté par la Picholine marocaine, variété population connue par son hétérogénéité, son auto-incompatibilité élevée, son alternance et sa grande frondaison. La productivité en olives et son rendement en huile sont très variables d'un clone à l'autre et d'une région à l'autre

2.6.3. Manque d'entretien

2.6.3.1. Fertilisation et irrigation

En matière de techniques culturales, l'olivier fait rarement l'objet d'entretiens particuliers. Cependant, son association avec des cultures sous-jacentes lui permet de bénéficier des irrigations et des fumures apportées à celles-ci. Quant aux oliviers qui se sont isolés des cultures intercalaires par leur ombrage excessif, ils sont pourvus de cuvettes plus ou moins adaptées à leurs dimensions, mais ne bénéficient des irrigations que d'une manière très aléatoire aussi bien en dose qu'en fréquence.

2.6.3.2. Taille et traitement phytosanitaire

Au Tafilalet, à l'instar d'autres régions oléicoles marocaines, l'olivier fait l'objet de nombreuses attaques de ravageurs. À ce titre, il y a lieu de citer la teigne (*Prays oleae*) dont les attaques sur les boutons floraux, les jeunes pousses et les jeunes fruits compromettent la production de l'année et des années suivantes. La mouche de l'olivier (*Bactrocera oleae*) dont l'asticot attaque les fruits et peut, en cas de fortes infestations, détruire toute la production. Le psylle (*Enphylura olivina*), qui cause la chute des grappes florales, la stérilité des fleurs et la réduction du taux de nouaison. Le scolyte (*Phloeotribus scarabeioides*) affaiblit l'arbre en creusant des galeries dans le tronc et les rameaux.

L'olivier ne fait pas l'objet de la protection phytosanitaire nécessaire pour des raisons techniques et socio-économiques aussi diverses que les problèmes sanitaires rencontrés. Sur le plan technique, l'étendue et l'incidence de différents ravageurs ainsi que les techniques de lutte ne sont pas maîtrisées. Le côté socio-économique est rattaché à la complexité de l'agriculture oasisienne (caractère vivrier de l'agriculture, micro-parcellaire, difficulté d'accès,...). La taille et les traitements phytosanitaires sont pratiqués essentiellement dans des secteurs de démonstration (actions menées par l'Office). Selon une étude réalisée au niveau des principales oliveraies de la zone, seuls 10% des producteurs (sur les 124 enquêtés) traitent une fois par an leurs oliviers. Encore faut-il signaler que ces traitements ne sont ni ciblés, ni bien conduits (mauvais dosage des produits).

2.6.4. Techniques de récolte mal conduites

Bien qu'il ne soit nul besoin de démontrer l'impact des techniques de récolte sur la productivité qualitative et quantitative, les producteurs de la zone pratiquent encore

le gaulage pour différentes raisons dont la plus souvent avancée est l'importance de la frondaison. Le gaulage couplé au manque d'entretien accentue le phénomène d'alternance des arbres.

2.6.5. Trituration traditionnelle

Environ 70% de la production d'olives de la zone est triturée par les Maâsra traditionnelles. Ceci engendre des pertes en tonnage et en qualité d'huile.

3. INTERVENTION DE L'ORMVA DU TAFILALET

Pour contourner ces contraintes et promouvoir le secteur, l'ORMVA du Tafilalet déploie des efforts dans le cadre des orientations arrêtées dans le Plan National Oléicole. Ce plan s'articule autour des principaux axes suivants:

- l'intensification de la conduite du patrimoine oléicole existant;
- l'extension des superficies plantées en olivier;
- la modernisation de l'outil de transformation et la promotion de la qualité;
- l'organisation de la profession et le renforcement du système d'incitation.

Concernant le Tafilalet, l'Office a mis l'accent sur les actions suivantes.

3.1. Régénération des vieilles plantations

Cette opération consiste à couper l'arbre au ras du sol et à renouveler toute la charpente pour lui permettre un regain de vigueur et de productivité. Cette opération participe à la réhabilitation du secteur affaibli par les effets néfastes de la sécheresse et du manque d'entretien. Elle est entreprise annuellement, dans le cadre d'une approche participative avec certaines associations professionnelles et certaines communes rurales.

Ainsi, à titre démonstratif, il a été procédé, pendant les trois dernières campagnes agricoles, à la régénération de plus de 10.000 vieilles plantations réparties entre Gourrama, Rich et Goulmima.

3.2. Extension des superficies plantées en olivier

Dans le cadre des extensions des superficies plantées, l'ORMVA du Tafilalet a encouragé la plantation de plus de 300.000 plants d'oliviers durant les quinze dernières années, soit environ une moyenne de 20.000 plants/an.

3.3. Amélioration de l'outil de transformation et de la qualité d'huile

En général, la plupart des huiles produites par les unités de trituration traditionnelles sont lampantes en raison de grands délais entre la cueillette et la transformation.

Face à cette situation, l'Office déploie des efforts pour l'amélioration des conditions de post-récolte et de transformation. C'est ainsi qu'il a introduit récemment 6 micro-huilleries modernes. Aussi, des campagnes de sensibilisation des agriculteurs à l'amélioration des techniques de récolte, de stockage et des procédés de trituration ont été intensifiées.

En 2002, une convention sur la promotion du secteur oléicole a été établie entre l'Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II et l'ORMVA du Tafilalet.

Cette convention a pour objectifs:

- la détermination de la période optimale de la récolte des olives;
- la restructuration et la modernisation des Maâsra traditionnelles;
- la valorisation des grignons d'olives;
- la formation des agriculteurs, propriétaires de Maâsra et éleveurs.

4. PERSPECTIVES

La complexité et la fragilité du système d'agriculture oasien plaide pour une oléiculture respectueuse de son environnement et s'intégrant harmonieusement dans le système en épousant ses spécificités.

De là se pose la question de la définition des objectifs tenant compte des contraintes et des atouts de milieu aussi bien que les exigences du marché. De ces objectifs découlera une stratégie à élaborer dans une vision de développement durable qui préserve la capacité de production dans le futur. Il s'agit d'avoir un secteur rentable tout en respectant l'environnement.

Trois axes se dessinent:

- l'amélioration de l'existant (plantations et produits),
- la modernisation du secteur par le biais des vergers basés sur l'irrigation à économie d'eau,
- la production de produits de haute qualité aux dépens du quantitatif.

Il sera donc question de:

- la poursuite de la réhabilitation du secteur par la continuation de l'opération de rajeunissement des vieilles oliveraies;
- l'encouragement à l'émergence des vergers oléicoles modernes, appliquant les bonnes pratiques agricoles et les nouvelles technologies dans le domaine d'irrigation à économie d'eau;
- l'amélioration de la qualité de l'huile à travers la restructuration et la modernisation des Maâsra traditionnelles;
- la production des huiles et olives de qualité qui auront droit à l'appellation d'origine contrôlée sous un label.

5. POUR EN SAVOIR PLUS

Anonyme (2004) Secteur Oléicole: une richesse à préserver et à développer. *Le terroir n°10. Revue du Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural*. pp. 26-27.

Anonyme (1995) La lettre de la SODIA, N° 10.

Jardak T (2001) Gestion technique des plantations d'olivier en conditions d'agriculture pluviale: nouvelles perspectives. Sfax, Tunisie, 22 janvier

N'ait M'barek A. (1996) Contraintes au développement de l'arboriculture dans la zone d'action de l'ORMVAT. Agronomie saharienne atouts et contraintes. *Les éditions de la DERD*, pp. 175-181

ORMVATAF (2003) L'oléiculture dans la zone d'action de l'ORMVA du Tafilalet.

ORMVATAF (1997) Plan stratégique du développement de l'ORMVA du Tafilalet, diagnostic de la situation actuelle. p:8

ORMVATAF. Rapports d'activités 2000, 2001, 2002, 2003

Zeddouk M (1996) Les systèmes de production oasiens dans le Tafilalet, contraintes et caractéristiques. Agronomie saharienne atouts et contraintes. *Les éditions de la DERD*, pp. 97-103.

Mécanisation de la récolte des olives en Tunisie. Résultats et perspectives d'avenir

Hatem BENTAHER, Béchir BEN ROUINA & Kamel GARGOURI

Auteur correspondant, courriel: bentaher.hatem@iresa.agrinet.tn

1. INTRODUCTION

Dans la majorité des pays méditerranéens, la récolte traditionnelle des olives est l'opération la plus coûteuse dans le cycle de production. En Tunisie, le coût de cette opération représente 60% des dépenses de l'oléiculteur et le poste récolte consomme 65% de la main-d'œuvre nécessaire pour les différentes opérations de la production. En effet, sur des besoins annuels de 25 à 30 millions journées de travail fournis par le secteur oléicole, la récolte des olives nécessite entre 15 à 25 millions de journées en fonction de l'importance de la production (Bentaher & Ben Rouina, 1999).

Dès la fin des années 80, la main-d'œuvre nécessaire à la production oléicole (récolte et taille) est devenue rare, chère et peu compétente, ce qui a provoqué de nombreux problèmes dont essentiellement (Bentaher & Ben Rouina, 2000):

- La dégradation de la qualité du travail engendrant une baisse de la qualité des huiles produites. Les fruits récoltés par gaulage sont abîmés, supportent mal le transport, moisissent lors du stockage et génèrent une huile dont l'acidité est élevée.
- Le taux des huiles de bonne qualité (extra et vierge) a régressé de 65% à la fin des années 70 à environ 30% ces dernières années.
- Des dégâts parfois considérables au niveau de l'arbre: bien qu'il soit prohibé, le gaulage est de règle et provoque une chute parfois énorme des pousses (jusqu'à 20 kg de pousses par 100 kg d'olives récoltées) qui porteront des fruits les années suivantes. Ceci se traduit par l'accentuation de l'alternance de la production.
- Un allongement excessif de la campagne de récolte retardant les travaux habituels d'entretien (taille, travail du sol), épuisant l'arbre récolté après le démarrage végétatif survenant en février et engendrant une baisse de la qualité des huiles produites.
- Un coût élevé de cette opération: les dépenses de récolte représentent jusqu'à 60% des charges totales de la production.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. Outils d'aide à la récolte des olives

Ce sont des outils faiblement mécanisés pour la récolte des olives. Introduits dans le chantier de cueillette sans l'avoir trop modifié, chaque ouvrier dispose d'un outil d'aide qu'il peut utiliser selon qu'il travaille par terre ou sur la double échelle.

Les expérimentations réalisées durant les quatre dernières années comportent deux équipes de 6 à 8 ouvriers: l'une utilisant les outils d'aide et l'autre utilisant les peignes plastiques (équipe témoin). Ces essais sont menés dans la région de Sfax sur la variété chemlali à différents stades de maturation des fruits.

En vue de bien juger les performances de ces outils et les rendements réels des ouvriers qui les utilisent, une série d'observations et d'évaluations est réalisée. Elles comportent:

- La force d'attache du fruit sur un échantillon de 200 olives par arbre. Cet échantillon est réparti sur les quatre directions cardinales de la frondaison (Nord, Sud, Est et Ouest) puisque la maturation pourrait être fonction de la quantité de soleil reçue par les fruits.
- Le poids moyen du fruit déterminé sur un échantillon de 200 fruits par arbre.
- Le nombre de récoltants.
- La masse d'olives récoltées par unité de temps (heure et journée).
- La masse d'olives restantes sur l'arbre.
- La quantité des pousses et des rameaux chutés par arbre et par kilo d'olives cueillies.

Les outils d'aide à la récolte d'olives sont alors comparés.

2.1.1. Peignes plastiques (Figure 1)

Ils sont constitués d'une manche de dix centimètres de long et de neuf doigts de forme courbée. Ces outils sont utilisés par les ouvriers travaillant sur des doubles échelles afin d'aider leur utilisation. Toutefois, pour la récolte des olives de petit calibre sur des arbres souffrant d'un déficit hydrique (cas de la variété Chemlali au cours des années 2000, 2001 et 2002), ces outils sont inefficaces. En effet, l'écartement entre les doigts laisse passer les fruits sans les cueillir.

2.1.2. Peignes vibrants (Figure2)

L'équipement comporte un compresseur actionné par la prise de force d'un tracteur ou par un moteur thermique à essence. Le mouvement rectiligne alternatif du vérin pneumatique engendre un mouvement oscillant des peignes. Les vérins sont montés sur des barres télescopiques de différentes longueurs (1.5 m, 2 m, 2.5 m et 3 m) à l'extrémité desquelles s'insèrent des manches qui présentent les leviers de commande de l'air comprimé. L'utilisation de ces outils présente deux problèmes:

- Étant montés sur une barre télescopique pouvant atteindre 3 m de long, la manipulation des peignes vibrants est difficile et fatigante. Ceci est dû essentiellement à la transmission des vibrations à travers la barre.
- L'utilisation de ces outils à l'intérieur de la frondaison n'est pas aisée.

2.1.3. Peignes rotatifs (Pick Machines) (Figure3)

Ils sont constitués d'un moteur actionné par une batterie de 12 V qui engendre la rotation en continu d'une série de doigts en forme de zigzag (tournant en sens inverse l'un par rapport à l'autre). L'ensemble est monté sur une barre télescopique de longueur variable. Ces outils ont montré une efficacité intéressante. Toutefois, le problème de la source d'énergie se pose puisque ces petites machines nécessitent la présence d'une

batterie en permanence pour chaque équipe. De plus, la charge de la batterie est insuffisante pour la durée d'une journée de travail.

2.1.4. Outils à doigts oscillants OLIVIERO (Figure 4)

L'équipement comporte un plateau incliné animé d'un mouvement rotatif, engendré par un moteur électrique actionné par une batterie de 12V. Le mouvement du plateau incliné entraîne l'oscillation de six doigts de 40 cm de long. L'équipement a un poids total de 2.2 kg et une longueur de 2.5 m, avec possibilité d'extension à 4 m. Ces appareils sont livrés avec des câbles de 12 m et un stabilisateur de tension pour protéger les moteurs.

2.1.5. Secoueurs de branches (Figure 5)

L'équipement est formé d'un crochet animé par un mouvement rectiligne alterné, engendré par un moteur thermique à essence (allumage électronique) à travers un système bielle manivelle. Les caractéristiques du moteur sont les suivantes:

- Le crochet a une ouverture de 42 mm et est monté sur une tige de 1.95 m. L'amplitude des vibrations est de 60 mm (crête à crête). L'équipement a un poids total de 11.8 kg par unité.

Deux facteurs limitent l'utilisation de ces outils:

- Le poids: les secoueurs pèsent plus qu'une douzaine de kg auxquels il faut ajouter l'effort de l'excitation transmis partiellement ou en totalité à l'épaule de l'opérateur. Subissant cette contrainte durant une journée de travail, les ouvriers ont jugé la manipulation fatigante.
- La manipulation de ces outils demande une certaine technicité.



Figure 1. Peigne plastique



Figure 2. Peigne vibrant



Figure 3. Peigne rotatif (Pick machine)



Figure 4. Outil à doigts oscillants



Figure 5. Secoueur de branches

Type: STIHL SP400; Cylindrée: 40.2 cm³; Capacité du réservoir: 0.5 L; Puissance: 2.9 ch (DIN); Poids total: 11.8 kg

2.2. Récolte par vibreurs de tronc et de charpentières

En dépit des hautes performances des vibreurs, leurs rendements ne dépassent guère 60% de la charge de l'arbre surtout pour la variété Chemlali qui occupe plus de 50% du patrimoine oléicole tunisien (Bentaher *et al.*, 2002).

L'objectif de notre travail est d'étudier le comportement dynamique de cette variété en présence de différents types de vibreurs. Il s'agit de quantifier cette réponse en fonction du type d'excitation (orbitale ou multidirectionnelle), de sa vitesse et de son emplacement. Dans le but de déterminer les facteurs limitatifs de la récolte par vibrations et d'étudier l'influence des paramètres du vibreur sur la réponse dynamique de l'arbre, une modélisation par éléments finis est réalisée.

Cette modélisation a commencé par la détermination des caractéristiques mécaniques du bois de l'olivier (Tableau 1).

Tableau 1. Caractéristiques mécaniques du bois de l'olivier

Densité	Humidité (%)	Coef. de Poisson	Module d'Young (N/mm ²)
1.16	41	0.28	1824

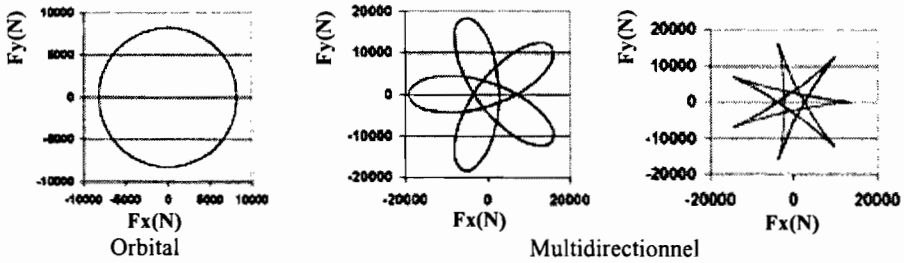


Figure 6. Diagramme d'excitation pour différents paramètres du vibreur

Le modèle éléments finis utilisé dans ce travail est représenté dans la figure 7; il présente 561 nœuds et 560 éléments.

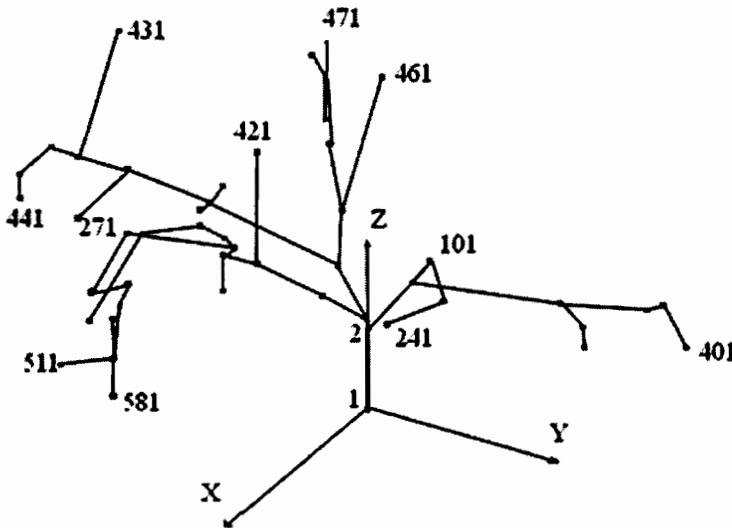


Figure 7. Modèle éléments finis de l'olivier

3. RÉSULTATS ET DISCUSSION

3.1. Outils d'aide à la récolte des olives

L'impact de ces machines sur le rendement des cueilleurs, le pourcentage d'olives restantes sur l'arbre et la chute des pousses sont présentés dans le tableau 2.

Tableau 2. Performances des ouvriers récoltant les olives aux outils d'aide à la récolte

Outil	Rendement horaire (kg)	Performance	
		Olives restantes (%)	Pousses abattues
Peignes plastiques	33	7	7.7
Peignes vibrants	39.6	9	2
Peignes rotatifs	60.5	9	3.6
Secoueurs de branches	38.5	38	2.7
Outils à doigts oscillants	36.3	24	5

Les résultats montrent que les meilleurs outils testés dans cette gamme sont les peignes rotatifs engendrant une augmentation de 83% du rendement horaire des ouvriers en comparaison avec celui des peignes plastiques. Toutefois, la condition de rentabilité économique reste à prouver par une étude détaillée de ces outils. Cette étude doit tenir compte des prix d'achats de ces outils, de leurs durées d'amortissement ainsi que de leurs consommables.

3.2. Récolte par vibreurs de tronc et de charpentières

Les deux diagrammes suivants montrent les valeurs maximales de la réaction (en N) au niveau des pédoncules pour des excitations au niveau du milieu du tronc. La réponse des six fruits est plus homogène pour l'excitateur multidirectionnel que pour l'orbital, l'écart par rapport à la moyenne est plus réduit (Figure 8).

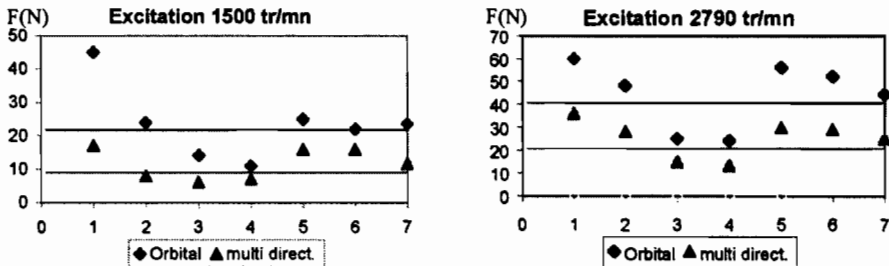


Figure 8. Distribution de la réponse niveau des pédoncules

Les résultats concernant les deux paramètres de l'étude (vitesse de rotation et emplacement de l'excitateur) sont regroupés dans les deux histogrammes suivants pour les deux excitateurs, la valeur de Fr est calculée comme étant la moyenne des réactions des six pédoncules.

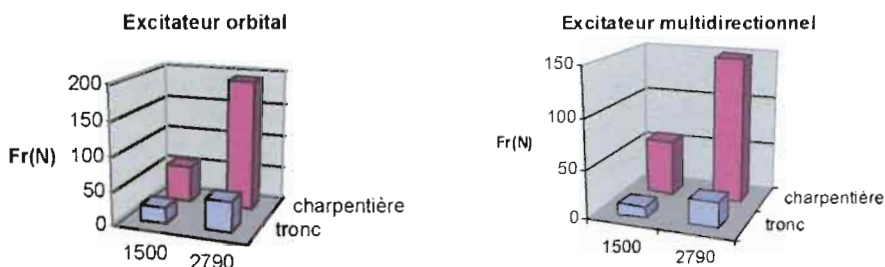


Figure 9. Moyenne des réponses des pédoncules

Ces diagrammes montrent l'influence de l'emplacement de la pince sur la réponse globale de la structure. L'influence de la vitesse est plus importante lorsque l'excitateur est placé au niveau des charpentières. Puisque les vibreurs multidirectionnels donnent une distribution meilleure quant à la réponse des fruits, ils sont plus adaptés pour la prise par le tronc.

Les meilleurs résultats étaient obtenus pour les hautes fréquences, d'où l'intérêt de concevoir des vibreurs dont la vitesse de rotation atteint les 3000 tr/mn. La vitesse de rotation des vibreurs existants ne dépasse pas les 1500 à 2000 tr/mn.

La masse réduite des fruits (1 g), d'une part, et l'importance de la force d'attache (3.5 N au milieu de la campagne), d'autre part, sont les facteurs limitant le rendement de la récolte par vibrations.

Le rendement des vibreurs mécaniques sur la variété Chemlali reste limité étant donné l'architecture de l'arbre, la majorité de la récolte étant située sur les branches retombantes.

4. RÉFÉRENCES CITÉES

- Bentaher H. & Ben Rouina B. (1999) Les outils d'aide à la récolte des olives, 6^{èmes} journées de l'IRESA. Nov. 1999 (Nabeul).
- Bentaher H. & Ben Rouina B. (2000) Mechanical harvesting of "Chemlali de Sfax" olive-tree». 4th International Symposium on Olive growing, Italy, September 2000.
- Bentaher H., Haddar M., Fakhfakh T. & Mâalej A. (2002) Finite elements modelling of olive tree mechanical harvesting using different shakers. International conference on advances in mechanical engineering, (Hammamet) Tunisia.

Mécanisation de la récolte des olives en Tunisie. Résultats et perspectives avenir

Réalisée d'une manière empirique, la récolte des olives rencontre des difficultés quant à la qualité et aux délais de son déroulement. Le rendement journalier moyen de l'ouvrier travaillant manuellement à la récolte des olives était de 90 kg. Avec l'introduction de quelques outils d'aide à la récolte manuelle, une amélioration de 60% de ce rendement (soit 153 kg / ouvrier . jour) a été enregistrée. Toutefois, au cours des années de fortes productions, la campagne de cueillette s'allonge d'une manière excessive. Cela ne peut être sans conséquences sur la qualité des huiles produites et sur la croissance et les productions ultérieures des arbres. Dans cette étude, les résultats obtenus et les perspectives de développement de l'utilisation de ces outils d'aide à la récolte manuelle des olives ainsi que les critères limitatifs de la récolte par vibreurs sont discutés.

Olive (*Olea europaea* L.) responses to environmental constraints in Mediterranean agroecosystems

Luca SEBASTIANI¹, Riccardo D'ANDRIA² & Roberto TOGNETTI³

¹ Scuola Superiore Sant'Anna di Studi Universitari e di Perfezionamento, I-56100, Pisa, Italy. E-mail: l.sebastiani@sssup.it

² CNR - Istituto per i Sistemi Agricoli e Forestali del Mediterraneo I-80056, Ercolano (Napoli), Italy. E-mail: r.d'andria@ispaim.na.cnr.it

³ Dipartimento di Scienze Animali, Vegetale e dell'Ambiente, Università del Molise, I-86100, Campobasso, Italy. E-mail: tognetti@unimol.it

1. INTRODUCTION

Olive has long been considered a marginal low-income crop. In recent years there has been a widespread renewal of interest, stemming from the increasing trend in oil consumption. Olive oil has been recently introduced with success in the diet of many non-Mediterranean countries. Hence the market for olive oil and table olives shows interesting development potential, particularly for high-quality production.

Olive (*Olea europaea* L.) is an evergreen tree and one of the most important tree crops in Mediterranean agroecosystems. Although olive is well adapted to the Mediterranean environment several stress factors restrict its growth. Therefore, olive productivity at the end of the growing season expresses only a fraction of the plant's genetic potential. Drought, salinity, unfavourable temperature, and irradiance are some of the environmental constraints that make the Mediterranean environment vulnerable in terms of sustainability for agricultural systems.

Olive behaves as an intermediate drought- and salt-tolerant species when compared to other temperate fruit trees. However, water deficit and salinity are the main limiting factors for olive growing in the Mediterranean climate. In northern and central Italy, as well as in other southern zones of Europe, where olive distribution approaches its climatic limits, low (freezing) temperatures become an important stress factor. Olive plant survival, in fact, can be seriously compromised when temperature approaches -10°C.

In the last decades, human activities have increased the number of environmental constrictions that plants have to withstand. Land use changes and air pollution have been added to traditional problems, accruing detrimental conditions to olive plantations. Changes in the composition of atmosphere have been observed for carbon dioxide (CO₂) and tropospheric ozone (O₃). Although the effects of O₃ and CO₂ on plant physiology and biochemistry are well documented, there is little knowledge of olive reaction and adaptation to them.

Despite the relevant importance of olive and its resistance to environmental stresses, studies in Mediterranean-type agro-ecosystems are still limited when compared to the progress achieved for other crop plants. In this paper, the physiological and biochemical studies performed on olive plants exposed to environmental stresses will be analysed and discussed.

2. WATER DEFICIT

In Mediterranean climates water deficit is probably one of the main factors limiting olive cultivation, though olive behaves as an intermediate drought-tolerant species when compared to other temperate fruit trees. Olive leaves can, in fact, tolerate very low water potential (up to $-6+8$ MPa) and lose almost 40% of tissue water, while maintaining a full rehydration capacity (Rhizopoulou *et al.*, 1991). These adaptations enable olive plants to establish a high water potential gradient between leaves and roots and consequently to extract soil water up to -2.5 MPa.

Drought stress determines growth inhibition and slows down photosynthetic activity (Bongi & Palliotti, 1994). However, olive plants still maintain a slight net assimilation rate (10% of well-water plants) at very low (-6.0 MPa) pre-dawn leaf water potential (Xiloyannis *et al.*, 1999) and prevent excessive water loss through stomatal closure (Fernandez *et al.*, 1997; Giorio *et al.*, 1999). Studies on the diurnal course of leaf water potential and gas exchange parameters in olive plants subjected to different levels of water deficit showed that net photosynthetic rates and stomatal conductance reached maximum values early in the morning both in well-watered and in water-stressed plants, but declined more and faster in plants exposed to stress conditions.

The down-regulation of photosynthetic machinery during severe drought stress affected the non-stomatal component of photosynthesis and perhaps induced a light-dependent inactivation of the primary photochemistry associated with photosystem II (PSII) (Angelopoulos *et al.*, 1996). Physiological parameters respond diurnally and seasonally to variations in olive tree water status, soil moisture conditions and atmospheric evaporative demand. Tognetti *et al.* (2004) found a considerable degree of agreement between daily transpiration deduced from heat-pulse velocity and that determined by calibration using the Penman-Monteith equation in the field. Summer drought caused decreasing leaf gas exchange and water potentials, and a progressive increase in hydraulic resistance (stronger in non-irrigated than irrigated trees), probably attributable to modifications in hydraulic properties at the soil-root interface. Negligible hysteresis, attributable to low plant capacitance, was observed in the relationship between leaf water potential and sap flow.

A proportional decrease in maximum daily leaf conductance with increasing vapour pressure deficit was observed, while mean daytime canopy stomatal conductance decreased with the season. As a result, plant water use was limited and excessive drought stress prevented. Non-irrigated olive trees (cv. Kalamata) recovered after the summer drought, showing a physiological behaviour similar to that of irrigated trees.

The maintenance of some photosynthetic activity during drought stress enables olive plants to continue the production of assimilates and their accumulation in the root system, determining a higher root-leaf ratio in comparison with well-watered plants (Xiloyannis *et al.*, 1999). These adaptations result in a stronger response to drought conditions (Celano *et al.*, 1999). Leaf processes and root contact with soil particles depend on cell turgor, which is regulated through active and passive osmotic adjustments. In water-stressed olive plants, mannitol and glucose have an important role in active osmotic adjustments together with organic acids, such as malic and citric, while mineral elements are not involved (Xiloyannis *et al.*, 1999). Active osmotic adjustment of the cv. Coratina subjected to water stress was found in leaves and also in roots, 1.42 MPa, and mannitol was the main carbohydrate involved in osmotic potential decrease (Dichio *et al.*, 2003); the maximum elastic modulus increased in water stressed plants.

Rewatering of drought stressed olive plants induced a period of leaf activity inertia. This effect was probably mediated by hormonal balance and hydraulic conductivity of the xylem. Studies on short-term water use dynamics in olive trees after rewatering, conducted by heat-pulse measurements of the sap flux (Moreno *et al.*, 1996), have shown differences between regularly irrigated and non-irrigated trees. Following irrigation, regularly irrigated plants maintained, for 3 days after irrigation, transpiration rates of $1.65 \text{ mm}^3 \text{ mm}^{-2} \text{ d}^{-1}$. Following to this phase, the rate of water use declined and transpiration cut down. The sap flow in the near-surface root dropped concomitantly. In non-irrigated plants, irrigation lifted the transpiration rate to only $1.12 \text{ mm}^3 \text{ mm}^{-2} \text{ d}^{-1}$ and leaf water potential did not recover because of plant inability to refill cavitated vessels. These data showed that, even after rewatering, olive behaves as a parsimonious and cautious consumer of soil water.

Further studies on the physiology and biochemistry of olive plants during water deficit and rewatering are important to better understand the cellular and molecular mechanisms involved in plant resistance, such as those deserved by antioxidant enzymes and proline metabolism (Sofa *et al.*, 2004a, b).

Physiological responses to drought are activated by plants at considerable energy expenditures, inducing detrimental effects on vegetative development and yield performance; not only during the current season but also in subsequent years. Many studies report the effects of different irrigation levels supplied constantly throughout the period of drought. However, recent experiments have shown that, for various cultivars (for table, oil and double aptitude olives), the complete satisfaction of the crop water requirement throughout the irrigation season did not result in a significant increase in yield compared with treatments that had received 66% of ETC (crop evapotranspiration). Plants irrigated with only 33% of ETC proved to be more productive than rain-fed crops (Figure 1). Yield increases in both cases were caused both by a larger number of fruits per plant and by the higher fruit mean weight (Patumi *et al.*, 1999; d'Andria *et al.*, 2000).

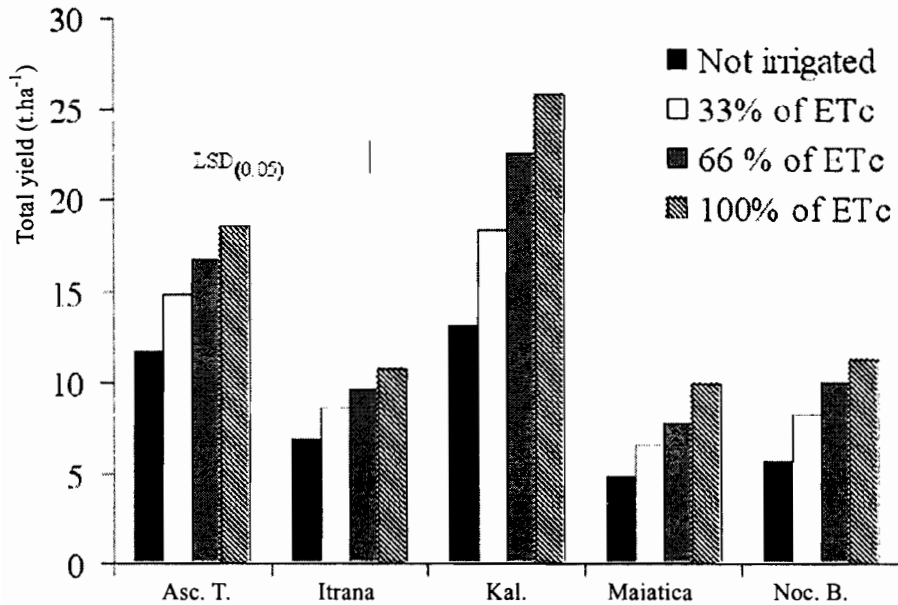


Figure 1. Cumulative yield (5-year) of olive cultivars grown under different watering regimes in southern Italy. T0 = rainfed control; T1, T2, T3 = treatment irrigated with 33, 66, and 100% of ET_c. Least significant difference (DMS) at 0.05 level is also reported (From d'Andria *et al.*, 2004)

These results agree with those of other trials held in different environments and with different cultivars. Hence the choice of an irrigation rate between 33 or 66% of ET_c depends mainly on economic considerations, while watering with 100% of ET_c results in an increase of pruning costs and disease problems.

Water is not always available in sufficient volumes during the season and/or there are often restricting regulations for the use of public water (rivers, lakes etc.). This situation has given rise to trials for developing irrigation strategies based on water deficit during specific phenological phases. In a trial carried out in Spain, the cv. Arbequina showed that irrigation volumes of 75 and 50% of ET_c supplied from mid July to the end of September resulted in no significant yield reductions, while water saving was respectively 24 and 35%. In the same trial a 25% of ET_c restored following the same experimental protocol caused a 16% yield loss and 47% water saving compared to the irrigated control (Alegre, 2001).

These irrigation strategies may be adopted in deep soils with good water retention and requires validation before being recommended in pedo-climatic environments different from those where trials were originally conducted.

In areas where water for irrigation is very limited in quantity there is no other solution but to carry out complementary irrigation. In such conditions, when possible, it is necessary to supply the crop with watering in the phenological phases that are most

sensitive to water stress (in terms of yield). The most sensitive phases are fruit set, and fruit development during cell division and rapid growth.

By using irrigation, some quality parameters are also influenced. The effects on the fresh product concern mainly fruit biometric characteristics. Fruit size, the pit/flesh ratio and the number of fruits per plant are positively affected by irrigation. Clearly, the stress level leads to more or less evident effects. These are important aspects to bear in mind especially to improve production of table olives. Water deficit reduced fruit fresh weight and volume after 8 and 22 weeks from full bloom in the cv. Leccino (Rapoport *et al.*, 2004). However, the mesocarp cell number was unaffected by drought. When the stress was relieved, endocarp growth recovered more than mesocarp growth, which indicates that the endocarp is not only metabolically expensive, but also a preferred sink tissue during some stages of olive fruit development.

Conflicting results are reported in the literature on the percentage of oil in fruits. In general, a reduction in the percentage of oil on a fresh weight basis is observed in irrigated orchards as compared to crops that are rain-fed or subjected to deficit irrigation; which is caused by the higher fruit water content under irrigated conditions (Michelakis *et al.*, 1995). However, the percentage of oil calculated on a fruit dry basis is not correlated closely with water stress. In many studies on irrigation with total or partial satisfaction of crop water requirements conducted in areas with a mean annual rainfall higher than about 450 mm, the irrigation volume does not entail substantial variations (d'Andria *et al.*, 2004; Michelakis *et al.*, 1995; Alegre, 2001). This may not be confirmed in environments with severe water deficit.

Variations in the acid composition, with an increase in polyunsaturated acids (linoleic and linolenic), give rise preferentially to oxidation processes, reducing product shelf-life and causing organoleptic defects (Solinas, 1990). Salas *et al.* (1997) in low rainfall years report that the content of oleic acid and other monounsaturated acids of the cv. Picual was higher in the rain-fed treatment. By contrast, in central and southern Italy, in trials conducted on various cultivars, the acid composition was not changed by irrigation volumes (Patumi *et al.*, 2002; d'Andria *et al.*, 2004). Analyses were conducted on the acid composition of oils produced in the region of Catamarca and Rioja (Argentina), characterised by conditions of high heat stress, also during the ripening phase (over 40°C); recently introduced cultivars in this region were selected from those commonly grown in Mediterranean environments (Ravetti *et al.*, 2000). Results show that some cultivars had similar acid compositions to those found in Mediterranean environments, while others were very different. Moreover, as all olive orchards had been irrigated at 100% of ETC, the authors ascribed this behaviour not only to the considerable diversity in climatic conditions, but also to the peculiarity of cultivars.

Effects of the irrigation level on phenolic substances that, besides having antioxidative properties, affect the organoleptic characteristics of bitterness and pungency making the product unpleasant for consumers are poorly understood. Several authors (Inglese *et al.*, 1996; Ismail *et al.*, 1997) report a reduction in polyphenols under water deficit conditions, while results of other field trials (e.g. Patumi *et al.*, 1999, 2002; Salas *et al.*, 1997) indicate a decline in phenols under fully irrigated condition. Recent studies

(Figure 2) have highlighted that the irrigation volume does not affect all phenolic components in the same way (Patumi *et al.*, 2002) and it has a significant effect on oil organoleptic characteristics (Tovar *et al.*, 2001; Romero *et al.*, 2002). These quality aspects, with particular reference to the irrigation technique require further enquiry, especially in relation to different growing environments.

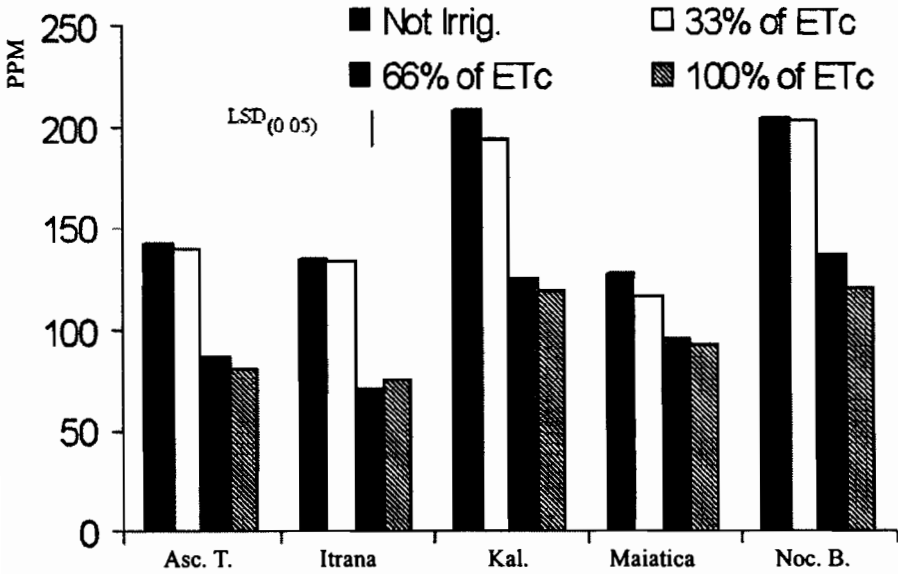


Figure 2. Total polyphenol content (5-year mean) of olive cultivars grown under different watering regimes in southern Italy. T0 = rainfed control; T1, T2, T3 = treatment irrigated with 33, 66, and 100% of ETc. Least significant difference (DMS) at 0.05 level is also reported (From d'Andria *et al.*, 2004)

Organoleptic characteristics of olive oils are not apparently affected negatively by irrigation, while reductions in the intensity of bitterness and pungency were found in several experiments (Magliulo *et al.*, 2003; d'Andria *et al.*, 2004). As such sensations are attributed to the content of polyphenolic substances in the oil, a lesser intensity perceived in irrigated treatments is in line with a lower content (Salas *et al.*, 1997; d'Andria *et al.*, 2004). There is not evidence that the fruity characteristics underwent variation with irrigation, nor did the intensity of olfactory sensation (Patumi *et al.*, 1999; d'Andria *et al.*, 2004).

The interaction of quality characteristics with agronomic techniques and environmental conditions is a complex topic and not well understood. These aspects require further research.

3. SALINITY STRESS

Accumulation of salts in cultivated soils is becoming an extensive problem in those areas subject to irrigation with low quality water. In coastal areas of the Mediterranean

basin, olive plants can experience temporary salinity stress during the dry period of the growing season when irrigation is used to overcome severe drought stress.

Olive is considered medium tolerant to salinity stress (Rugini & Fedeli, 1990), but salinity resistance is a cultivar dependent trait. Tattini *et al.* (1992) highlighted large differences in salt tolerance between Frantoio and Leccino cultivars. Furthermore, Marin *et al.* (1995) analysed the tolerance of 26 olive cultivars to excess (100 mM) NaCl in the growing medium and showed a broad genotypic variability to salt stress as indicated by the wide changes in shoot relative growth rate of salt-treated plants (from 16 to 70%). Chartzoulakis *et al.* (2002) studied the effects of salinity on the growth of six olive cultivars, which showed significant shoot length and leaf area reduction above 25 mM. Total plant leaf area reduction reached 85% at 200 mM NaCl in some cultivars (Mastoidis and Amphissis) due to defoliation. At high salinity the aerial part of the plants was more depressed than the root system. In these experiments the cv. Kalamata showed higher resistance to salinity, followed by Megaritiki and Kothreiki.

The physiological and biochemical responses of olive to salinity stress are quite complex (Gucci & Tattini, 1997). Visible growth inhibition was observed in plants exposed to alternating periods of salinity stress (50, 100, and 200 mM NaCl) and relief cycles (Tattini *et al.*, 1997). Olive underwent growth recovery once salinization was relieved, but the rate of recovery was dependent on the salt level to which plants were exposed. Relief from low (50 mM) or intermediate (100 mM) NaCl treatments enabled a full recovery, which was not obtained in olive plants subjected to more severe NaCl stress (200 mM). Higher photosynthetic rate and stomatal conductance during relief from 50 and 100 mM NaCl treatments in comparison to the control were presumably responsible for the ready recovery of growth.

Plants exposed to salinity stress showed a significant reduction in net CO₂ assimilation and stomatal conductance (Bongi & Loreto, 1989). Assimilation declines were mainly a consequence of stomatal conductance reductions, but at high (200 mM) NaCl concentrations marked effects on carboxylation efficiency and CO₂ compensation point were also observed.

Nevertheless, the effects of salinity stress on gas exchange parameters do not correlate with the cultivar tolerance to salt. Net CO₂ assimilation and stomatal conductance decreased, in fact, more in the salt tolerant cultivar Frantoio than in the salt sensitive one (Leccino) (Tattini *et al.*, 1997). Better correlation was instead found when gas exchange values were recorded during relief. Recently, Loreto *et al.* (2003) have evaluated the photosynthetic limitations in six olive cultivars irrigated with saline (200 mM) water, by gas-exchange and fluorescence field measurements.

The cultivars with inherently high photosynthesis showed the highest photosynthetic reductions and there was no relationship between salt accumulation and photosynthetic reduction in either young or old leaves. They concluded that photosynthetic sensitivity to salt did not depend on salt exclusion or compartmentalization in the old leaves of the olive cultivars investigated.

Significant reductions in water relation parameters, such as pre-dawn water potential (Ψ_w), osmotic potential (Ψ_π) and relative water content (RWC), were observed in Frantoio and Leccino plants exposed to NaCl (100 and 200 mM) (Gucci *et al.*, 1997). The salt-induced decrease in Ψ_w occurred with a decline in Ψ_π , consequently maintaining the turgor potential (Ψ_p) in salinized plants at values comparable to or higher than in control plants.

Olive leaves accumulated both glucose and mannitol during the period of salinity stress (Tattini *et al.*, 1996). Moreover, Gucci *et al.* (1998) showed that salinity stress (100 mM NaCl) induced major changes in partitioning of photosynthetic carbon in fully expanded leaves of Frantoio. In particular, mannitol partitioning increased, while glucose and sucrose partitioning decreased. However, osmotic adjustments in salt stressed olive plants were primarily achieved by accumulation of inorganic ions, despite the osmotic contribution of soluble carbohydrates, and they mainly reflected the different exclusion capacities for Na^+ and Cl^- , which the cultivars naturally possess. Thus salt tolerance in olive seems to be mainly achieved by means of salt exclusion/retention mechanisms at the root level, which makes the plant able of avoiding Na^+ and Cl^- accumulation in actively growing shoots (Tattini & Gucci, 1999).

In the near future, studies on the biochemistry and genetics of these exclusion/retention mechanisms will be necessary to discover the molecular basis of salt tolerance and provide a tool for improving olive resistance against this stress.

4. LOW (FREEZING) TEMPERATURES

Temperatures below zero (freezing temperatures) limit the distribution and the productivity of many plant species in temperate areas. In olive, freezing temperatures become stressful when the cultivation area of this sub-tropical species approaches the climatic limits, which usually occur in northern and central Italian regions and also in other southern zones of Europe. In these areas, temperature drops can approach -10°C in occasionally severe winters and olive survival can be seriously compromised. Furthermore, significant productivity declines can arise also from relatively higher (-7°C) freezing temperatures when leaf drop and twig desiccation can be induced.

Several field and laboratory experiments have been performed with the aim to identify and classify frost resistant olive genotypes. Guerriero *et al.* (1988) identified some Leccino clones with varying frost tolerance in field experiments. Subsequently, La Porta *et al.* (1994) analysed, through ionic leakage techniques, these clones in comparison with the frost sensitive Moraiolo cultivar and confirmed a higher frost resistance for some of them. Bartolozzi & Fontanazza (1999) used visible symptoms, ionic leakage and differential thermal analysis to evaluate the frost resistance of twelve olive cultivars and selections. Differential thermal analysis did not allow any discrimination among the cultivars studied, whereas ionic leakage results indicated Bouteillan and Nostrale di Rigali cultivars as the most tolerant to freezing, while Borsciana seems the least tolerant one. Moreover, visible symptoms confirmed ionic leakage in Bouteillan. More recently, Mancuso (2000) applied electrical resistant

changes to evaluate the freezing resistance of different organs in four olive cultivars and suggested this experimental procedure as a quick, easy and non-destructive monitoring tool.

Although olive cultivars have the genetic potential to tolerate freezing, the degree of resistance in existing genotypes is not enough to ensure an effective protection against severe frost events. To improve olive freezing resistance, the physiological and biochemical mechanisms involved in olive cold acclimation must be studied (Bartolini *et al.*, 1994; Bartolini *et al.*, 1999; Bartolozzi *et al.*, 1999).

Genetically competent plants (perennial and winter annual) acquire freezing tolerance through a process known as cold acclimation that involves a number of biochemical, physiological and genetic changes (Hallgren Oquist, 1990). Cold acclimation begins in autumn when atmospheric temperatures are sub-optimal and the photoperiod becomes short. Sub-lethal freezing temperatures later in the acclimation process may induce a second phase in the acclimation process leading to maximal expression of freezing tolerance. Biochemical changes, such as soluble sugars, sugar alcohols, Krebs cycle acids and fatty acids have been recently followed in olive plants during cold acclimation and freezing stress (Bartolozzi *et al.*, 1999), but simple relationships between such biochemical changes and frost resistance were not found.

Freezing causes injury symptoms in cellular membranes, including increased microviscosity, formation of gel phase domains, degradation of phospholipids, and accumulation of free fatty acids (McKersie, 1991). All these symptoms can be simulated *in vitro* on isolated membranes treated with superoxide radicals. Furthermore, membranes from cold acclimated plants are more tolerant to activated oxygen species than membranes from non-acclimated plants and also the antioxidant pool is often depleted after a freezing stress. These observations led to the hypothesis that these common injury symptoms are the consequence of oxidative stress and that oxidative stress tolerance is an important component of freezing tolerance, which could be improved by the manipulation of the antioxidant defence system. Following this approach, attempts to apply the existing antioxidant enzymes protocols in olive were performed (Scebba & Sebastiani, 2000; Sebastiani *et al.*, 2002). Nevertheless, further studies on the physiology and biochemistry of freezing resistance and on the role of signal transduction (D'Angeli *et al.*, 2003), gene expression and protein synthesis in olive plants during cold acclimation and freezing recovery are necessary.

5. ATMOSPHERIC POLLUTION

Atmospheric pollution is a direct and undesirable effect of human activities. Air pollutants can be defined as those molecules which should not be present at all in clean atmosphere, or which are normally present in clean atmosphere, but due to pollution have reached dangerous concentrations. Energy production processes based on fossil fuels combustion are the mains responsible of pollutants release into atmosphere. In the economic development of humanity, three main pollution periods are present:

- Pre-industrial, with few energy sources (wood burning, hydroelectric, etc.) and low pollution problems;
- Industrial, with high energy requires at low price and high pollution problems in localised industrial and civic areas;
- Post-industrial, with very high energy requires, an increasing ecological concern of the pollution consequence, but with more complex and unpredictable pollution problems (from local areas to global scale) (Allegrini Brocco, 1995).

Structural changes and physiological changes in leaves may be induced by various pollutants, such as SO₂. Olive plants of the cultivars Frantoio and Moraiolo (Giorgielli *et al.*, 1994) (Figure 3) fumigated for five months with a gradient of sulphur dioxide concentrations in the range 0-100 ppb showed no visible injury symptom. However, SO₂ treatment induced significant depression in net CO₂ assimilation, stomatal conductance and transpiration in Frantoio while Moraiolo did not undergo any significant physiological modification. The transpiring surface was dramatically reduced in both cultivars, as well as the total leaf thickness.

During periods of depression of photosynthesis in water-stressed Mediterranean plants in the field, leaves are exposed to high fluxes of photosynthetically-active and UV-B radiation, both of which are potentially damaging for the photosynthetic apparatus. Nogués & Baker (2000) studied the effects of drought on the photosynthetic characteristics of olive exposed to elevated UV-B irradiation (0.47 W m⁻²) in a glasshouse over a period of weeks and found no significant effects on the growth or photosynthetic activities of olive plants, prior to and during the drought treatment. Consequently, it is predicted that increasing UV-B due to future stratospheric ozone depletion is unlikely to have any significant impact on the photosynthetic productivity of olive in the field.

The atmospheric concentration of CO₂ ([CO₂]) of the earth has been increasing from 280 μmol mol⁻¹ prior to the Industrial Revolution to 360 μmol mol⁻¹ at present. The rapid rise in [CO₂], currently proceeding at a rate of 1-2 μmol mol⁻¹ year⁻¹ (Keeling *et al.*, 1995), is expected to lead global [CO₂] to 650-700 μmol mol⁻¹ by the year 2075. The change in [CO₂] is due mainly to the burning of fossil fuels, which is ejecting approximately 5-6 Gt of carbon into the atmosphere annually, and secondarily to deforestation, which may account for another 1-2 Gt of carbon. The climatic consequences of increasing [CO₂] are of concern because CO₂ will be responsible for more than half of the anticipated global warming and «greenhouse effect» over this century. Modern Global Circulation Models (GCMs) predict that a doubling of [CO₂] would increase earth's surface temperature by about 2.5-3.5°C (Manabe Stouffer, 1994).

All these changes have the potential for a great impact (direct on physiology and indirect on biochemistry) on Mediterranean-type vegetation because increased evapotranspiration rates, also affecting plant-insect interaction and nutrient cycling. Although anatomical or morphological and not physiological, stomatal adjustment in the long-term through changes in stomatal number, frequency and/or size may have

equally significant impact on leaf conductance, thus on gas exchange and particularly on water use efficiency of Mediterranean woody plants (Tognetti *et al.*, 2000).

A reduced transpiration in combination with stimulated (or unchanged) photosynthesis would lead to an increase in instantaneous water use efficiency, and this may be the most important effect of stomatal responses to $[\text{CO}_2]$ on the carbon cycle (Amthor, 1995). Olive trees, which frequently experience sub-optimal levels of soil moisture, have developed drought-tolerating strategies that allow plants to endure severe periodic drought. In olive trees, under recurrent multiple disturbances swelling structures at the stem base may play a critical role in the recovery process. Such a major carbon investment in lignotubers may support new growth, buffering disturbances. In general, woody plants are more responsive to elevated $[\text{CO}_2]$ at higher temperatures, under water stress, in the presence of air-borne pollutants, and under nutrient adequacy (Field *et al.*, 1992).

This indicates that regions, which are warm, drought stressed, moderately fertile, like the Mediterranean Basin, should host ecosystems fairly responsive to elevated $[\text{CO}_2]$ (Moreno Oechel, 1995). Areas of a Mediterranean-type climate, characterized by dry summers contrasting with relatively wet and mild winters, are present in five widely disjunctive regions of the world, namely the Mediterranean Basin, California, Chile, South Africa and South-Western and Southern Australia (where olive tree is an emerging tree crop). In olive trees, many anatomical features and physiological mechanisms are clear adaptations to drought conditions and allow some degree of control over water loss (Fernández *et al.*, 1997). Leaf gas exchange and water potential are correlated also in olive (Tognetti *et al.*, 2002).

These correlations indicate progressive changes in leaf conductance over a range of water potentials. The specificity of olive is that despite stomata close invariably with drought, this species has lower absolute values of stomatal conductance and less sensitivity to decreasing water potential than other species (Schulze Hall, 1982), and it is not yet clear which physiological parameter is responsible for this fine regulation.

Differences between olive cultivars in water use efficiency and stomatal characters have been found to disappear in plants subjected to water deficit (Tognetti *et al.*, 2002). Exposure to elevated $[\text{CO}_2]$ of five-year-old plants (cultivars Frantoio and Moraiolo) (Figure 3) grown in large pots enhanced rates of net photosynthesis and decreased stomatal conductance, leading to greater instantaneous transpiration efficiency (Tognetti *et al.*, 2001).

Stomatal density also decreased under elevated $[\text{CO}_2]$, while C_i/C_a ratio and chlorophyll content did not differ, except for the cv. Moraiolo after seven months of exposure to elevated $[\text{CO}_2]$. No significant changes in carboxylation efficiency of Rubisco after five months of exposure to elevated $[\text{CO}_2]$ were observed. There were no apparent treatment differences in daytime respiration, CO_2 compensation point, CO_2 -saturated photosynthesis or photosynthesis at the mean C_i , but there was a reduction in stomatal limitation to photosynthesis at elevated $[\text{CO}_2]$. These 5-year-old olive trees did not exhibit down regulation of leaf-level photosynthesis in their response to elevated $[\text{CO}_2]$,

though some indication of adjustment was evident for the cv. Frantoio with respect to the cv. Moraiolo. Exposure to elevated CO_2 enhanced rates of net photosynthesis and decreased stomatal conductance of one-year-old olive cuttings of the two cultivars (Frantoio and Moraiolo), leading to higher water use efficiency (Sebastiani *et al.*, 2002); this was not translated in increased growth rates (particularly in the cultivar Frantoio, which showed reductions in above ground plant dry mass with respect to the cultivar Moraiolo). Chlorophyll concentrations decreased only in Frantoio leaves of plants grown in elevated CO_2 . Stomatal density and leaf nutrients did not differ between treatments and cultivars. Adjustment to elevated CO_2 was hypothesized for the cultivar Frantoio, which showed strong reductions in leaf area thus counterbalancing increased photosynthetic rates per unit leaf area (but also displayed decreasing stem dry mass). Elevated CO_2 changed dry mass allocation by decreasing the leaf mass ratio, suggesting that canopy-level adjustment in N assimilation may occur in both cultivars. Experimental and modelling work suggests a strong dependence of olive flowering date on spring temperatures (Osborne *et al.*, 2000).

FRANTOIO				
	Visible Symptoms	Photosynthesis	Stomatal conductance	Stomatal density
Ozone	NO	DECREASE	DECREASE	INCREASE
Sulphur dioxide	NO	DECREASE	DECREASE	DECREASE
Carbon dioxide	NO	INCREASE	DECREASE	DECREASE
MORAILOLO				
	Visible Symptoms	Photosynthesis	Stomatal conductance	Stomatal density
Ozone	YES	DECREASE	DECREASE	INCREASE
Sulphur dioxide	NO	STABLE	STABLE	STABLE
Carbon dioxide	NO	INCREASE	DECREASE	DECREASE

Figure 3. Visible symptoms, photosynthesis, stomatal conductance and stomatal density changes in olive plants (cv. Frantoio and Moraiolo) exposed to ozone, sulphur dioxide and carbon dioxide (data redraw from Giorgelli *et al.*, 1994; Minnocci *et al.*, 1999; Tognetti *et al.*, 2001)

Airborne pollen concentrations seem to reflect the flowering phenology of olive populations within a radius of 50 km, thus they could be a sensitive regional indicator of climatic warming. This potential sensitivity was assessed with phenology models fitted to flowering dates inferred from maximum airborne pollen data. Of four models tested by Osborne *et al.* (2000), a thermal time model gave the best fit for Montpellier (France), and was the most effective at the regional scale, providing reasonable predictions for 10 sites in the western Mediterranean. This model was forced with replicated future temperature simulations for the western Mediterranean from a coupled ocean-atmosphere GCM. The GCM temperatures rose by 4.5°C between 1990 and 2099 with a 1% per year increase in greenhouse gases, and modelled flowering date advanced at a rate of 6.2 d per °C. The results indicated that this long-term regional trend in phenology might be statistically significant as early as 2030, but with marked spatial variation in magnitude, with the calculated flowering date between the 1990s and 2030s advancing by 3-23 d.

Stratospheric O₃ has a beneficial role protecting life from radiation damage (UV). On the contrary the O₃ close to the planet's surface (troposphere) displays its destructive side because it is a strong photochemical oxidant. Actually, ground-level ozone is one of the air pollutants of most concern in Europe. In the year 2003, the O₃ concentrations in the lower atmosphere exceeded thresholds established in EU legislation to protect human health and prevent damages to ecosystems, agricultural crops and materials. An analysis of trends over the past 12 years indicates that in the EU the ozone episodes exceeding the information threshold (180 µg/m³) were higher in summer 2003 than in all previous years (EEA, 2003) and harmful ozone concentrations have been frequently observed over Europe (Beck *et al.*, 1998; de Leeuw, 2000; Hjellbrekke & Solberg, 2002). Historical measurements highlighted that tropospheric O₃ concentration at mid to high latitudes has more than doubled during the last century (Stokwell *et al.*, 1997; Volz & Kley, 1988). Elevated O₃ levels are found in urban areas, but *in situ* measurements have revealed that O₃ levels can be unusually high also in rural areas, where crop and forest damages are of concern (Bortier *et al.*, 2000).

Ozone formation in the troposphere requires precursors such as nitrogen oxides (NO_x) and volatile organic compounds (VOCs) and takes place at different space- and timescales: the high emission density of these reactive precursors in urban areas can determine high O₃ concentrations within the city or at short distances downwind. However, O₃ precursors may be transported over distances of hundreds to thousands kilometres, resulting in O₃ formation also in rural sites far from the pollution sources. In these areas, natural levels of NO_x are quite low, and so natural O₃ production is expected to be relatively small, although the high levels of VOCs coming from trees and other vegetation. Human activities, such as fuel combustion in cars and power plants, cause large increases in NO_x. These largely amounts of human-produced NO_x react with the natural and human-made VOCs alike, resulting in unnaturally high O₃ levels also in areas remote from the urban pollution sources. The concentrations of anthropogenic O₃ change significantly with time and geographic location. Elevated ozone levels mainly occur during periods of warm sunny weather. In Mediterranean countries, with prolonged spells of hot and sunny weather during the summer, ozone

can quickly be formed at high concentrations and occur on many days and in the vicinity of urban centres. In the Mediterranean basin, O₃ concentrations (40-100 ppb) exceed the European Union plant protection standard in large areas for several consecutive months (Lorenzini *et al.*, 1994; Glavas, 1999; Skelly *et al.*, 1999) and there is evidence that ambient O₃ concentrations adversely affect Mediterranean crops of high economic value such as horticultural crops (Fumagalli *et al.*, 2001). Following exposure to O₃, the main O₃ entries into plant are the stomata. Stomatal uptake is estimated to be four orders of magnitude larger than that through fractures in the leaf cuticle (Guderian *et al.*, 1985). Plant reactions to increasing O₃ concentrations can be variable and not simply predictable, because the fraction of O₃ effectively entering the plant (absorbed dose) depends on different resistances to O₃ flux into the leaf (aerodynamic, boundary layer, stomatal, etc.). After entering the plant through stomata, O₃ dissolves in the water phase of the apoplast and reacts with several organic molecules, enhancing the production of hydrogen peroxide and other reactive oxygen species. In the cultivars Frantoio and Moraiolo exposed to short-term sub-symptomatic O₃ (150 ppb as single O₃ pulse) levels (Minnocci *et al.*, 1995), significant reductions in stomatal apertures and conductance were observed in O₃ treated samples, supporting the hypothesis that olive plants use mechanisms avoiding O₃ penetration into the internal leaf spaces. Genotypic differences in O₃ sensitivity were also observed. Moraiolo cultivar showed more noticeable O₃ effects than Frantoio. Subsequent long-term (4 months) chronic fumigation trials (Figure 3) with 50 and 100 ppb O₃ levels demonstrated that O₃ specific visible injury symptoms appear at the higher O₃ concentration (100 ppb) after 100 days, as localised necrotic spots, only in leaves of Moraiolo plants. Heavy reductions in transpiring stomatal surface and gas exchange parameters were observed both in Frantoio and Moraiolo (Vitagliano *et al.*, 1999; Minnocci *et al.*, 1999). To understand the possible acclimation strategy, further physiological and biochemical studies were performed on Frantoio and Moraiolo plants subjected to long-term (18 months) O₃ (100 and 50 ppb) treatments. Results confirmed the different physiological and biochemical behaviour of the two studied cultivars (Sebastiani *et al.*, 2002) and showed a lower growth reduction in Frantoio, which also maintained a higher capacity for recovery (Minnocci *et al.*, *personal communication*). Such results confirm the previously observed greater O₃ sensitivity of Moraiolo, which is probably caused by the lower capability of Moraiolo leaves to avoid O₃ uptake during fumigation (Minnocci *et al.*, 1995, 1999). Significant growth reduction was also induced by O₃ exposure (61 ppb of mean O₃ concentration) in one-year-old olive seedlings of the var. *sylvestris*, although visible symptoms did not develop (Inclan *et al.*, 1999). All these results suggested that in the Mediterranean area, where olive plants are widely cultivated and O₃ is present for several months of the year, this pollutant might significantly interfere with olive productivity.

6. CONCLUDING REMARKS

In the last decades several research activities on olive physiology and biochemistry under environmental stresses have been performed. New research fields, such as those on environmental pollution, have revealed important areas of investigation. These studies pointed out to several physiological mechanisms involved in plant resistance

to environmental injuries and highlighted wide genotypic variability. However, more emphasis should be devoted to clarify the cellular and molecular basis of the resistance, with the aim to provide tools for improving olive resilience to environmental stresses. In the future, it will be important to examine the interaction between different stresses. Land use changes, climatic changes and salinity stress at Mediterranean latitudes will, in fact, expose olive plants to several and concurrent environmental constraints. In most countries, irrigation in olive orchards is essentially based on empiricism and direct experience. In order to improve water saving and water use, irrigation strategies must be based on two fundamental aspects: the choice of proper irrigation scheduling and the preference of sagacious water distribution. Further research is needed to understand the complex interaction between agricultural practices, quality aspects and environmental conditions.

7. LITERATURE CITED

- Alegre Castellvi S. (2001) Efecto de diferentes estrategias de riego deficitario controlado durante la época estival sobre la producción del olivo (*Olea europaea* L.) cv. Arbequina. PhD Thesis Univ. of Lleida, Spain
- Allegrini I. & Brocco D. (1995) The historical development of atmospheric pollution and its effects in Italy, pp. 11-12. In: Lorenzini G. & G.F. Soldatini (eds.) Responses of plants to air pollution. Special Volume of *Agricoltura Mediterranea*, Pacini Editore, Pisa, 415 p.
- Amthor J.S. (1995) Terrestrial higher-plant response to increasing atmospheric [CO₂] in relation to the global carbon cycle. *Global Change Biol.* 1: 243-274
- Angelopoulos K., Dichio B. & Xiloyannis C. (1996) Inhibition of photosynthesis in olive trees (*Olea europaea* L.) during water stress and rewatering. *J. Exp. Bot.* 47: 1093-1100
- Bartolini G., Di Monte G., Rea E. & Toponi M.A. (1999) Protein patterns in response to cold stress on clones *Olea europaea* L. cv Leccino. *Acta Hort.* 474: 481-484
- Bartolini G., Petruccelli R., Toponi M.A. & Di Monte G. (1994) Morphological and biochemical evaluation of *Olea europaea* L. cv Leccino. *Acta Hort.* 356: 78-81
- Bartolozzi F. & Fontanazza G. (1999) Assessment of frost tolerance in olive (*Olea europaea* L.). *Sci. Hort.* 81: 309-319
- Bartolozzi F., Rocchi P., Camerini F. & Fontanazza G. (1999) Changes of biochemical parameters in olive (*Olea europaea* L.) leaves during an entire vegetative season and their correlation with frost resistance. *Acta Hort.* 474: 435-440
- Beck J. P., Krzyzanowski M. & Koffi B. (1998) Tropospheric ozone in the EU - The consolidated report, EEA Topic report No 8/1998, European Environment Agency, Copenhagen
- Bongi G. & Loreto F. (1989) Gas-exchange properties of salt stressed olive (*Olea europaea* L.) leaves. *Plant Physiol.* 90: 1408-1416
- Bongi G. & Palliotti A. (1994) Olive. In: Handbook of environmental physiology of fruit crops. Vol. I Temperature Crops. Schaffe B. & Andersen P.C. Eds. CRC Press Inc., Boca Raton Florida USA pp. 165-187
- Bortier K., Ceulemans R. & Temmerman L. (2000) Effects of tropospheric ozone on woody plants, pp. 153-182. In: Agrawal S.B. & M. Agrawal (eds.) Environmental pollution and plant responses Lewis Publishers, Boca Raton, Florida, pp. 393

- Celano G., Dichio B., Montanaro G., Nuzzo V., Palese A.M. & Xiloyannis C. (1999) Distribution of dry matter and amount of mineral elements in irrigated and non-irrigated olive trees. *Acta Hort.* 474: 381-384
- Chartzoulakis K., Loupassaki M., Bertaki M. & Androulakis I. (2002) Effects of NaCl salinity on growth, ion content and CO₂ assimilation rate of six olive cultivars. *Sci. Horti.* 96: 235-247
- d'Andria R., Morelli G., Patumi M. & Fontanazza G. (2000) Irrigation regime affects yield and oil quality of olive trees. *Acta Hort.* 586: 273-276
- d'Andria R., Lavini A., Morelli G., Patumi M., Terenziani S., Calandrelli D. & Fragnito F. (2004) Effect of water regime on five pickling and double aptitude olive cultivars (*Olea europaea* L.). *J. Hort. Sci. Biotech.* 78: 15-23
- D'Angeli S., Malho R. & Altamura M.M. (2003) Low-temperature sensing in olive tree: calcium signalling and cold acclimation. *Plant Sci.* 165: 1303-1313
- de Leeuw F. (2000) Trends in ground-level ozone concentrations in the European Union. *Environ. Sci. Policy* 3: 189-199
- Dichio B., Xiloyannis C., Angelopoulos K., Nuzzo V., Bufo S.A. & Celano G. (2003) Drought-induced variations of water relations parameters in *Olea europaea*. *Plant Soil* 257: 381-389
- European Environment Agency (2003) Air pollution by ozone in Europe in summer 2003, 33 p.
- Fernandez J.E., Moreno F., Giron I.F. & Blazquez O.M. (1997) Stomatal control of water use in olive tree leaves. *Plant Soil* 190: 179-192
- Field C.B., Chapin Iii F.S., Matson P.A. & Mooney H.A. (1992) Responses of terrestrial ecosystems to the changing atmosphere: a resource-based approach. *Annual Rev. Ecol. System.* 23: 201-235
- Fumagalli I., Gimeno B.S., Velissariou D., De Temmerman L. & Mills G. (2001) Evidence of ozone-induced adverse effects on crops in the Mediterranean region. *Atmosph. Environ.* 35: 2583-2587
- Giorgelli F., Lorenzini G., Minnocci A., Panicucci A. & Vitagliano C. (1994) Effects of long-term SO₂ pollution on olive-trees. *Acta Hort.* 356: 185-188
- Giorio P., Sorrentino G. & d'Andria R. (1999) Stomatal behaviour, leaf water status and photosynthetic response in field-grown olive trees under water deficit. *Environ. Exp. Bot.* 42: 95-104
- Glavas S. (1999) Surface ozone and NO_x concentrations at a high altitude Mediterranean site, Greece. *Atmosph. Environ.* 33: 3813-3820
- Gucci R. & Tattini M. (1997) Salinity tolerance in olive. *Hort. Rev.* 21: 177-214
- Gucci R., Lombardini L. & Tattini M. (1997) Analysis of leaf water relations in leaves of two olive (*Olea europaea*) cultivars differing in tolerance to salinity. *Tree Physiol.* 17: 13-21
- Gucci R., Moing A., Gravano E. & Gaudillere J.P. (1998) Partitioning of photosynthetic carbohydrates in leaves of salt-stressed olive plants. *Aus. J. Plant Physiol.* 25: 571-579

- Guderian R., Tingey D.T. & Rabe R. (1985) Effects of photochemical oxidant in plants. *In*: Guderian R. (ed.) Air pollution by photochemical oxidant. Ecological Studies 52. Springer, Berlin. pp. 127-346
- Guerriero R., Vitagliano C., Bartolini S. & Andreoni N. (1988) La selezione clonale della cultivar "Leccino": osservazioni su 31 presunti cloni nel campo di comparazione della Maremma Toscana. Atti del Convegno Olive da Tavola, Ascoli Piceno, pp. 139-152
- Hallgren J.E. & Oquist G. (1990) Adaptations to low temperatures. *In*: Stress responses in plants: adaptation and acclimation mechanisms. Alscher R.G. & Cumming J.R. Eds. Wiley-Liss. N.Y. pp. 265-293
- Hjellbrekke A. & Solberg G. (2002) Ozone measurements 2000. EMEP/CCC Report 5/2002
- Inclan R., Ribas A., Peñuelas J. & Gimeno B.S. (1999) The relative sensitivity of different Mediterranean plant species to ozone exposure. *Water Air Soil Pollution* 116: 273-277
- Inglese P., Barone E. & Gullo G. (1996) The effect of complementary irrigation on fruit growth ripening pattern and oil characteristics of olive (*Olea europaea* L. cv Carolea). *J. Hort. Sci.* 71: 257-263
- Ismail A.S., Stavroulakis G. & Metzidakis J. (1997) Effect of irrigation on the quality characteristics of organic olive oil. *Acta Hort.* 474: 687-690
- Keeling C.D., Whorf T.P., Whalen M. & Van Der Plicht J. (1995) Interannual extremes in the rate of rise of atmospheric carbon dioxide since 1980. *Nature* 375: 666-670
- La Porta N., Zacchini M., Bartolini S., Viti R. & Roselli G. (1994) The frost hardiness of some clones of olive cv. Leccino. *J. Hort. Sci.* 69: 433-435
- Lorenzini G., Nali C. & Panicucci A. (1994) Surface ozone in Pisa (Italy): a six-year study. *Atmosph. Environ.* 28: 3155-3164
- Loreto F., Centritto M. & Chartzoulakis K. (2003) Photosynthetic limitations in olive cultivars with different sensitivity to salt stress. *Plant Cell Environ.* 26: 595-601
- Magliulo V., d'Andria R., Lavini A., Morelli G. & Patumi M. (2003) Yield and quality of two rainfed olive cultivars following shifting to irrigation. *J. Hort. Science Biotech.* 78: 15-23
- Manabe S. & Stouffer R.J. (1994) Multiple-century response of a coupled ocean-atmosphere model to an increase of atmospheric carbon dioxide. *Journal Climate* 7: 5-23
- Mancuso S. (2000) Electrical resistant changes during exposure to low temperature measure chilling and freezing tolerance in olive tree (*Olea europaea* L.) plants. *Plant Cell Environ* 23: 291-299
- Marin L., Benlloch M. & Fernandez-Escobar R. (1995) Screening of olive cultivars for salt tolerance. *Sci. Hort.* 64: 113-116
- McKersie B.D. (1991) The role of oxygen free radicals in mediating freezing and desiccation stress in plants. pp.107-118. *In*: Active Oxygen/Oxidative Stress and Plant Metabolism. Pell E. & Steffen K. Eds. *Am. Soc. Plant Physiol.*
- Michelakis N., Vouyoukalou E. & Clapaki G. (1995) Plant growth and yield response of olive tree cv. Kalamon, for different levels of soil water potential and methods of irrigation. *Adv. Hort. Sci.* 9: 136-139

- Minnocci A., Panicucci A. & Vitagliano C. (1995) Gas exchange and morphological stomatal parameters in olive plants exposed to ozone. In: Responses of plants to air pollution. Lorenzini G. & Soldatini G.F. Eds. Pacini Editore, Pisa, Italy. pp. 77-81
- Minnocci A., Panicucci A., Sebastiani L., Lorenzini G. & Vitagliano C. (1999) Physiological and morphological responses of olive plants to ozone exposure during a growing season. *Tree Physiol.* 19: 391-397
- Moreno J.M., Oechel W.C. Eds. (1995) Global Change Mediterranean-Type Ecosystems. Ecological Studies vol 117. Berlin, Germany: Springer-Verlag, 527 p.
- Moreno F., Fernandez J.E., Clothier B.E. & Green S.R. (1996) Transpiration and root water uptake by olive trees. *Plant Soil* 184: 85-96
- Nogués S. & Baker N.R. (2000) Effects of drought on photosynthesis in Mediterranean plants under enhanced UV-B radiation. *J. Exp. Bot.* 51: 1309-1317
- Osborne C.P., Chuine I., Viner D. & Woodward F.I. (2000) Olive phenology as a sensitive indicator of future climatic warming in the Mediterranean. *Plant Cell Environ.* 23: 701-710
- Patumi M., d'Andria R., Marsilio V., Fontanazza G., Morelli G. & Lanza B. (2002) Olive and Olive oil quality after intensive monocone olive growing (*Olea europaea* L., cv. Kalamata) in different irrigation regimes. *Food Chem.* 77: 27-34
- Patumi M., d'Andria R., Fontanazza G., Morelli G., Giorio P. & Sorrentino G. (1999) Yield quality traits of three intensively trained olive trees cv. under different irrigation regimes. *J. Hort. Sci. Biotech.* 74: 729-737
- Rapoport H.F., Costagli G. & Gucci R. (2004) The effect of water deficit during early fruit development on olive fruit morphogenesis. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 129: 121-127
- Ravetti L. M., Matias A. C., Patumi M., Rocchi P. & Fonyanazza G. (2000) Characterization of virgin oil from Catamarca and Rioja, Argentina. General characteristics. *Acta Hort.* 586: 603-606
- Rhizopoulou S. & Meletiου-Christou Diamantoglou S. (1991) Water relation for sun and shade leaves of four Mediterranean evergreen sclerophylls. *J. Exp. Bot.* 42: 627-635
- Romero M., Tovar M.J., Girona J. & Moltiva M.J. (2002) Changes in the HPLC phenolic of virgin olive oil from young trees (*Olea europaea* L. cv. Arbequina) grown under different deficit irrigation strategies. *J. Agric. Food Chem.* 50: 5349-5354
- Rugini E. & Fedeli E. (1990) Olive as an oilseed crop. In: Biotechnology in Agriculture and Forestry. Legumes and Oil-seed Crops. Bajaj Y.P.S. Ed. Springer-Verlag, Berlin.
- Salas J., Pastor M., Castro J. & Vega V. (1997) Influencia del riego sobre la composición y características organolépticas del aceite de oliva. *Grasas y Aceitas* 48(2): 74-82
- Scebba F. & Sebastiani L. (2000) Antioxidant enzymes in olive tree: methodological aspects. *Atti V Giornate Scietifiche SOI, Sirmione*, pp. 343-344
- Schulze E.D. & Hall A.E. (1982) Stomatal responses, water loss and CO₂ assimilation rates of plants in contrasting environments. In: Lange O.L., Nobel P.S., Osmond C.B., Ziegler H. (Eds) Physiological Plant Ecology II - Water Relations Carbon Assimilation, New Series Vol. 12B. Springer-Verlag, Berlin, pp. 181-230

- Sebastiani L., Minnocci A. & Tognetti R. (2002) Genotypic differences in the response to elevated CO₂ concentration of one-year-old cuttings (*Olea europaea* L. cv Frantoio and Moraiolo). *Plant Biosystems* 136: 199-208
- Sebastiani L., Minnocci A., Scebba F., Vitagliano C., Panicucci A. & Lorenzini G. (2002) Physiological and biochemical reactions of olive genotypes during site-relevant ozone exposure. *Acta Hort.* 586: 445-448
- Skelly J.M., Innes J.L., Savage J.E., Snyder K.R., Vanderheyden D., Zhang J. & Sanz M.J. (1999) Observation and confirmation of foliar ozone symptoms of native plant species of Switzerland and southern Spain. *Water Air Soil Pollution* 116: 227-234
- Sofo A., Dichio B., Xiloyannis C. & Masia A. (2004a) Effects of different irradiance levels on some antioxidant enzymes and on malondialdehyde content during rewatering in olive tree. *Plant Sci.* 166: 293-302
- Sofo A., Dichio B., Xiloyannis C. & Masia A. (2004b) Lipoxygenase activity and proline accumulation in leaves and roots of olive trees in response to drought stress. *Physiologia Plantarum* 121: 58-65
- Solinas M. (1990) Olive oil quality and its determining factors, In: Proceedings of Problems on Olive Oil Quality Congress, Sassari, Italy, pp. 23-55
- Stockwell W.R., Kramm G., Scheel H.E., Mohnen V.A. & Seiler W. (1997) Ozone formation, destruction and exposure in Europe and the United States. In: Sanderman H., Wellburn H. & R.L. Heath (eds.) Forest decline and ozone. Springer Verlag, Berlin, pp. 400
- Tattini M. & Gucci R. (1999) Ionic relations and osmotic adjustment in olive plants under salinity stress. *Physiol. Plant.* 95: 203-210
- Tattini M., Bertoni P. & Caselli S. (1992) Genotypic responses of olive plants to sodium chloride. *J. Plant Nutrition* 15: 1467-1485
- Tattini M., Gucci R., Romani A., Baldi A. & Everard J.D. (1996) Changes in non-structural carbohydrates in olive (*Olea europaea*) leaves during root zone salinity stress. *Physiol. Plant.* 98: 117-124
- Tattini M., Lombardini L. & Gucci R. (1997) The effect of NaCl stress and relief on gas exchange properties of two olive cultivars differing in tolerance to salinity. *Plant Soil* 197: 87-93
- Tognetti R., Costagli G., Minnocci A. & Gucci R. (2002) Stomatal behaviour and water use efficiency in two cultivars of *Olea europaea* L. *Agr. Med.* 132: 90-97
- Tognetti R., Minnocci A., Peñuelas J., Raschi A. & Jones M.B. (2000) Comparative field water relations of three shrub species co-occurring at a natural CO₂ vent. *J. Exp. Bot.* 51: 1135-1146
- Tognetti R., Sebastiani L., Vitagliano C., Raschi A. & Minnocci A. (2001) Responses of two olive tree (*Olea europaea* L.) cultivars to elevated CO₂ concentration in the field. *Photosynthetica* 39: 403-410
- Tognetti R., d'Andria R., Morelli G., Calandrelli D. & Fragnito F. (2004) Irrigation effects on daily and seasonal variations of trunk sap flow and leaf water relations in olive trees. *Plant Soil* 263: 249-264

- Tovar M. J., Moltiva M. J. & Romero M. (2001) Changes in the phenolic composition of virgin oil from young trees (*Olea europaea* L. cv. Arbequina) grown under linear irrigation strategies. *J. Agric. Food Chem.* 49: 5502-5508
- Vitagliano C., Minnocci A., Sebastiani L., Panicucci A. & Lorenzini G. (1999) Physiological response of two olive genotypes to gaseous pollutants. *Acta Hort.* 474: 431-434
- Volz A. & Kley D. (1988) Evaluation of the Montsouris series of ozone measurements made in the nineteenth century. *Nature* 332: 240-242
- Xiloyannis C., Dichio B., Nuzzo V. & Celano G. (1999) Defence strategies of olive against water stress. *Acta Hort.* 474: 423-426.

Olive (*Olea europaea* L.) responses to environmental constraints in Mediterranean agroecosystems

Olive (*Olea europaea* L.) is an evergreen tree and is one of the most important tree crops in Mediterranean agroecosystems. Although olive is well adapted to the Mediterranean environment several stress factors restrict its growth. Therefore, olive productivity at the end of the growing season expresses only a fraction of the plant's genetic potential. Drought, salinity, unfavourable temperature, and irradiance are some of the natural environmental constraints that make the Mediterranean environment vulnerable in terms of sustainability for agricultural systems. In the last decades, human activities have increased the number of environmental constrictions that plants have to withstand. Modification of agricultural systems, changes in land use and increasing air pollution have been added to traditional problems, accruing detrimental conditions to olive plantations. For such reasons, valuable agronomic and genetic solutions should be adopted in the next future to maintain olive productivity and quality standard, as being seriously threatened by the interaction between naturally occurring environmental stresses and human-induced global changes. Several researches have investigated the physiological and molecular processes of stress injury development and the mechanism enabling olive adaptation and acclimation. Insights on the physiological and biochemical processes, which enable olive adaptation and acclimation to drought, salinity and atmospheric pollutants, were the aims of our research work. In this paper, we focus on future scenarios at Mediterranean latitudes resulting from global change, and on the current knowledge of the response of olive trees to environmental stresses.

Keywords: *Olea europaea* - Freezing temperature - Water deficit - Salinity - Atmospheric pollutants - Stress

Activité photosynthétique, fluorescence chlorophyllienne et relation hydrique chez l'olivier (*Olea europaea* L.) cvs. *Chemlali* et *Chetoui* durant un stress hydrique

Mohamed Faouzi KASRAOUI ¹⁰, Faouzi ATTIA ², Mounir DENDEN ¹, Mohamed BRAHAM ³, Hechmi MEHRI ¹, Thierry LAMAZE ⁴ & Marc GARCIA ²

¹ Département de Productions Horticoles, Laboratoire d'Arboricultures Fruitières, École Supérieure d'Horticulture et d'Élevage de Chott-Mariem, Sousse, Tunisie

² École Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse, Avenue de l'Agrobiopôle, BP 107 Auzeville Tolosan 31326, France

³ Institut de l'Olivier, Station Régionale de Sousse. BP 40 Ibn Khaldoun, Sousse, Tunisie

⁴ Centre d'Études Spatiales de la Biosphère, 18 Avenue Ed. Belin bpi 2801; 31401 Toulouse, France

⁰ Auteur correspondant, courriel: mohamed_fatn@yahoo.fr

1. INTRODUCTION

Dans le monde, pratiquement 40% des terres cultivées sont touchées chaque année par la sécheresse, ce qui réduit considérablement le rendement des cultures (Khaldoun *et al.*, 1990). L'état de déficit hydrique se caractérise par une chute du contenu en eau dans les tissus végétaux, du potentiel hydrique total et du potentiel osmotique accompagné par la perte de turgescence et la fermeture des stomates (Braham, 1997). La baisse de la photosynthèse entraîne un ralentissement général des processus enzymatiques chez les végétaux d'où une croissance ralentie. La contrainte hydrique sévère induit une réduction drastique de la photosynthèse et une perturbation de nombreux processus physiologiques et métaboliques (Büßis *et al.*, 1998).

Sous climat aride, la plante doit maintenir un équilibre dynamique entre l'ouverture et la fermeture des stomates, d'une part pour accroître la fixation du carbone et pour permettre la transpiration évitant ainsi l'échauffement de la plante, et d'autre part pour réduire les pertes en eau (Jagtap, 1998). Il en résulte une régulation stomatique ayant une grande influence sur l'activité photosynthétique. La dessiccation du sol provoque une réduction de la photosynthèse nette (Katerji & Daudet, 1986; Li *et al.*, 1990a, b; Chaves, 1991; Pereira & Chaves, 1993; Hoffmann *et al.*, 2001; Garg *et al.*, 2001).

En régions méditerranéennes, la sécheresse est chronique, il en résulte une diminution de la photosynthèse et une hétérogénéité du taux photosynthétique des feuilles. Le taux photosynthétique maximum (A_{max}) décroît avec le potentiel hydrique ainsi qu'une restriction de la fixation du CO₂ par le mésophylle (De Almeida & Maestri, 1997;

Peng & Rabe, 1998). Certaines conditions de stress hydrique sévère, provoquent une diminution significative mais réversible de la fixation du dioxyde de carbone photosynthétique due à une inhibition des enzymes du cycle de Calvin (Cornic *et al.*, 1992).

La diminution du taux d'assimilation du CO₂ dans les feuilles est associée à une inhibition de la photosynthèse ce qui provoque une augmentation de la dissipation de l'énergie d'excitation du photosystème II (PSII) entraînant des photo-endommagements des centres réactionnels du PSII (Ortiz-Lopez *et al.*, 1990; Andrews *et al.*, 1995; Fryer *et al.*, 1995; Haldimann *et al.*, 1996; Fryer *et al.*, 1998). Un manque d'eau sévère provoque une diminution inférieure à 20% du FPSII (Pankovi *et al.*, 1999). Chez l'olivier, la fluorescence chlorophyllienne augmente à midi et spécialement sous conditions de contrainte hydrique (Angelopoulos *et al.*, 1996).

La connaissance parfaite de la réaction de la plante face aux conditions hydriques est nécessaire pour tester son adaptabilité, rationaliser les interventions et sélectionner les variétés. Dans ce contexte, le présent travail se propose d'étudier le comportement photosynthétique et la fluorescence chlorophyllienne de deux variétés tunisiennes d'olivier à huile sous stress hydrique.

2. MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1. Matériel végétal et milieu de culture

L'expérimentation a été menée sous serre vitrée installée au complexe de l'Institut National Polytechnique de Toulouse à l'École Nationale Supérieure Agronomique (France). La serre est équipée d'un système électronique informatisé contrôlant les conditions microclimatiques. La température est réglée à 25°C, l'humidité relative de l'air est maintenue à 50%, l'éclairement dans la serre est fixé à un PAR = 500 $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$. La photopériode est programmée à 14^h jour / 10^h nuit.

L'essai a été réalisé en culture hydroponique pour les deux variétés d'olivier à huile (*Olea europaea* L.) cvs *Chetoui* & *Chemlali*. Les plants d'oliviers sont issus de boutures herbacées et âgées de 18 mois. Les boutures ont été enracinées sous nébulisation (à la station de Bejaoua, Tunisie). Après habillage des racines, les plants d'olivier sont placés dans des pots en plastique d'une contenance de cinq litres. Chacune des deux variétés a reçu une solution nutritive standardisée et équilibrée dont la composition est la suivante: en macro-éléments (en méq/l) (NO₃⁻: 23,96; SO₄²⁻: 11,09; H₂PO₄⁻: 4,93; K⁺: 18,62; Ca²⁺: 10,27 et Mg²⁺: 11,09) et en micro-éléments (en mg/l): (Fe: 5,7; Mn: 0,5; Zn: 0,06; Cu: 0,03; B: 0,54 et Mo: 0,186).

Pour notre essai, on a appliqué le dispositif expérimental aléatoire complètement randomisé avec quatre répétitions. Au cours de cette expérimentation, on a entrepris trois traitements: le témoin, le niveau 1 de stress à - 0,25 MPa et le niveau 2 de stress à - 0,50 MPa. L'induction du déficit hydrique est réalisée par adjonction d'une quantité de Polyéthylène glycol (PEG 10000) à la solution nutritive selon Bogaert (1990).

2.2. Méthodes de mesure

2.2.1. Potentiel hydrique foliaire de base

L'indicateur actuellement employé pour le diagnostique de l'état hydrique est le potentiel hydrique foliaire de base (Ψ_{Hb}). Ce paramètre représente la force avec laquelle l'eau est retenue dans la plante. Le potentiel hydrique foliaire de base (Ψ_{Hb}) est mesuré tous les cinq jours moyennant une chambre à pression (Scholander *et al.*, 1965).

2.2.2. Assimilation photosynthétique

Les mesures d'assimilation nette (A_n) sont effectuées grâce à un analyseur à gaz infrarouge (IRGA) de type CIRAS 1-PP Systems (Combined Infra-Red Gaz Analyser de PP Systems). Le principe de la mesure est basé sur l'absorption du rayonnement infrarouge par le CO_2 et le H_2O . Les mesures de l'assimilation photosynthétique nette sont effectuées tous les cinq jours et sur trois feuilles sélectionnées dans chaque traitement et pour chaque variété.

2.2.3. Fluorescence chlorophyllienne

Lorsqu'une feuille est mise à l'obscurité, le système photosynthétique se met au repos après quelques minutes. Si cette feuille est exposée à un flash lumineux, le système photosynthétique répond par un signal de fluorescence comportant deux phases: une phase d'augmentation très rapide de l'intensité de fluorescence d'une valeur initiale F_0 à une valeur maximale F_m . Une deuxième phase lente et descendante de l'intensité vers un état stationnaire F_s .

Dans les conditions ambiantes et en présence de la lumière, les centres réactionnels des photosystèmes sont fermés. Pour déterminer les niveaux d'excitation de ces photosystèmes, on mesure la fluorescence chlorophyllienne sous une lumière actinique. Cette étape permet d'obtenir les niveaux d'excitation minimale et maximale dont les valeurs correspondant sont F_s (fluorescence stationnaire) et F_m' (fluorescence maximale en présence de la lumière).

Dans le but de déterminer le quenching photochimique, la détermination du niveau d'excitation du système photosynthétique après une minute d'obscurité est nécessaire. Pour cela, on place le clip sur la surface de la feuille pour permettre à la feuille de s'adapter à l'obscurité. Après une minute, on excite la feuille par des photons et on mesure la fluorescence. La valeur de cette fluorescence est notée F_0' . Après avoir mesuré tous les niveaux d'excitation (F_0 , F_m , F_s , F_m' et F_0'), on a déterminé les paramètres suivants:

- Rendement photosynthétique du PSII: $\Phi_{PSII} = (F_m' - F_s) / F_m'$
- Rendement photosynthétique maximal du PSII: $\max_{PSII} = (F_m - F_0) / F_m$
- Taux de transfert des électrons: $JT = \Phi_{PSII} * PAR * 0,5 * 0,8$
- Et quenching photochimique: $qP = (F_m' - F_s) / (F_m' - F_0')$

Les mesures de la fluorescence chlorophyllienne ont été réalisées à une fréquence de sept jours. Pour chaque traitement, on a effectué quatre répétitions. Tout le long de l'essai, les mesures de la fluorescence ont été faites sur les mêmes feuilles moyennant un fluorimètre du type *Hansatech FMS2*.

2.3. Analyses statistiques

Les données ont été traitées, par le logiciel Sigma Statistical Software® (Stat32.exe) Version 2.0, par l'analyse de la variance à un facteur (ANOVA one way) et l'analyse de la comparaison des moyennes par la méthode SNK (Student-Newman-Keuls).

3. RÉSULTATS ET DISCUSSION

3.1. Evolution du potentiel hydrique foliaire de base

Chez la variété *Chemlali* on a enregistré des potentiels hydriques foliaires (Ψ_{Hb}) variant entre -1,32 MPa avant l'installation du déficit hydrique et -1,60 MPa après 25 jours du premier niveau du stress hydrique (CM1). Alors que pour le déficit du second degré (CM2), le Ψ_{Hb} a varié entre -1,34 MPa avant le déficit hydrique et -2,20 MPa après 25 jours de traitement.

Au cours de l'essai, on a remarqué une baisse du potentiel hydrique foliaire de 21% pour CM1 et de 65% pour CM2. Les différences observées entre les traitements sont significatives au seuil $\alpha = 0,05$.

Pour la variété *Chetoui*, le potentiel hydrique foliaire avant l'installation de la contrainte hydrique était de l'ordre de -1,70 MPa. Après avoir marqué une diminution significative, le Ψ_{Hb} du CT1 était de -1,68 MPa avant et de -2,19 MPa après 25 jours de stress. En effet, le Ψ'_{Hb} du CT2 était de -1,69 MPa. Après 25 jours de stress, la valeur atteinte enregistrée est de -2,47 MPa. À partir du 10^{ème} jour du déficit hydrique, les différences entre les traitements sont significatives au seuil $\alpha = 0,05$.

Pour répondre à un manque d'eau dans la zone racinaire, les plantes réagissent par un abaissement du potentiel hydrique graduel des feuilles permettant l'absorption de l'eau (Figure 1). Le mécanisme diffère selon les espèces et les variétés au cours des périodes de contrainte hydrique (Huang *et al.*, 2000; Jonsen *et al.*, 2000). Braham (1997) rapporte que l'olivier abaisse son potentiel hydrique afin de surmonter une période de stress hydrique. Chartzoulakis *et al.*, (1999) ont trouvé chez des oliviers stressés une diminution du potentiel hydrique allant jusqu'au -5MPa.

3.2. Évolution de l'assimilation photosynthétique nette (An)

Au niveau de la variété *Chemlali*, les moyennes de l'assimilation photosynthétique nette du témoin sont comprises dans l'intervalle [1,5 - 2,0] $\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Alors que pour la variété *Chetoui*, l'assimilation photosynthétique nette du témoin est comprise dans l'intervalle [2,0 - 3,5] $\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

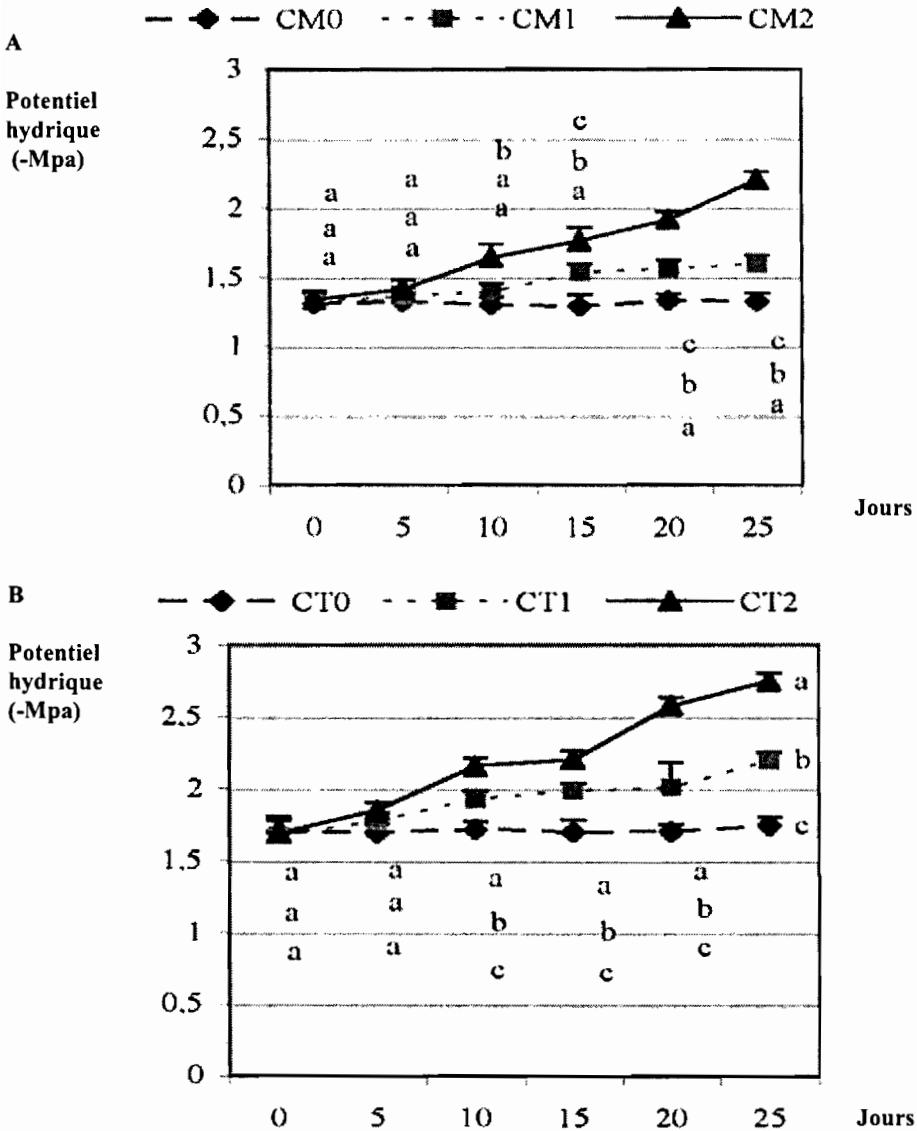


Figure 1. Évolution du potentiel hydrique chez les variétés Chemlali (A) et Chetoui (B)

Pour la variété *Chemlali*, au niveau du stress du 1^{er} degré (CM1), l'assimilation photosynthétique nette a subi une réduction progressive en fonction du temps. Lors de l'installation de la contrainte hydrique, l'assimilation photosynthétique est passée à $0,59 \mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ et après 21 jours de traitement, elle a chuté de 68%.

Au niveau du 2^{ème} traitement, pour la *Chemlali*, il s'est produit une diminution de 71%, ainsi l'assimilation a varié de $1,67 \mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ avant l'installation de la

contrainte hydrique pour atteindre une valeur de $0,48 \mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ à la fin de l'essai. Les différences observées sont significatives au seuil $\alpha = 0,05$ (Figure 2).

Chez la variété *Chetoui*, au niveau du traitement CT1, l'assimilation photosynthétique nette a baissé à partir de la deuxième semaine. Elle est passée de $3,10 \mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ à $1,47 \mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ après 21 jours. Au niveau du traitement CT2, une diminution de 85% est constatée. Avant l'installation de la contrainte hydrique, l'assimilation était de l'ordre de $3,67 \mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ et a passé à $0,55 \mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ après 21 jours de contrainte hydrique. Pour les deux niveaux de traitements (CT1 et CT2), les différences entre les valeurs de l'assimilation photosynthétique nette sont significatives au seuil $\alpha = 0,05$ (Figure 2).

Chartzoulakis *et al.* (1999) et Giorio *et al.* (1999) remarquent que l'activité photosynthétique chez l'olivier baisse au cours d'une restriction hydrique prolongée. D'après Natali *et al.* (1991), la photosynthèse est hautement corrélée à la transpiration et à la conductance stomatique. Angelopoulos *et al.* (1996) et Braham (1997) notent que le taux photosynthétique diminue graduellement durant le développement du stress hydrique.

3.3. Évolution du rendement quantique du PSII (Φ_{PSII})

Le Φ_{PSII} du témoin de la variété *Chemlali* est compris dans l'intervalle [0,57 - 0,71], alors que celui de la variété *Chetoui* est plus élevé et est compris dans l'intervalle [0,74 - 0,78].

Chez la variété *Chemlali*, une importante réduction du Φ_{PSII} a été constatée. Au niveau du stress CM1, le Φ_{PSII} a chuté de 58%. Avant l'installation de la contrainte hydrique, le Φ_{PSII} était de l'ordre de 0,73 et il a chuté après 28 jours à 0,31. Pour le traitement CM2, le Φ_{PSII} a été réduit de 80%. Le rendement était de 0,74 avant le stress et a atteint après 28 jours de contrainte une valeur de 0,15. Cette variation de Φ_{PSII} est significative au seuil $\alpha = 0,05$ (Figure 3A). Chez la variété *Chetoui*, le Φ_{PSII} pour le traitement CT1 a varié de 0,74 avant le stress à 0,63 à la fin de l'essai. Pour CT2, le Φ_{PSII} a diminué significativement de 21% (Figure 3B).

Pour les deux variétés, le stress hydrique a causé une diminution importante du rendement quantique du PSII. Toutefois, cette réduction est plus importante chez la variété *Chemlali*. Ce phénomène a été aussi observé par Iacono & Sommer (2000).

3.4. Évolution du rendement quantique maximal du PSII ($\Phi_{\text{max}}\text{PSII}$)

Au niveau du témoin de la variété *Chemlali*, le $\Phi_{\text{max}}\text{PSII}$ est compris dans l'intervalle [0,63 - 0,85] et pour la variété *Chetoui*, le $\Phi_{\text{max}}\text{PSII}$ est d'environ 0,84 (Figure 4). Pour les deux variétés, le déficit hydrique a engendré une augmentation du $\Phi_{\text{max}}\text{PSII}$. Le $\Phi_{\text{max}}\text{PSII}$ de la variété *Chetoui* a enregistré une faible augmentation de 2,20% pour CT1 et de 1,25% pour CT2, alors que pour la variété *Chemlali*, $\Phi_{\text{max}}\text{PSII}$ a augmenté de 10,66% pour CM1 et de 27,69% pour CM2. Le déficit hydrique a entraîné une augmentation plus importante chez la variété *Chemlali* que chez la variété *Chetoui*.

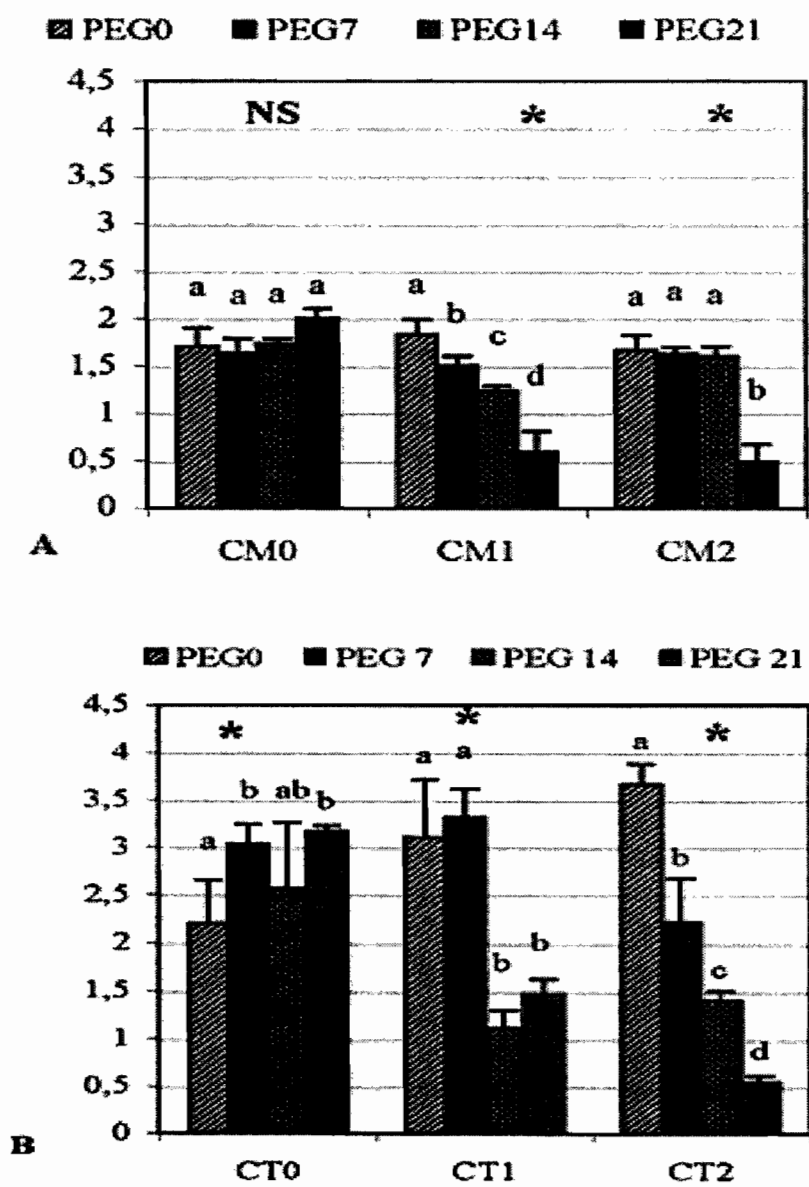


Figure 2. Assimilation photosynthétique nette chez les variétés Chemlali (A) et Chetoui (B)

PEG0: avant traitement par le polyéthylène glycol; PEG7: 7 jours après le traitement; PEG14: 14 jours après le traitement; PEG21: 21 jours après le traitement; PEG28: 28 jours après le traitement. Les différences sont significatives lorsque toutes les lettres (indiquées sur les figures) qui leur correspondent sont différentes ($\alpha = 0,05$). * différences significatives ($\alpha = 0,05$); NS: différence non significative.

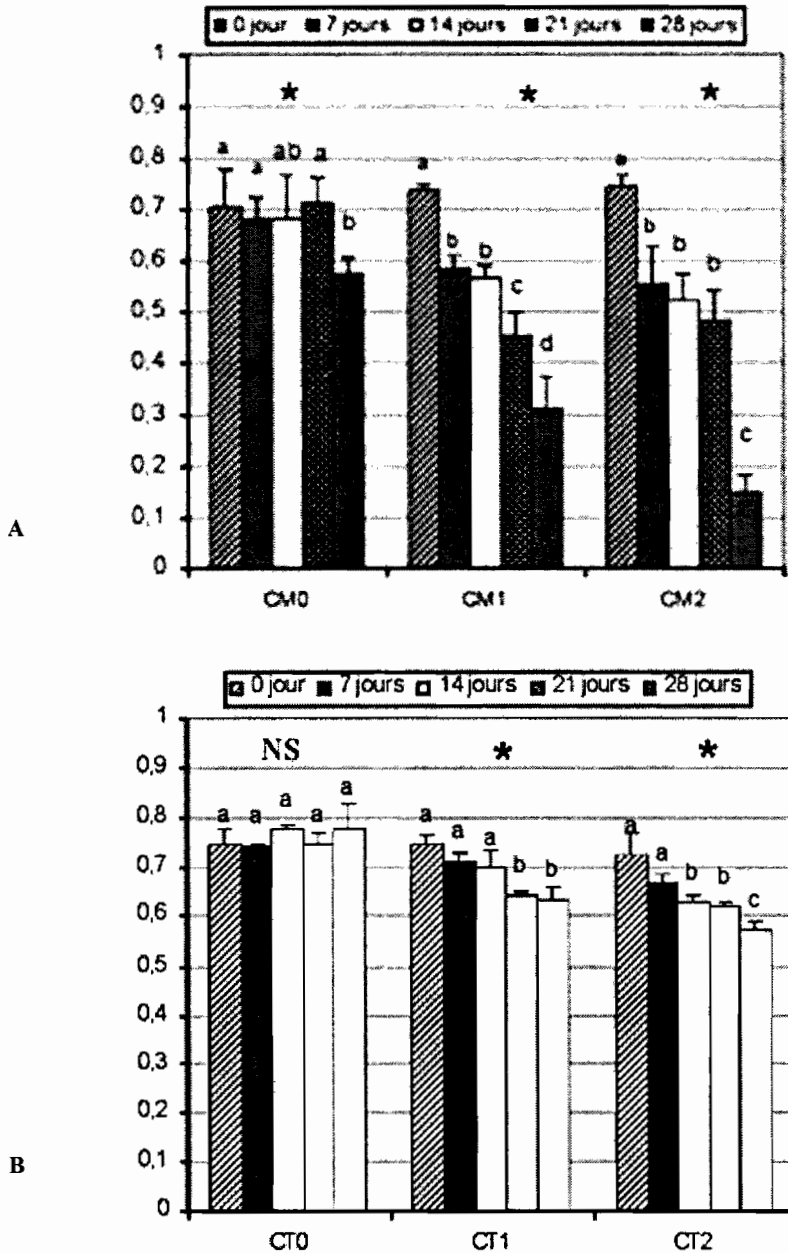


Figure 3. Rendement quantique du PSII chez les variétés Chemlali (A) et Chetoui (B)
 Les différences sont significatives lorsque toutes les lettres (indiquées sur les figures) qui leur correspondent sont différentes ($\alpha = 0,05$).

* différences significatives ($\alpha = 0,05$); NS: différence non significative.

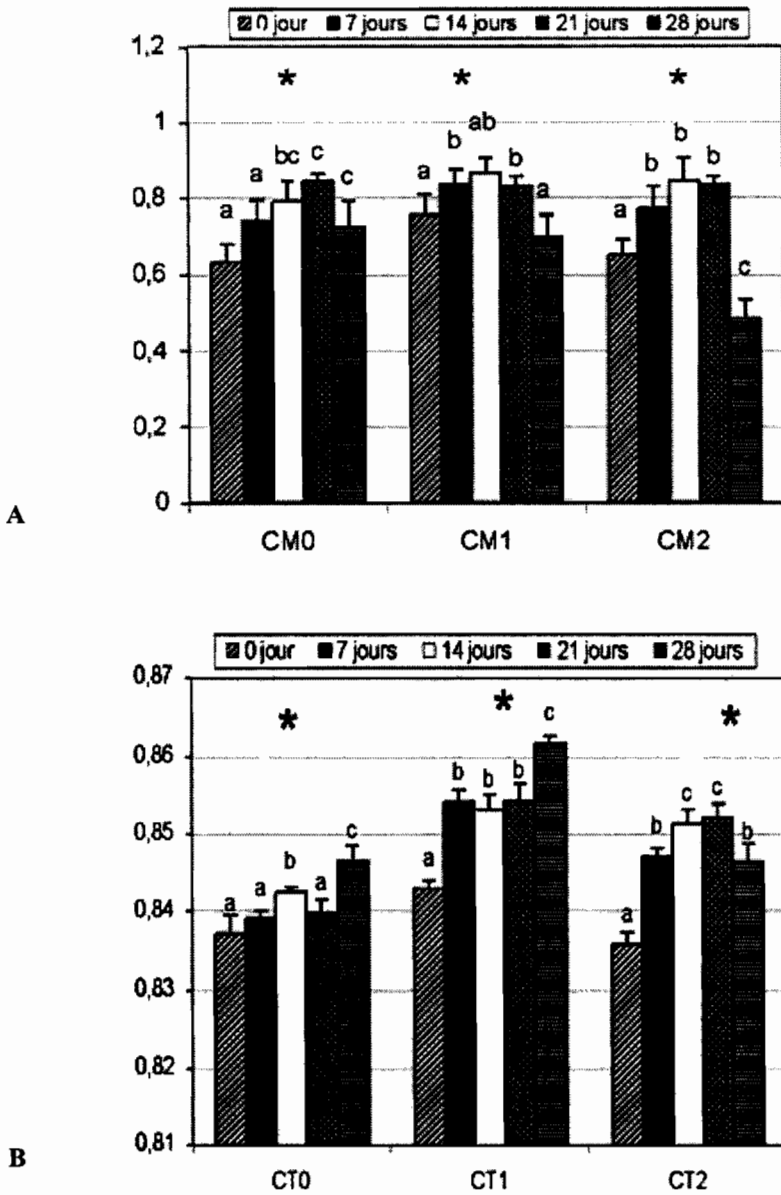


Figure 4. Rendement quantique maximal du PSII chez les variétés Chemlali (A) et Chetoui (B)

Les différences sont significatives lorsque toutes les lettres (indiquées sur les figures) qui leur correspondent sont différentes ($\alpha = 0,05$).

* différences significatives ($\alpha = 0,05$)

3.5. Évolution du taux de transfert des électrons (J_T)

Le J_T de la variété *Chemlali* se situant dans l'intervalle [30 - 35] $\mu\text{mol e}^- \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ est plus faible que celui de la variété *Chetoui* évoluant dans l'intervalle [42 - 49] $\mu\text{mol e}^- \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Sous l'effet du stress hydrique, on a remarqué une augmentation de J_T .

Au niveau du stress CM1, le J_T est passé de 30,40 $\mu\text{mol e}^- \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ avant l'installation de la contrainte hydrique à 50,09 $\mu\text{mol e}^- \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ après 28 jours. De même le J_T de CM2 a augmenté significativement de 57% ($\alpha = 0,05$); ayant été de l'ordre de 33,86 $\mu\text{mol e}^- \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ il a atteint une valeur de 53,12 $\mu\text{mol e}^- \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ après 28 jours de la contrainte hydrique (Figure 5A).

Pour la variété *Chetoui*, le J_T a évolué de la même façon que chez la variété *Chemlali*. Le J_T de CT1 est passé de 35,90 $\mu\text{mol e}^- \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ avant l'installation de la contrainte hydrique à 55,49 $\mu\text{mol e}^- \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ après 28 jours de stress.

Les valeurs enregistrées de J_T pour CT2 sont 40,08 $\mu\text{mol e}^- \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ avant l'installation de la contrainte hydrique et de 68,82 $\mu\text{mol e}^- \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 28 jours après, soit une augmentation significative de 71% (Figure 5B).

La variété *Chetoui* présente une capacité de transfert des électrons plus importante que la variété *Chemlali*. Sous l'effet des deux niveaux de stress cette variété présente une augmentation du J_T plus importante que la variété *Chemlali*.

3.6. Évolution du quenching photochimique du PSII (qP)

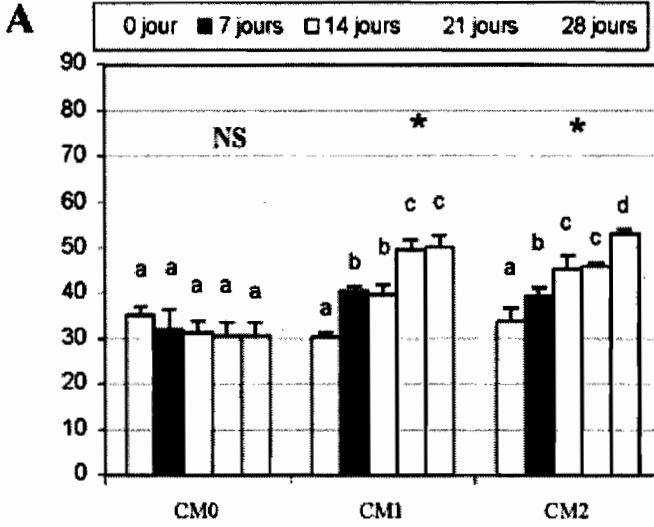
Au niveau du témoin, le qP a varié de 0,65 à 0,69 pour la variété *Chemlali* et de 0,66 à 0,68 pour la variété *Chemlali* et *Chetoui*. En effet, pour les deux niveaux de stress, la contrainte hydrique a provoqué une augmentation du quenching photochimique.

Chez la variété *Chemlali*, le qP du CM1 est compris entre 0,65 avant le stress et 0,75 après 28 jours de contrainte hydrique. Au cours de ce traitement le qP a augmenté de 16%. Pour CM2, le qP a enregistré une augmentation plus importante de 26%.

Avant l'installation de la contrainte, le qP était de 0,64 et après 28 jours de stress, le qP a atteint 0,81. Les différences observées sont significatives au seuil $\alpha = 0,05$ (Figure 6A).

Chez la variété *Chetoui*, le qP du CT1 a augmenté de 11%. Alors qu'au cours du 2^{ème} niveau, le qP a augmenté de 16%. Avant l'installation du stress, le qP était 0,68 et a atteint 0,76 pour CT1 et 0,78 pour CT2. Les différences observées sont significatives au seuil $\alpha = 0,05$ (Figure 6B).

J_T ($\mu\text{mol e}^- \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)



J_T ($\mu\text{mol e}^- \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)

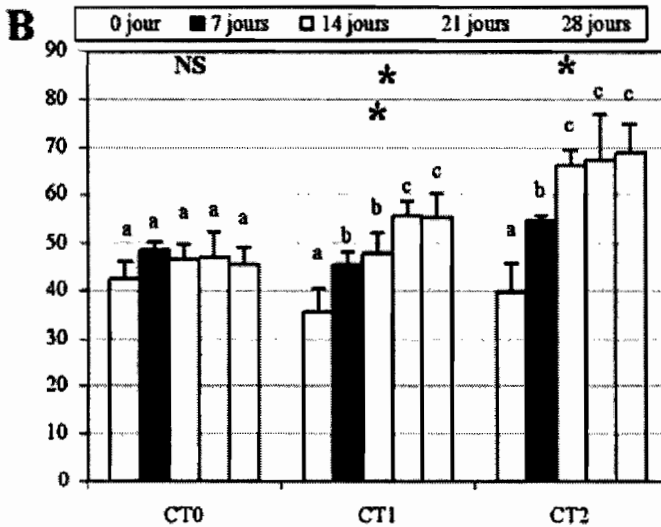


Figure 5. Taux de transfert des électrons J_T chez les variétés Chemlali (A) et Chetoui (B)

Les différences sont significatives lorsque toutes les lettres (indiquées sur les figures) qui leur correspondent sont différentes ($\alpha = 0,05$).

* différences significatives ($\alpha = 0,05$); NS: différence non significative.

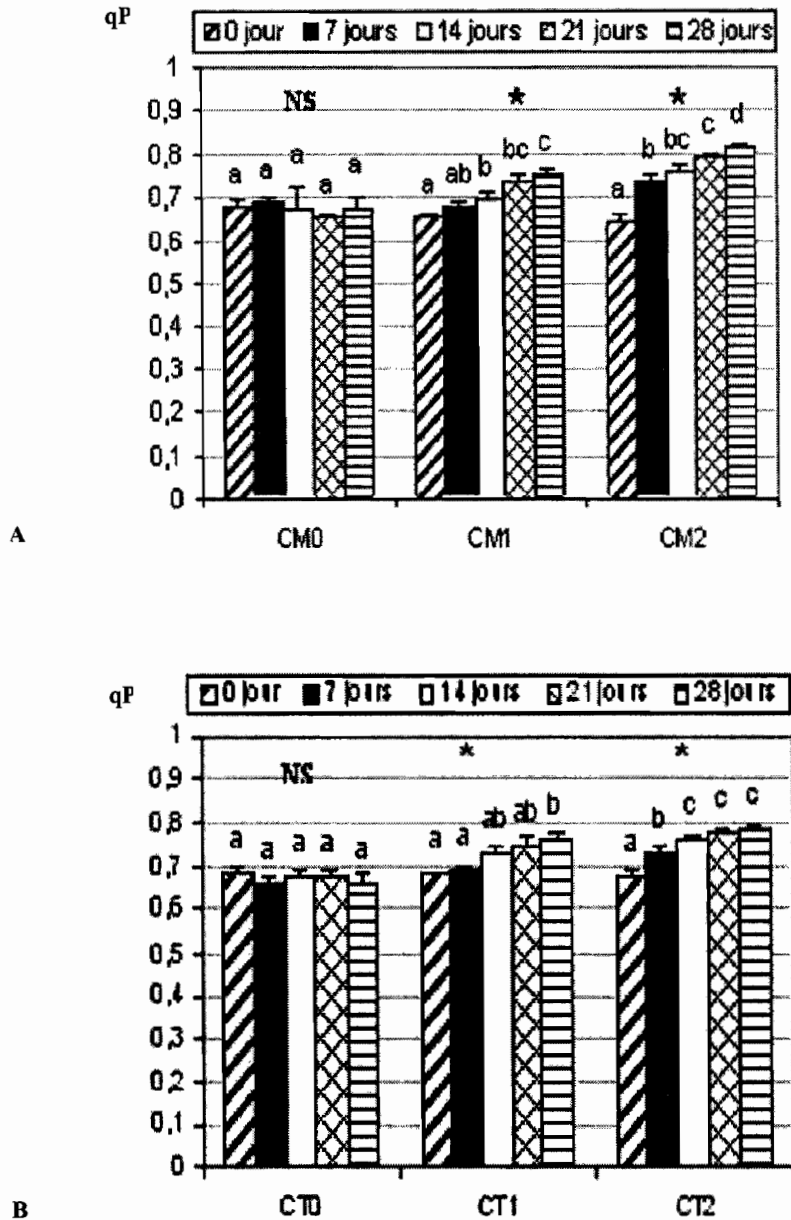


Figure 6. Quenching photochimique du PSII chez les variétés Chemlali (A) et Chetoui (B)

Les différences sont significatives lorsque toutes les lettres (indiquées sur les figures) qui leur correspondent sont différentes ($\alpha = 0,05$).

* différences significatives ($\alpha = 0,05$); NS: différence non significative.

4. CONCLUSION

De manière générale, pour répondre à un stress hydrique, les plantes réagissent par un abaissement du potentiel hydrique foliaire, permettant l'ajustement osmotique. Ce phénomène est ainsi vérifié chez l'olivier, en effet pour la variété *Chetoui*, la contrainte hydrique a engendré une importante baisse au niveau des paramètres physiologiques étudiés, alors que pour la variété *Chemlali*, la diminution est moins accentuée. Le mécanisme diffère selon les variétés au cours de la contrainte hydrique. Au cours de l'étude du statut hydrique de la plante, on a pu observer une différence du potentiel hydrique foliaire de base en fonction de la variété, de l'ordre de -1,30 MPa pour la variété *Chemlali* et -1,70 MPa pour la variété *Chetoui*. La contrainte hydrique a engendré une baisse de l'activité photosynthétique de 68% pour CM1 et de 71% pour CM2 et de 53% pour CT1 et de 85% pour CT2. Pour les deux variétés, le stress hydrique a également causé une réduction de l'efficacité quantique du PSII. De plus, une augmentation du taux de transfert des électrons (J_T) est observée. Ce phénomène est accompagné par une augmentation du quenching photochimique de 26% pour la variété *Chemlali* et de 16% pour la variété *Chetoui*. Ainsi la *Chemlali* présente des caractéristiques écophysiological plus adaptées à la contrainte hydrique que la variété *Chetoui*.

5. RÉFÉRENCES CITÉES

- Andrews J.R., Fryer M.J. & Baker N.R. (1995) Characterization of chilling effects on photosynthetic performance of maize crops during early season growth using chlorophyll fluorescence. *Journal of Experimental Botany* 46: 1195-1203.
- Angelopoulos K., Dichio B. & Xiloyannis C. (1996) Inhibition of photosynthesis in olive trees (*Olea europaea* L.) during water stress and rewatering. *Journal of Experimental Botany* 47(301): 1093-1100.
- Bogaert G. (1990) Effects of ontogenesis and drought-stress on cytological, morphological, anatomical and ecophysiological CO₂ assimilation determining leaf characteristics of C₃ and C₄ plants. Ph.D. Thesis - University of Gent, 359 p., ill.
- Braham M. (1997) Activité écophysiological, état nutritif et croissance de l'olivier (*Olea europaea* L.) soumis à une contrainte hydrique. Thèse de Doctorat d'État Faculté des Sciences Agronomiques de Gand (Belgique), 160 p.
- Büßis D., Kauder F. & Heineke D. (1998) Acclimation of potato plants to polyethylene glycol-induced water deficit, I. Photosynthesis and metabolism. *Journal of Experimental Botany* 49(325): 1349-1360.
- Chartzoulakis K., Patakas A. & Bosabalidis A.M. (1999) Changes in water relations, photosynthesis and leaf anatomy induced by intermittent drought in two olive cultivars. *Environmental and Experimental Botany* 42: 113-120.
- Chaves MM. (1991) Effects of water deficits on carbon assimilation. *Journal of Experimental Botany* 42: 1-16.
- Cornic G., Ghashghaie J., Genty B. & Briantais J.M. (1992) Leaf photosynthesis is resistant to a mild drought stress. *Photosynthetica* 27: 295-309.
- De Almeida, F.A.A. & Maestri, M. (1997) Photosynthetic oxygen evolution by four Coffea arabica genotypes subjected to a dehydration/rehydration cycle. *Journal of Horticultural Science* 72(4): 593-599.

- Fryer M.J., Andrews J.R., Oxborough K., Blowers D.A. & Baker N.R. (1998) Relationship between CO₂ assimilation, photosynthetic electron transport, and active O₂ metabolism in leaves of maize in the field during periods of low temperature. *Plant Physiology* 116: 571-580.
- Fryer M.J., Oxborough K., Martin B., Ort D.R. & Baker N.R. (1995) Factors associated with depression of photosynthetic quantum efficiency in maize at low growth temperature. *Plant Physiology* 108: 761-767.
- Garg B.K., Kathju S. & Burman U. (2001) Influence of water stress on water relations, photosynthetic parameters and nitrogen metabolism of moth bean genotypes. *Biologia Plantarum* 44: 289-292.
- Giorio P., Sorrentino G. & Andria R. (1999) Stomatal behaviour, leaf water status and photosynthetic response in field-grown olive trees under water deficit. *Environmental and Experimental Botany* 42: 95-104.
- Haldimann P., Fracheboud Y. & Stamp P. (1996) Photosynthetic performance and resistance to photoinhibition of *Zea mays* L. leaves grown at sub-optimal temperature. *Plant Cell Environment* 19: 85-92.
- Hoffmann B., Kerepesi I. & Galiba G. (2001) Photosynthetic activity and the change of sugar content in stressed *rye* and *Triticale* genotypes. Eds. Plant nutrition) Food security and sustainability of agro-ecosystems, pp. 384-385.
- Huang XH., Huang H.B. & Gao F.F. (2000) The growth potential generated in citrus fruit under waters stress and its relevant mechanisms. *Science Horticulture* 83: 227-240.
- Iacono F. & Sommer K.J. (2000) Response of electron transport rate of water-affected grapevines: influence of leaf age. *Vitis* 39(4): 137-144
- Jagtap V., Bhargava S., Streb P. & Feierabend J. (1998) Comparative effect of water, heat and light stresses on photosynthetic reactions in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Journal of Experimental Botany* 49(327): 1715-1721.
- Jonsen C.R., Jacobsen S.E., Andersen M.N., Nunez N., Andersen S.D., Rasmussen L. & Mogenson V.O. (2000) Leaf gas exchange and water relation characteristics of field quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) during soil drying. *European Journal of Agronomy* 13: 11-25.
- Katerji N. & Daudet F.A. 1986) Étude *in situ* du fonctionnement hydrique et photosynthétique d'une vigne conduite en lyre. *Agronomie* 8: 709-716.
- Khalidoun A., Chery J. & Monneveux P. (1990) Étude des caractères d'enracinement et de leur rôle dans l'adaptation au déficit hydrique chez l'orge (*Hordeum vulgare* L.). *Agronomie* 10: 369-379
- Li S.H., Huguet J.G., Schoch P.G. & Bussi C. (1990b) Réponse de jeunes pêcheurs cultivés en pots à différents régimes d'alimentation hydrique. I: Conséquences sur la transpiration, la résistance stomatique, le potentiel hydrique foliaire, la photosynthèse et les variations micromorphométriques des tiges. *Agronomie* 10: 263-272.
- Li S.H., Huguet J.G., Schoch P.G. & Bussi C. (1990b) Réponse de jeunes pêcheurs cultivés en pots à différents régimes d'alimentation hydrique. II: Effet sur la croissance et le développement. *Agronomie* 10: 353-360.
- Natali S., Bignami C. & Fusari A. (1991) Water consumption, photosynthesis, transpiration and leaf water potential in *Olea europaea* L., cv. 'Frantoio', at different levels of available water. *Agriculture Méditerranéenne* 121: 205-212.
- Ortiz-lopez A., Nie G-Y., Ort D.R. & Baker N.R. (1990) The involvement of the photoinhibition of photosystem II and impaired membrane energization in the reduced quantum yield of carbon assimilation in chilled maize. *Planta* 181: 78-84.

- Pankovi D., Sada Z., Kevrean S. & Plesniar M. (1999) Acclimation to long-term water deficit in the leaves of two sunflower hybrids: photosynthesis, electron transport and carbon metabolism. *Journal of Experimental Botany* 50(330): 127-138.
- Peng Y.H. & Rabe E. (1998) Effects of differing irrigation regimes on fruit quality, yield, fruit size and net CO₂ assimilation of (Mihowase) Satsuma. *Journal Horticulture Science and Biotany* 73(2): 229-234.
- Pereira J.S. & Chaves M.M. (1993) Plant water deficits in Mediterranean ecosystems. Editions water deficit. Plant responses from cell to community. Oxford: Bios Scientific Publishers, pp. 237-251.
- Scholander P.F., Hammel H.J., Bradstreet A., Hemmingsen E.A. (1965) Sap pressure in vascular plants. *Science* 148: 339-346.

Photosynthesis, chlorophyll fluorescence and water relations in olive tree (*Olea europaea* L.) cvs *Chemlali* and *Chetoui* during water stress

The responses of photosynthesis, chlorophyll fluorescence and leaf water potential were studied in two Tunisian olive tree (*Olea europaea* L.) cvs *Chemlali* and *Chetoui* under two water stress levels. This experiment was carried out with a completely randomised plan in hydroponic culture. Our study is focused on the ecophysiological behaviour of these two Tunisian cultivars. Two water stress levels (-0.25 MPa: CM1 & CT1 and -0.50 MPa: CM2 & CT2) were performed with added polyethylene glycol PEG 10000. Obtained results showed that:

- The second water deficit level (-0.50 MPa) induced a higher decrease in leaf water potential (Ψ_{Hb}) than the first level (-0.25 MPa). Ψ_{Hb} shows a higher decrease on *Chemlali* than *Chetoui* cultivar under these two treatments.
- Higher is water deficit, lower net photosynthetic assimilation (A_n) is for the two cultivars. *Chetoui* cultivar showed a higher decrease in its A_n (85%) than *Chemlali*'s (71%) under the second level of water deficit.
- Chlorophyllian fluorescence, photochemical and non photochemical components analysis under water deficit, show photochemical reactions disruption essentially electrons transfer in the photosynthesis which are stopped between Light Harvesting Complex II and PSII.
- The control PSII ranged between 0.57 - 0.71 for *Chemlali* and 0.74 - 0.78 for *Chetoui*. Water deficit treatments induced an important PSII decrease. In fact, CM2 treatment induced a higher decrease on *Chemlali*'s PSII (80%) than CM1 once (58%). However, these treatments had a lower effect on *Chetoui* than *Chemlali*. Yet, PSII of *Chetoui* cultivar decreased respectively about 11% and 21% for CT1 and CT2.
- The Φ_{maxPSII} in the control for *Chetoui* is higher than *Chemlali* cultivar. Water deficit induced a significant increase of 2.20% and 1.25% respectively for CT1 and CT2. Whereas for *Chemlali* cultivar, water deficit increased much higher maxPSII; which is 10.66% and 27.69% respectively for CM1 and CM2.
- The 1st level of water stress, increased J_T about 65% and 55% for *Chemlali* and *Chetoui* cultivars respectively. Indeed, the 2nd level of water stress increased J_T about 57% and 71% for *Chemlali* and *Chetoui* cultivars respectively. Consequently a significant increase in the photochemical quenching. In addition, the qP for *Chemlali* presented a higher increase (16%) than *Chetoui* (11%) under the first level of water deficit. Yet, the second water deficit had a more important effect, a higher increase for *Chemlali* (26%) than *Chetoui* (16%).

Keywords: *Chemlali* - *Chetoui* - Leaf water potential (Ψ_{Hb}) - Net photosynthetic assimilation (A_n) - Quantum yield of PSII ($\text{PSII} = (F_m' - F_s)/F_m'$) - Maximum quantum yield of PSII ($\Phi_{\text{maxPSII}} = (F_m - F_o)/F_m$) - Electron transport rate (J_T) - Photochemical quenching (qP)

Activité photosynthétique, fluorescence chlorophyllienne et relation hydrique chez l'olivier (*Olea europaea* L.) cvs. *Chemlali* et *Chetoui* durant un stress hydrique

Les réponses de la photosynthèse, de la fluorescence chlorophyllienne et du potentiel hydrique foliaire sont étudiées au niveau de deux variétés tunisiennes d'olive (*Olea europaea* L.) cvs *Chemlali* et *Chetoui* soumises à deux niveaux de stress hydrique. L'expérience est menée en culture hydroponique selon un dispositif complètement randomisé. Cette expérimentation a pour but d'étudier le comportement écophysologique de ces deux variétés. L'induction des deux niveaux de stress hydrique (-0.25 MPa: CM1 & CT1 et - 0.50 MPa: CM2 & CT2) est réalisée par adjonction de Polyéthylène glycol (PEG 10000). Les résultats obtenus montrent que:

- Sur les deux variétés, le deuxième niveau de stress (-0.50 MPa) a induit une diminution du potentiel hydrique (Ψ_{Hb}) plus importante que celle causée par le premier niveau (-0.25 MPa). Pour les deux niveaux de stress, la diminution du Ψ_{Hb} est plus importante chez la variété *Chemlali* que chez la variété *Chetoui*.
- Chez les deux variétés, plus le déficit hydrique est important plus l'assimilation photosynthétique nette (A_n) est faible. Pour le second niveau de stress, la variété *Chetoui* a montré une diminution de A_n (85%) plus importante que celle de la variété *Chemlali* (71%).
- L'analyse de la fluorescence chlorophyllienne et ses composantes photochimiques et non photochimiques sous contrainte hydrique, montre une perturbation au niveau des réactions photochimiques avec un blocage du transfert d'électrons entre Light Harvesting Complex II et PSII.
- Le PSII du témoin est compris entre 0,57-0,71 pour *Chemlali* et 0,74-0,78 pour *Chetoui*. Les traitements de déficit hydrique induisent une importante diminution du PSII. Par ailleurs, le traitement CM2 provoque une réduction du PSII plus importante chez *Chemlali* (80%) que chez *Chetoui* (58%). Par contre, ces traitements ont un plus faible effet sur la variété *Chetoui* que *Chemlali*. En effet, PSII de la variété *Chetoui* a diminué de 11% pour CT1 et de 21% pour CT2.
- Au niveau du témoin, le $\Phi_{max}PSII$ de la variété *Chetoui* est plus élevé que celui de la variété *Chemlali*. Le déficit hydrique induit une augmentation significative de 2,20% pour CT1 et de 1,25% pour CT2. En effet, chez la variété *Chemlali*, le déficit hydrique provoque une importante augmentation du $\Phi_{max}PSII$ de l'ordre de 10,66% pour CM1 et de 27,69% pour CM2.
- Le 1^{er} niveau de stress hydrique, augmente le J_T de 65% pour la variété *Chemlali* et de 55% pour la variété *Chetoui*, le 2^{ème} niveau de 57% et 71%. Par conséquent, l'augmentation du quenching photochimique est significative. De plus, sous stress hydrique du premier degré, le qP présente une augmentation plus importante chez la *Chemlali* (16%) que chez *Chetoui* (11%). Par contre, le second niveau a engendré une augmentation plus importante chez *Chemlali* (26%) que chez *Chetoui* (16%).

Mots-clés: *Chemlali* - *Chetoui* - Potentiel hydrique (Ψ_{Hb}) - Assimilation photosynthétique nette (A_n) - Rendement quantique du PSII ($PSII = (Fm' - Fs) / Fm'$) - Rendement quantique maximal du PSII ($\Phi_{max}PSII = (Fm - Fo) / Fm$) - Taux de transfert des électrons (J_T) - Quenching photochimique (qP)

Impacts de la nature du sol sur la vigueur et la production de l'olivier au Sud tunisien

Béchir BEN ROUINA¹, Ahmed TRIGUI¹, Mekki BOUKHRIS², Saïd JILANI, Abderrahmen OMRI¹ & Anouar JRIBI¹

¹ Institut de l'Olivier, BP 1087, 3000 Sfax, Tunisie

² Faculté des Sciences de Sfax

Auteur correspondant, courriel: rouina.bechir@iresa.agrinet.tn

1. INTRODUCTION

L'olivier (*Olea europaea* L.) est présent en Tunisie sur tout le territoire national sous des climats allant des étages humides et subhumides au Nord à ceux qui sont semi-arides et arides au Centre et au Sud. Il s'adapte remarquablement bien à son environnement grâce à un système racinaire puissant (Ben Rouina *et al.*, 1999), à un ajustement stomatique sans faille (Ben Rouina & Trigui, 2002) et à une stratégie adaptative au déficit hydrique exemplaire (Moreno *et al.* 1996).

Originaire de la partie orientale de la Méditerranée dominée par des précipitations supérieures à 450 mm.an⁻¹, l'olivier sauvage ou Oléastre (*Olea europaeasp. sylvestris*) est présent en Tunisie dans des milieux sub-humides à pluviométrie allant de 400 à 800 mm. Cependant, Vertovec *et al.* (2001) considèrent qu'il ne peut évoluer naturellement dans les zones semi-arides et arides où les précipitations sont inférieures à 400 mm et qu'il constitue, de ce fait, un indicateur biologique de l'aridité climatique (field biomonitor).

Quant à l'olivier domestique (*Olea europaea sp. sativa*), sa présence en milieu aride où le climat est dominé par de faibles précipitations (< 250 mm.an⁻¹), une répartition irrégulière des pluies, des étés chauds et secs et où les périodes de sécheresse sont très fréquentes et parfois excessivement longues n'est rendue possible que grâce à l'ingéniosité des agriculteurs. Ceux-ci ont remarquablement adapté la culture aux conditions environnantes constamment précaires et difficiles. En effet, en utilisant des moyens limités et souvent rudimentaires, ils ont pu planter d'immenses oliveraies, choisir des cultivars bien adaptés, opter pour des densités de plantation raisonnables et adopter des techniques culturales d'aménagement et d'entretien, à la fois, efficaces et performantes.

De nos jours, l'olivier s'intègre parfaitement dans l'écosystème fragile du milieu aride et assure indéniablement sa durabilité. Dans ce milieu difficile où la plupart des autres cultures non irriguées sont vouées à l'échec, découlant d'une rentabilité économique incertaine, l'olivier constitue un élément principal de l'équilibre social et économique des exploitations agricoles. Cela a permis de mettre en valeur de vastes zones vierges et parfois marginales, promises autrement à la désertification.

Néanmoins, cette réussite exemplaire qui a fait de ces plantations une référence mondiale de l'exploitation des milieux arides fragiles (oliveraies sfaxiennes et de l'extrême Sud-est tunisien) risque d'être compromise sous l'effet d'une conjoncture économique défavorable, la vieillesse des plantations, la grande diversité spatio-temporelle des conditions du milieu et l'augmentation disproportionnée des charges de production qui ont grevé la rentabilité économique du secteur oléicole allant jusqu'à le marginaliser.

Depuis 1987, Trigui a remarqué que l'oléiculture tunisienne demeure un secteur traditionnel alors que la conjoncture a changé et a engendré un relâchement dans les conceptions, les investissements et les interventions, aggravant par voie de conséquence la situation. Dix sept ans plus tard, la situation s'éternise et devient plus prononcée et préoccupante. En corollaire à la vieillesse qui avance, les essais de rénovation des plantations se heurtent à un manque impitoyable de plants poussant certains agriculteurs d'utiliser un matériel végétal génétiquement inconnu et vraisemblablement mal adapté aux conditions difficiles du milieu aride, puisque importé d'Europe (Arbequina, Arbosana, Koroneiki, Manzanilla,...), ou des variétés originaires du Nord tunisien comme la Chetoui et la Meski (actuellement plantées jusqu'à Remada). De surcroît, les efforts de plantation sont souvent focalisés sur des régions où l'oléiculture n'a aucun avenir, puisque le facteur sol n'a jamais été pris en considération lors de l'installation des nouvelles oliveraies.

Dans cette présentation, on tente d'analyser l'effet de la qualité du sol sur la croissance et la production de l'olivier Chemlali Sfax et de montrer ses capacités adaptatives aux caprices du milieu aride. Cette analyse aidera à comprendre certains aspects physiologiques permettant une meilleure tolérance de la variété Chemlali aux contraintes du milieu aride et d'assurer la durabilité de l'écosystème à olivier.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

Cette étude a été accomplie dans deux parcelles d'oliviers installées entre 1914 et 1917 à l'agro-combinat Chaâl appartenant à l'Office des Terres Domaniales. Le suivi du comportement productif de deux vergers, qui ne diffèrent que par la qualité du sol, concerne les productions moyennes annuelles d'olives durant la période étalée entre 1939/1940 et 2002/2003. Le premier verger compte 650 arbres, plantés à la densité de 17 arbres par hectare sur un sol sableux profond, favorable à l'oléiculture (38,2 ha) et le second, compte 702 arbres (soit 41,3 ha), installé sur un sol sablo - argilo - limono - gypseux qualifié de sol marginal peu propice à la culture.

En outre, une série de mesures a été réalisée sur la caractérisation physico-chimique des deux types de sols et leurs humidités respectives au point de flétrissement permanent et à la capacité au champ.

Sont également prises en compte les mesures relatives à la morphologie des feuilles, à la transpiration et à l'efficacité d'utilisation de l'eau estimée par le quotient de la photosynthèse nette à la transpiration.

3. RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

3.1. Granulométrie et composition chimique du sol dans les deux parcelles

Comme la composition granulométrique du sol conditionne ses performances hydriques (infiltration, rétention, drainage et évaporation) surtout en milieu aride où les précipitations sont insuffisantes et irrégulières, la texture du sol et sa composition chimique (Tableaux 1 & 2) peuvent revêtir une grande importance dans cette étude.

Tableau 1. Composition granulométrique des horizons du sol dans les deux parcelles d'étude

Profondeur de l'horizon	Granulométrie (en %)					Densité du sol	Calcaire (en %)		CaSO ₄ -2H ₂ O (en %)
	A*	L	STF	SF	SG		Total	Actif	
Parcelle à sol favorable à l'olivier									
0 - 20	4,7	1,3	4,1	78,5	11,4	1,62	9,0	2,5	0,14
20 - 115	3,5	1,1	3,8	87,9	3,7	1,65	8,3	2,5	0,29
115 - 125	8,3	4,1	6,2	78,1	3,8	1,61	8,5	2,0	0,44
125 - 185	10,3	5,7	1,9	78,3	3,8	1,60	12,8	5,0	0,17
Parcelle à sol marginal									
0 - 20	11,4	8,5	6,4	71,8	1,9	1,45	22,5	4,0	5,3
20 - 75	13,5	11,4	5,5	68,8	0,8	1,58	24,3	9,1	6,3
75 - 160	31,3	15,5	15,5	36,7	1,0	1,78	19,2	11,3	9,0
> 160	43,1	20,5	14,7	3,2	1,0	1,75	22	15,3	17,5

A* = argile $\Phi < 0,2 \mu\text{m}$; L = limon $2 < \Phi < 20 \mu\text{m}$; STF = sable très fin $20 < \Phi < 50 \mu\text{m}$; SF = sable fin $50 < \Phi < 200 \mu\text{m}$ et SG = sable grossier $200 < \Phi < 2000 \mu\text{m}$. CaSO₄-2H₂O = gypse.

Tableau 2. Composition chimique des différentes strates pédologiques du sol dans les deux parcelles d'étude

Profondeur (en cm)	pH	CE (mS/cm)	MO (en %)	Azote (en %)	P. assim. (ppm)	K. assim. (ppm)	Na (ppm)
Parcelle à sol favorable à l'olivier							
0 - 20	8,2	0,22	0,165	0,100	27	385	290
20 - 115	8,0	0,42	0,410	0,102	17	265	550
115 - 125	8,1	0,32	0,482	0,135	27	260	370
125 - 185	8,2	0,29	0,371	0,124	27	282	400
Parcelle à sol marginal							
0 - 20	8,1	0,37	0,165	0,117	36	320	950
20 - 75	8,2	0,22	0,270	0,154	36	200	400
75 - 160	8,3	0,33	0,136	0,140	41	250	590
> 160	8,5	0,35	0,067	0,140	29	250	590

C.E = conductivité électrique, MO = matière organique, P. assim. = phosphore assimilable, K. assim. = potassium assimilable, Na = sodium, ppm = partie par million.

Le sol du Châal est un sol sableux du type iso-humique brun, pauvre en matière organique et contenant du gypse. Le tableau 1 montre que la parcelle à sol favorable est constituée essentiellement de sables dont le taux varie d'un maximum de 94%, à la surface, à un minimum de 84 % dans l'horizon 125 - 185 cm. D'après l'USDA Soil Taxonomy, ce sol est rangé dans la classe S (sol sableux) puisqu'il contient un taux \geq 92% de sable et \leq 5% d'argile et de limon chacun.

Par contre, le sol marginal ne présente que 75% de sable d'origine éolienne en surface (0 - 20 cm). À partir de 75 cm, ce taux n'est que de 44% puisque le sable cède place à l'argile (31,3%), au limon (15,5%) et au gypse (9%). À une profondeur de 1,6 m, le sable ne représente que 18,9%. Le reste est constitué d'argile, de limons et de gypse dont les taux respectifs sont de 43%, 20,5% et 17,5%. D'après la classification américaine, il appartient à la classe SCL en surface (de l'anglais: Sandy \leq 58%, Clay \geq 15%, Loam \leq 27%), c'est à dire sablo - argilo - limoneux et devenant franchement argilo-limoneux en profondeur.

L'analyse chimique effectuée dans les différents horizons des profils réalisés dans les deux parcelles (Tableau 2) montre des conductivités électriques faibles qui confirment la pauvreté du sol en éléments minéraux. De surcroît, les teneurs en matière organique (variant entre 0,06 et 0,37 %) sont très faibles et reflètent la dégradation sévère de ces sols qui risquent, à moyen terme, de devenir des sols minéraux impropres à l'agriculture.

3.2. Caractéristiques hydriques du sol dans les deux parcelles

3.2.1. Capacité au champ et point de flétrissement permanent

Mesurée au laboratoire à l'aide de plaques à une pression de 0,5 bar, l'humidité caractéristique dite capacité au champ (appelée aussi humidité à $pF = 2,5$) est faible dans les deux types de sol. Ses valeurs sont de 10,81% dans le sol favorable et de 14,19% dans le sol sablo - argilo - limono - gypseux marginal (tranche de 0 à 120 cm de profondeur). L'humidité caractéristique au point de flétrissement (à $pF = 4,2$) est obtenue par l'application d'une pression de 15 bars. Ses valeurs caractéristiques sont de 6,52% dans la parcelle à sol marginal et seulement 5,29% dans celle à sol favorable.

Théoriquement, les racines sont incapables d'absorber l'eau aux valeurs du potentiel matriciel du sol inférieur à -1,5 MPa, c'est à dire aux humidités plus faibles que celles qui sont admises comme point de flétrissement permanent. Cependant, ce concept théorique de PFP semble ne pas dépendre uniquement du sol, mais aussi et surtout des propriétés intrinsèques de la plante et des mécanismes de la résistance de l'olivier en milieu aride au stress hydrique. En effet, l'humidité du sol mesurée à $\Psi = -1,5$ MPa ne s'avère pas automatiquement limitante des processus physiologiques de l'arbre, puisque l'olivier supporte des potentiels du sol inférieurs à -5 MPa sans qu'il ne perde ses feuilles ou dépérisse.

3.2.2. Évolution mensuelle de l'humidité du sol

Le suivi mensuel à longueur d'année de l'humidité du sol permet de relever qu'elle est à la fois tributaire des précipitations enregistrées et de la qualité du sol. En effet, en année à pluviométrie normale et sur un sol sableux favorable, les valeurs de l'humidité de l'horizon 0 -120 cm, mesurées avec une sonde neutronique (Solo 25, Nardeux s.a.) sont pendant 10 mois sur 12, supérieures au PFP (Figure 1).

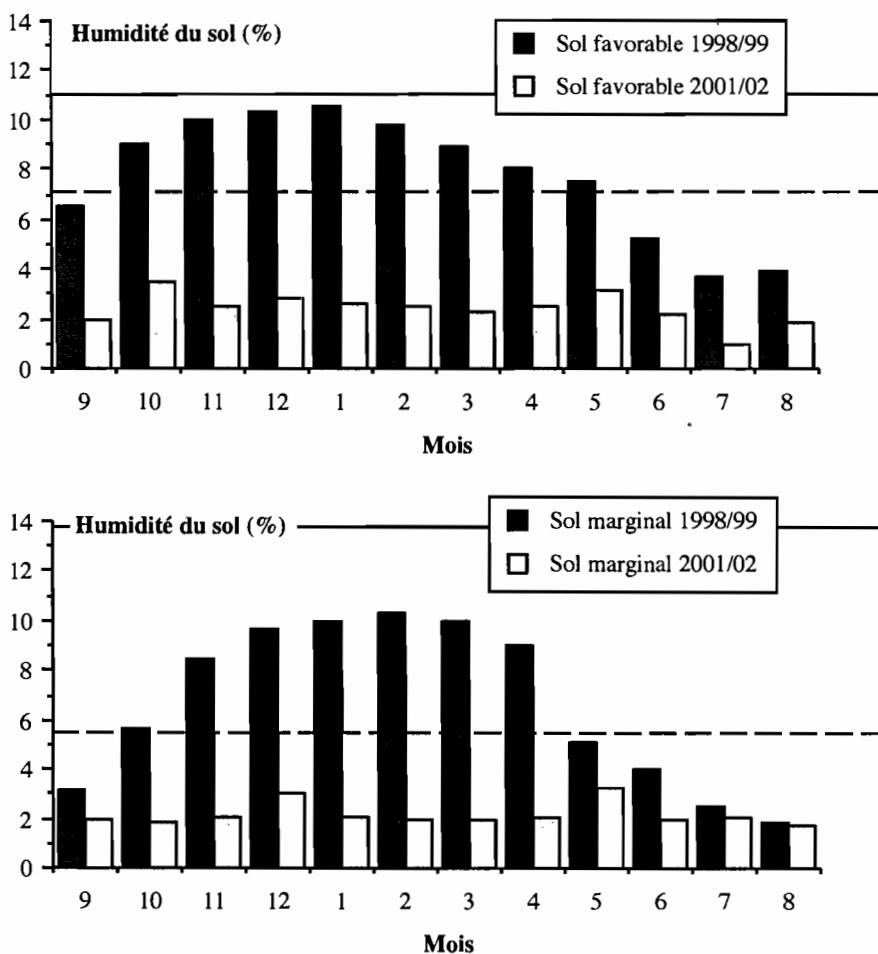


Figure 1. Humidité moyenne dans les 120 premiers centimètres du sol au cours d'une campagne agricole à pluviométrie normale (1998/99) et d'une année exceptionnellement sèche (2000/2001) en comparaison avec l'humidité au point de flétrissement permanent et celle à la capacité au champ. Parcelle à sol favorable (SF) et à sol marginal (SM).

Dans les mêmes conditions, ces valeurs ne le sont que 6 mois sur 12 dans le sol marginal, coïncidant avec la saison humide allant de novembre à avril. Par contre, au cours d'une année exceptionnellement sèche (84,7 mm durant la campagne agricole

2001/2002), ces humidités sont constamment inférieures à celles qui sont mesurées au point de flétrissement permanent dans les deux parcelles d'étude. Ce constat ne pourrait être sans effets sur la croissance des arbres et sur leurs comportements écophysologiques. Le suivi régulier des floraisons de l'olivier durant la période 1998-2002, dans les deux parcelles a fourni d'importantes précisions quant à la densité des organes reproducteurs par pousse fructifère. Le niveau de la floraison est hautement corrélé à la vigueur des pousses fructifères (Figure 2) qui dépend à son tour de la texture du sol sur lequel évolue l'arbre.

$Y = 0,7326 X + 0,8721$; avec $R^2 = 0,9$ hautement significatif à $p < 0,01$

Où Y représente le nombre de grappes par rameau fructifère et X la longueur de ce rameau en centimètres.

En outre, une corrélation linéaire hautement significative a été déterminée entre la longueur de la pousse et l'humidité du sol, tributaire à son tour de la texture. Son équation est la suivante:

$Y = 11,296 - 4.558 X + 0.692 X^2$; avec $R^2 = 0,89$ hautement significatif à $p < 0,001$

Où Y désigne la longueur de la pousse en cm et X l'humidité en % de l'horizon 0 - 120 cm.

Nombre de grappes florales par pousse

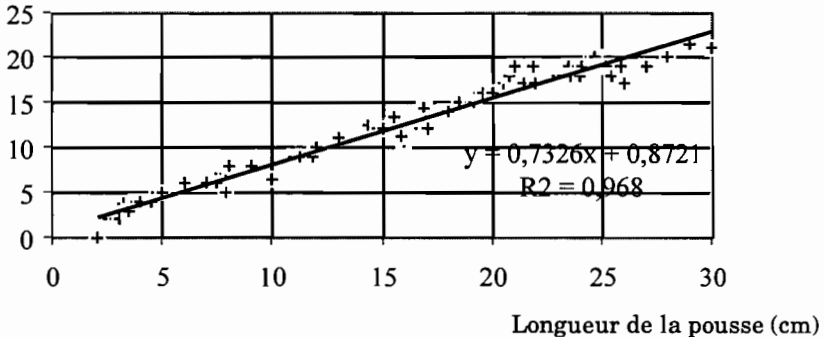


Figure 2. Variation du nombre moyen des grappes florales formées en fonction de la longueur du rameau florifère

3.2.3. Vitesse d'infiltration de l'eau de pluie

L'infiltration de l'eau dans des sols de textures et de structures différentes est tributaire de leurs humidités initiales (Hillel, 1982) qui affectent la vitesse de percolation (plus rapide dans le sol sec que celui qui est humide). Pour avoir des conditions expérimentales conformes, les tests d'infiltration ont été réalisés après de fortes pluies (humidité proche de la capacité au champ), lorsque les couches superficielles du sol sont saturées.

Les résultats des différentes mesures réalisées au cours de cette étude (Figure 3) montrent une différence très nette du comportement des sols dans les deux parcelles. Il est tributaire à la fois de leurs textures (95% de sable pour le sol favorable et 75% pour le sol marginal dans l'horizon 0-20 cm) et de leurs structures (présence d'une semelle de labour à partir de 12 cm de la surface dans le sol marginal et à 18 cm dans celui qui est favorable à l'olivier).

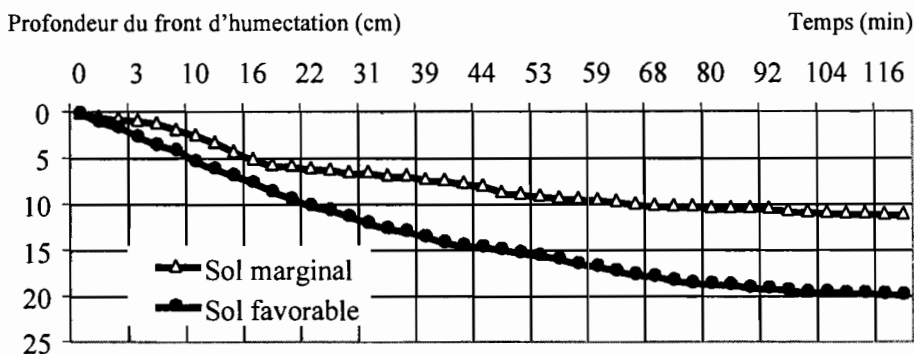


Figure 3. Perméabilité à l'eau dans les sols des deux parcelles (infiltromètre à double anneau). Chaque courbe représente la moyenne de 5 répétitions distinctes effectuées à des humidités similaires dans la couche 0 - 40 cm de profondeur.

Au bout d'une heure d'infiltration, le front d'humectation a atteint une profondeur de 9,4 cm dans le sol marginal et 16,6 cm dans le sableux. La différence des vitesses d'infiltration de l'eau dans le sol des deux parcelles engendre un comportement hydrique distinct de ceux-ci surtout lors des pluies torrentielles ($P >$ vitesse d'infiltration). En effet, le ruissellement n'a lieu qu'à partir d'une hauteur des précipitations de 17 mm par heure sur le sol sableux favorable à la culture de l'olivier et intervient, par contre, à partir de 10 mm de pluie par heure sur le sol marginal, ce qui limite l'infiltration, favorise le ruissellement et réduit la capacité de stockage de l'eau dans le sol.

3.3. Mécanismes d'adaptation de l'olivier à la sécheresse

3.3.1. Système racinaire

En milieu aride, l'un des plus grands mécanismes d'adaptation de la plante aux sécheresses sévères et fréquentes est le développement d'un système racinaire très puissant. Confronté à une alimentation hydrique contraignante, l'olivier émet deux types de racines:

- Des racines profondes exploitant les couches les plus enfoncées du sol et atteignant jusqu'à 5 m de profondeur (Yancovitch & Berthelot, 1947; Ben Rouina *et al.*, 1999).
- Des racines traçantes superficielles s'étendant jusqu'à 22 mètres du tronc (Ben Rouina *et al.* 1999). Elles se trouvent à quelques centimètres de la surface du sol et permettent à l'arbre de fixer toute trace d'humidité résultant des précipitations même de faible importance.

Néanmoins, l'extension de ces racines est fonction de la nature du sol sur lequel l'arbre est planté. Dans un sol sableux favorable à la culture, les racines ne rencontrent pas d'obstacles majeurs qui les empêchent de prospecter des profondeurs importantes et de s'étendre latéralement très loin du tronc (Ben Rouina *et al.*, 1999). Cet important système racinaire permet à l'olivier d'explorer des volumes de terre pouvant atteindre $2500 \text{ m}^3 \text{ arbre}^{-1}$. À l'opposé, sur un sol marginal très compact, les racines se limitent aux couches superficielles (moins de 1 m de profondeur) et prospectent un faible volume de terre ($500 \text{ à } 600 \text{ m}^3$), ce qui rend l'arbre très vulnérable à la sécheresse (Tableau 3).

Il s'ensuit qu'à pluviométries égales, l'olivier de la parcelle à sol sableux est constamment mieux alimenté en eau que celui qui est planté sur un sol marginal peu profond. Cette différence de l'approvisionnement en eau induit des différences de la vigueur des rameaux fructifères et, par voie de conséquence, affecte la floraison et la production des arbres. Acebedo *et al.* (2000) rapportent les mêmes résultats et notent une faible floraison, une chute importante des grappes, un avortement pistillaire, une formation de fleurs imparfaites et une baisse du taux de nouaison suite à l'insuffisance de vigueur des rameaux florifères. En outre, l'insuffisance de vigueur de l'olivier rencontrée dans les zones marginales semble être à l'origine du mauvais développement des fruits et de la faible teneur en huile.

Tableau 3. Nombre total de racines recensées à 12 mètres du tronc de l'olivier Chemlali Sfax, planté sur deux types de sol, nombre et longueur unitaire des racines principales au départ du tronc et leurs moyennes (Ben Rouina *et al.*, 1999)

Profondeur de l'horizon (cm)	Sol sableux profond		Sol marginal superficiel	
	Nombre de racines	% du total	Nombre de racines	% du total
0 - 20	1243	14.75	2072	37.10
20 - 40	3610	43.17	2404	43.19
60 - 100	3083	36.85	1099	19.71
> 100	425	5.23	0	0
Total	8361	100	5575	100
Caractérisation des racines principales	Nombre par arbre	Longueur moyenne (m)	Nombre par arbre	Longueur moyenne (m)
	17	21.3	24	16.9

3.3.2. L'appareil végétatif

Sur sa face inférieure, la feuille d'olivier est parsemée de stomates. Leur rôle ne se limite pas au contrôle des pertes d'eau par transpiration, mais permet aussi d'optimiser l'efficacité de fixation du CO_2 atmosphérique et de maintenir un état de turgescence des tissus végétaux, favorable aux mécanismes vitaux de la plante lorsque les racines ne trouvent plus suffisamment d'eau dans le sol et/ou lorsque la demande évaporatoire de l'air est élevée.

Les résultats consignés sur le tableau 4 montrent que les plantes évoluant en culture pluviale réduisent le nombre et la surface de leurs feuilles afin de mieux contrôler l'utilisation des faibles ressources en eau disponibles dans le sol.

Tableau 4. Caractéristiques morphologiques des feuilles de Chemlali Sfax, cultivé sur deux types de sol dans la région du Chaâl en comparaison avec des arbres de la même variété, conduits en irrigué. Les observations sont réalisées en moyenne sur 100 feuilles par parcelle (5 feuilles x 4 orientations x 5 oliviers).

Paramètres	Parcelle irriguée	Parcelle à Sol favorable	Parcelle à Sol marginal
Surface foliaire (mm ²)	458 ± 69	401,3± 54	338,7 ± 29
Densité des stomates (nombre/mm ²)	396 ± 77	369 ± 15	333 ± 10
Densité des trichomes (nombre/mm ²)	159,51 ± 30	163,9 ± 37	169,42 ± 29
Rapport trichomes/stomates	0,40	0,44	0,51

Ce résultat pourrait expliquer la différence enregistrée quant à la surface des feuilles des arbres de la même variété évoluant sur deux types distincts de sols sous le même biotope du Chaâl et conduits de manière similaire en comparaison avec ceux recevant une irrigation équivalente à 600 mm de pluie/an.

Comparées aux arbres irrigués dont les feuilles ont la surface la plus importante, ceux qui sont conduits en culture pluviale développent un feuillage de faible surface, ce qui signifie qu'un stress hydrique prolongé affecte les propriétés anatomiques de la feuille causant un changement du nombre, de la densité et des dimensions des cellules du mésophylle foliaire, ainsi que la surface foliaire. Ce constat corrobore celui de Chartzoulakis *et al.* (1999) sur les variétés grecques Koroneiki et Mastoidis.

Chez l'olivier, les stomates sont présents uniquement sur la face inférieure (espèce hypostomatique). De forme elliptique, leur répartition est irrégulière et leur densité diffère selon le statut hydrique des arbres. Leur nombre varie de 396 stomates.mm⁻² chez l'arbre irrigué à 369 stomates.mm⁻² chez l'arbre évoluant sur un sol favorable et 333 stomates.mm⁻² sur un sol marginal. Ainsi, il en découle qu'un nombre relativement élevé de stomates et de trichomes sur la face inférieure accompagnés d'une intense couche de cire (cuticule) sur la face supérieure de la feuille, sont le plus souvent associés aux conditions défavorables d'alimentation hydrique, aux hautes températures et aux radiations solaires intenses. En outre, en concordance avec Ludlow (1980) et Faria *et al.* (1996), il paraît qu'une densité stomatique élevée est le signe d'une adaptation des plantes à la sécheresse et peut être perçue de ce fait comme un caractère de xéromorphisme.

3.4. Évolution au cours du temps de la production d'olives selon la nature du sol

En Tunisie, la production oléicole est caractérisée par des irrégularités qui se manifestent au niveau du pays, de la région, de l'olivieraie et de l'arbre. Étant en moyenne de 170.000 tonnes d'huile d'olive (1990-2000), la production nationale a régressé de 315.000 tonnes en 1996/1997 à seulement 35.000 tonnes cinq ans après

(2001/02). Ces fluctuations préoccupent agronomes, chercheurs et planificateurs. Elles sont dominées par une alternance bi ou pluriannuelle, selon le cultivar et les conditions édapho-climatiques (Trigui, 1987).

La variété Chemlali Sfax est strictement alternante. L'analyse des productions d'olives enregistrées sur une série de 63 années dans les deux parcelles d'étude nous permet d'affirmer que cette alternance est à dominante bisannuelle (Figure 4). Cependant, avec la succession des périodes sèches, elle se transforme parfois en une alternance pluriannuelle.

Production de l'arbre (kg)

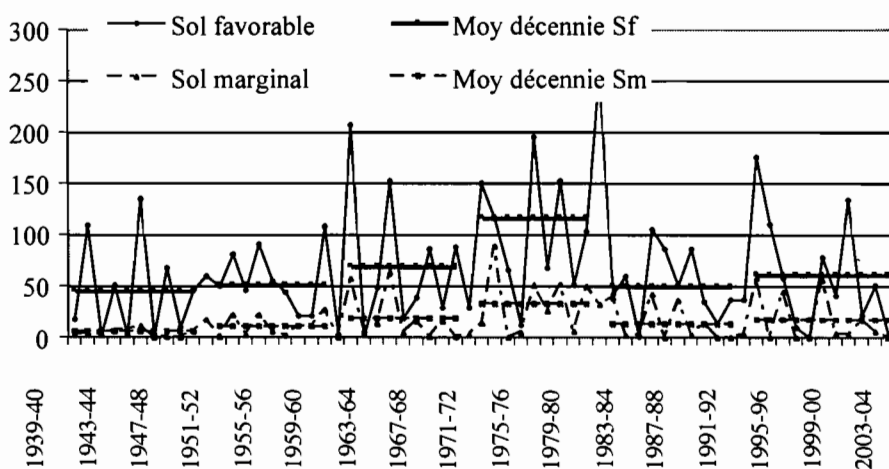


Figure 4. Productions annuelles et moyennes décennales des deux parcelles à sol sableux favorable et à sol sablo - argilo - limono - gypseux marginal

L'évolution annuelle des productions est en dents de scie, caractéristique de l'irrégularité des productions de l'écosystème en milieu aride résultant de l'alternance de production, d'une part, et de l'insuffisance des pluviométries, d'autre part.

D'une manière générale, chaque année de forte production est suivie d'une année de faible production ou à production nulle. Ce phénomène est plus fréquent dans la parcelle à sol marginal où les années de production sont suivies généralement de plusieurs années à productions nulles ou faibles.

En outre, des records de productions ont été enregistrés dans la parcelle à sol sableux favorable à l'oléiculture et ont fait suite, le plus souvent, à des précipitations élevées précédées par des années sèches (256 kg/arbre en 1979/80, soit une production de 4352 kg/hectare, 175 kg en 1991/92, soit 2975 kg/hectare et 134 kg/arbre en 1998/99, soit 2278 kg/hectare). Chez les arbres plantés sur un sol marginal, ces records sont quasi absents puisque les deux meilleures productions n'étaient que de 89 kg/arbre en

1971/72 suite aux pluies exceptionnelle de plus de 600 mm en 1969/70, soit 1513 kg/hectare et 56 kg/arbre en 1996/97, soit 952 kg/hectare.

À travers l'analyse de l'évolution des moyennes décennales de la production, la figure 4 illustre parfaitement l'importance de la qualité du sol. En effet, lorsque l'olivier est planté sur un sol favorable à la culture, il produit en moyenne 45,8 kg/an à l'âge de 26-35 ans, 117 kg/an entre 55 et 65 ans et 62 kg/an à partir de 76 ans.

Cette production n'est que de 5,5 kg, 32,5 kg et 17,1 kg/an (aux mêmes tranches d'âge) lorsqu'il se trouve sur un sol marginal à texture sablo - argilo - limono - gypseuse. De ce fait, les productions annuelles moyennes de l'arbre s'élèvent à 65,5 kg par arbre et par an pour la parcelle à sol sableux favorable à la culture de l'olivier et 15,9 kg dans celle à sol marginal, soient 1114 kg ha⁻¹ dans la première parcelle et seulement 270 kg ha⁻¹ an⁻¹ dans la seconde (soit 24%).

Ces productions extraordinaires de l'arbre évoluant en milieu aride sur un sol sableux très profond et favorable à la culture sont la résultante des adaptations acquises de la variété Chemlali Sfax à son milieu naturel de culture. Cette résistance à la sécheresse exprimée depuis la surface foliaire et le nombre de stomates qu'elle porte, puis par l'étendue du système racinaire se traduit par une meilleure croissance végétative, une floraison plus importante et des productions d'olives plus élevées.

4. CONCLUSION

L'analyse de la production de l'olivier Chemlali Sfax cultivé en milieu aride à des écartements carrés de 24 x 24 m et conduit en pluvial sur deux sols de textures différentes montre que les facteurs qui interviennent dans sa variabilité sont nombreux et complexes.

Cependant, en raison d'un déficit pluviométrique chronique, le sol domine les autres facteurs analysés. Sous une pluviométrie annuelle de 200 mm ne pouvant satisfaire qu'à peine la moitié des besoins hydriques de l'olivier, le sol joue un rôle crucial dans l'alimentation hydrique (et minérale) de la plante et, en conséquence, dans la réussite de la culture. Depuis la plantation, l'importance des réserves hydriques disponibles dans la rhizosphère immédiatement en contact avec le système racinaire permet d'induire une installation plus ou moins rapide du jeune arbre.

Sur un sol sableux profond, ne rencontrant pas de contraintes majeures à leur développement, les racines prospectent les couches les plus profondes et permettent un bon développement de l'arbre qui entre en production depuis l'âge moyen de 10 ans. Au contraire, sur un sol argilo - limoneux très compacté, les racines ne peuvent s'étendre en profondeur et se limitent aux couches superficielles souvent tariées de leurs réserves en eau. Cette restriction de l'alimentation hydrique engendre une mauvaise installation de l'arbre (enracinement superficiel exposé constamment au déficit hydrique) et une entrée en production plus tardive (jusqu'à 10 ans).

Chez l'olivier adulte, les phénomènes de croissance et de production sont aussi tributaires de l'importance des réserves hydriques des couches du sol prospectées par les racines.

De ce fait, en milieu aride tunisien, les relations entre le milieu édapho-climatique et la production sont de premier ordre et doivent être identifiées à travers une multitude de mesures quantitatives intéressant l'activité physiologique de l'arbre et sa tolérance aux déficits hydriques chroniques.

La productivité de l'olivier et sa pérennité en dépendent et affectent la stabilité du milieu et de l'écosystème aride.

5. RÉFÉRENCES CITÉES

- Acebedo MM, Canete ML & Cuevas J (2000) Processes affecting fruit distribution and its quality in the canopy of olive trees. *Adv. Hort. Sci.* 14: 169-175.
- Ben Rouina B & Trigui A (2002) Les exigences d'une oléiculture pluviale performante: climat, sol et façons culturales. Séminaire International sur l'Oléiculture: Acquis de Recherches et Contraintes du Secteur. Marrakech (Maroc). 12 p.
- Ben Rouina B, Taamallah H & Trigui A (1999) L'enracinement de l'olivier et ses variations en fonction de la nature du sol en milieu aride. *Revue des Régions Arides*. Numéro spécial. pp 182 - 190.
- Chartzoulakis K, Patakas A & Bosabalidis AM (1999) Changes in water relations, photosynthesis and leaf anatomy induced by intermittent drought in two olive cultivars. *Environmental and Experimental Botany* 42:113 -120.
- Hillel D (1982) Introduction to soil physics. 2nd ed. Academic Press, San Diego, D.C. 266 p.
- Ludlow MM (1980) Adaptive significance of stomatal response to water stress. In adaptation of plants to water and high temperature stress. Eds Turner NC & Kramer PJ). A Wiley Interscience Publication, New York. 123 - 128.
- Moreno F, Fernandez JE, Clothier BE & Green SR (1996) Transpiration and root water uptake by olive trees. *Plant and Soil* 184: 85 - 96.
- Trigui A (1987) Relations entre le climat, le sol et la production de la variété d'olivier Chemlali dans la région de Sfax (Tunisie): Contribution à l'étude bioclimatique de l'espèce par l'analyse des propriétés biophysiques structurales et spectrales des feuilles et des arbres. Thèse de Doctorat d'Etat ès-Sciences, USTL, Montpellier. 433 p.
- Vertovec M, Szakçali S, Ozturk M, Salleo S, Giacomich P, Feoli E & Nardini A (2001) Diagnosing plant water status as a tool for quantifying water stress on a regional basis in Mediterranean drylands. *Ann. For. Sci.* 58: 113-125.

Yankovich L & Berthelot P (1947) Rapport sur l'enracinement de l'olivier et des arbres fruitiers en Tunisie. *Ann. Serv. Botan. Agro. Tunisie* 20: 109-176.

Impacts de la nature du sol sur la vigueur et la production de l'olivier au Sud tunisien

En milieu aride, le sol joue un rôle important dans l'extension du système racinaire des plantes et dans les processus de leur alimentation hydrique selon l'importance de ses propriétés physico-chimiques. En outre, l'état de la surface du sol conditionne le taux d'infiltration des précipitations, alors que de sa structure dépend la capacité du sol à stocker temporairement l'eau excédentaire et la disponibilité des réserves hydriques nécessaires à l'alimentation de la plante. Dans les sols marginaux (dont notamment ceux qui sont sablo - argilo - limono - gypseux), le passage des engins mécaniques lors des labours contribue au tassement des couches supérieures instables, alors que la sécheresse estivale provoque leur imperméabilisation dès la chute des premières gouttes de pluies, ce qui accentue par voie de conséquence le ruissellement et réduit les quantités d'eau disponibles pour la plante. Cependant, dans un sol sableux profond, quoique les réserves en eau soient relativement plus faibles en surface, la plante végète mieux et ses feuilles (ainsi que son bois) sont continuellement plus riches en eau. L'étude comparative des potentialités productives de l'olivier cultivé sous un climat aride à travers des séries de productions couvrant la période 1939-2003 sur deux types de sol révèle des différences hautement significatives: la production annuelle moyenne de l'arbre est de 65 kg sur le sol sableux profond (> 3 m) favorable à l'oléiculture et de 14 kg sur le sol marginal sablo - argilo - limoneux peu profond (< 0,7 m). En outre, le suivi régulier de la croissance et de la production des arbres montrent des corrélations hautement significatives entre la longueur des rameaux fructifères et le nombre de grappes florales qu'ils portent, d'une part ($R^2 = 0,96$), et entre la longueur des rameaux et l'humidité du sol, d'autre part ($R^2 = 0,89$). Ces résultats devraient orienter le choix des sols à olivier en milieu aride.

Mots-clés: Olivier - Milieu aride - Sol - Eau - Production

Effect of physical characteristics of soil on olive tree vigour and yield in south of Tunisia

In arid zones, the soil governs the root system expansion and the plants hydrous nourishment depending on its physico-chemical properties. On another hand, the state of soil surface has a big role in the rainfall infiltration, but on its structure depend its ability to temporarily stock the excess of rainwater and the hydrous reserves availability for the plant needs. On marginal soils (such as sandy loamy clayey ones notably), the mechanical machines crossings during the tillage contribute to the packing of the first soil layers, even when the long summer drought induces its waterproofing from the occurrence of first rain drops, that accentuate the water streaming and reduces the available water quantities for olives. Nevertheless, in a sandy soil, though the water reserves are reduced in surface, the olive grows better its leaves (and its wood) are continuously more wetted. A comparative study of the olive productive potentialities under arid climate led with reference to long series of production data during the period 1939-2003 for olive trees on two kinds of soil reveals statistical high significant differences. In fact, the yearly production average of a tree is 65 kg of olives for the deep sandy soil (depth > 3 m) favourable to olives and 14 kg on a sandy loamy clayey marginal soil (depth less than 0,7 m). In addition, the trees growth and yield control show high significant relations between the shoot floral length and their floral clusters ($R^2 = 0,96$) and also between the shoot length and the soil wetness ($R^2 = 0,89$). Those results may help to guide the choice of the best soils for olive groves in arid zones.

Keywords: Olive - Arid zone - Soil - Water - Yields

Quelques aspects de la gestion de l'eau par l'olivier durant la sécheresse 2000-2002 en Tunisie aride

Béchir BEN ROUINA¹, Mekki BOUKHRIS², Ahmed TRIGUI¹, Saïd JILANI¹,
Abderrahmen OMRI¹ & Anouar JRIBI¹

¹ Institut de l'Olivier, BP 1087, 3000 Sfax, Tunisie

² Faculté des Sciences de Sfax

Autêur correspondant; courriel: rouina.bechir@iresa.agrinet.tn

1. INTRODUCTION

L'eau est le facteur principal qui conditionne la vie des végétaux. La teneur de ce constituant prépondérant des tissus des plantes varie selon les espèces de 50 à 90%. L'eau intervient directement dans l'activité de la plante en assurant, avec le gaz carbonique (en présence de la lumière), la photosynthèse. De cette manière, l'olivier a besoin d'eau qui intervient dans l'accélération de sa croissance et de sa mise à fruit (Trigui, 1994). L'eau joue aussi un rôle régulateur des différents processus physiologiques en conditionnant la productivité et la qualité des récoltes de la plante (Trigui, 1987; Braham, 1997; Ben Rouina, 1998, Ben Rouina & Trigui, 2002).

L'étude de l'alimentation hydrique de l'olivier est complexe. En effet, les populations spontanées d'olivier se développent souvent dans des zones où la pluviométrie moyenne annuelle est supérieure à 450 mm et dans les endroits favorables à l'accumulation de l'eau de ruissellement (Vertovec *et al.*, 2002). En réalité, la culture de l'olivier se trouve sous des climats plus humides (pluviométrie de plus de 1000 mm), mais aussi très arides voire désertiques (moins de 150 mm de pluie). Le Houérou (1959) indique que l'olivier peut être productif jusqu'aux isohyètes 120 - 150 mm.

Comme la photosynthèse a lieu en même temps que la transpiration et que les deux phénomènes sont contrôlés par l'ouverture stomatique, ce processus physiologique augmente avec l'intensité du rayonnement photosynthétiquement actif jusqu'à une valeur saturante. Pour la plupart des espèces dont l'olivier, cette valeur correspond à une intensité allant de 800 à 1000 $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ soit du tiers à la moitié du rayonnement mesuré en plein soleil (Braham, 1997; Ben Rouina & Trigui, 2002).

En milieu aride à étés chauds et secs, la photosynthèse est sous le contrôle de plusieurs facteurs dont, essentiellement, l'intensité lumineuse, la température, l'humidité et la demande évaporatoire de l'atmosphère et les réserves hydriques du sol au niveau des racines. De ce fait, les plantes s'adaptent à ce milieu contraignant par une activité photosynthétique maximale tôt le matin puis une fermeture des stomates dès que la température excède l'optimum photosynthétique afin de réduire la transpiration et reprennent leur activité dans l'après-midi (Trigui, 1987; Ben Rouina & Trigui, 2002).

Ce phénomène est observé chez la plupart des plantes, dont l'olivier, par plusieurs auteurs (Trigui, 1987; Fernandez *et al.*, 1997; Giorio *et al.*, 1999). Cependant, cette régulation bloque l'assimilation du CO₂ durant de longues heures de la journée et réduit l'efficacité photosynthétique (Xiloyannis *et al.*, 1996). Chez l'olivier, Tombesi *et al.* (1986) constatent qu'en présence de conditions hydriques défavorables, d'un potentiel hydrique bas, de températures élevées induisant une demande évaporatoire accrue, la photosynthèse diminue plus tôt que la transpiration et avant que la résistance stomatique n'augmente.

Pour connaître l'effet d'une sécheresse longue et sévère sur le comportement physiologique de l'olivier Chemlali Sfax évoluant en milieu aride tunisien, une étude approfondie est réalisée (dans le cadre d'une thèse) durant 27 mois sur des arbres de vergers conduits en sec (culture pluviale) sur un sol sableux profond favorable à la culture en comparaison avec des oliviers conduits en irrigué et recevant l'équivalent de 600 mm de pluie par an.

2. MATÉRIELS ET MÉTHODES

Le présent travail est réalisé dans un verger de l'oliveraie de l'agro combinat du Chaâl, planté en 1917 à la densité de 17 arbres par hectare sur un sol sableux très profond. Sa texture est sableuse: 95% de sable dans le premier mètre du profil et 84% à 2,85 m de profondeur.

Les 5 arbres homogènes choisis ont servi pendant 27 mois aux mesures écophysologiques suivantes:

- La photosynthèse nette mesurée à l'aide d'un appareil portable 'CO₂ Infrared Gas Analyzer'. Outre l'assimilation nette du CO₂, cet appareil mesure la température atmosphérique et celle de la feuille, l'humidité atmosphérique, le flux de radiation, la concentration atmosphérique en CO₂ et celle intercellulaire, la transpiration et la conductance stomatiques. Les mesures sont réalisées 3 à 5 fois par semaine sur une durée de 5 à 6 heures. Durant chaque séance quotidienne, 45 à 60 mesures sont réalisées par arbre à 3 reprises (3 répétitions à heures différentes de la journée).
- Les potentiels hydriques de base et minimum sont déterminés à l'aide d'une chambre de pression Scholander, travaillant jusqu'à une pression de 70 bars. Le potentiel est mesuré sur 8 feuilles par arbre, prélevées à hauteur d'homme aux 4 points cardinaux, de l'intérieur et de l'extérieur de la frondaison. Le potentiel de base est mesuré à l'aube et le minimum au zénith solaire.

Puisque les conditions climatiques étaient caractérisées par une sécheresse longue de 3 années, donc très défavorables au développement de l'olivier et afin de comparer le comportement des arbres sévèrement stressés à celui d'arbres bien alimentés en eau, les mêmes mesures ont été réalisées sur les arbres d'un verger irrigué au goutte à goutte et recevant l'équivalent de 600 mm d'eau par an.

Les résultats obtenus sont traités statistiquement au moyen d'un logiciel SPSS.10 pour windows.

3. RÉSULTATS

Durant les 27 mois de l'étude, les précipitations ont été caractérisées par une période très sèche au cours des 23 premiers mois (octobre 2000 - août 2002) et une période pluvieuse de septembre à décembre 2002 (Tableau 1).

Tableau 1. Répartition annuelle des précipitations durant les 27 mois d'étude échelonnés entre octobre 2000 et décembre 2002

Mois	Sep	Oct	Nov	Déc	Jan	Fév	Mars	Avr	Mai	Juin	Juil	Août	Total Annuel
2000/01	20	*58	0	0	13	5	5	9	17	0	0	0	127,0
2001/02	4	5	2,5	16,1	3	6,5	10,5	12,1	27,7	0	0,3	0	87,7
2002/03	7,3	17,5	45	46,5*									

* l'essai a été réalisé d'octobre 2000 à décembre 2002.

3.1. Photosynthèse

Les valeurs collectées et portées sur la figure 1 montrent que l'assimilation nette du CO₂ (Pn) est constamment supérieure chez les arbres irrigués à ceux qui sont conduits en culture pluviale et subissant un stress hydrique sévère. Chez les arbres bien irrigués, l'évolution mensuelle de Pn présente deux pics d'intensités différentes. Le premier intervient en période printanière d'avril à juin avec des valeurs de Pn supérieures à 25 $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ et le second de moindre importance ($P_n = 10 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$) est automnal entre fin août et début novembre. Paradoxalement, au cours du mois de mai, on remarque une chute de la photosynthèse (22,8 et 15,9 $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$) qui semble découler d'une forte mobilisation des réserves minérales et amylacées pour les besoins élevées de la floraison et des jeunes fruits (nouaison et grossissement des olives).

En culture pluviale et durant toute l'année, Pn a évolué chez l'olivier planté sur un sol sableux profond et subissant la sécheresse entre un maximum de 24 $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ en octobre 2000 et un minimum de 1,5 $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ en août-septembre 2002 avec une moyenne annuelle de 8,7 $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ la première année relativement sèche (127 mm de pluie) et seulement 6,5 $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ la deuxième année exceptionnellement sèche (87,7 mm). Ces valeurs représentent à peine 50% la première année et 40% la seconde, de l'assimilation nette notée chez la même variété conduite en irrigué.

Ainsi, il est évident que le cumul de la sécheresse affecte les capacités photosynthétiques de l'arbre. Alors, l'assimilation nette fléchit au fil des mois pour devenir presque nulle (août et septembre 2002). Lorsque, suite à une pluviométrie de 58 mm en octobre 2000, Pn était égale à 24 $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ chez les arbres conduits en pluvial (valeur comparable à celle de l'arbre irrigué), sa valeur n'était que de 6 $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ en octobre 2001, durant lequel les précipitations étaient nulles pour le 4^{ème} mois consécutif.

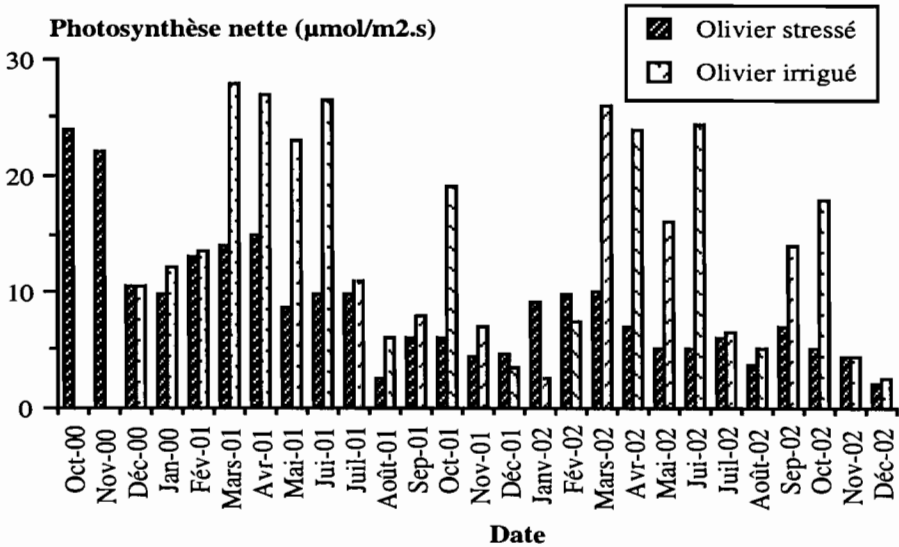


Figure 1. Évolution mensuelle de la photosynthèse nette chez l'olivier conduit en pluvial et stressé à cause de la sécheresse en comparaison à celui conduit en irrigué et recevant 600 mm par an

Avec le retour des pluies au cours de l'automne 2002, une nette reprise de l'assimilation nette du CO_2 a été enregistrée. En effet, suite à une pluie de 18 mm en octobre, l'assimilation nette a atteint $12,5 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ alors qu'elle n'était que de $1,7 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ un mois précédent.

Comparé aux arbres irrigués recevant l'équivalent de 600 mm d'eau par an ayant une Pn moyenne annuelle de $14,5 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, l'olivier en pluvial présente une intensité photosynthétique qui diminue au fur et à mesure que la sécheresse s'accroît. Tombesi *et al.* (1986), Bonghi *et al.* (1987) et Chartzoulakis *et al.* (1999) avancent que la diminution du potentiel hydrique des feuilles réduit leur capacité photosynthétique.

3.2. Conductance stomatique et transpiration

L'olivier est considéré parmi les espèces les plus économes d'eau. Il s'adapte parfaitement aux stress hydriques sévères découlant des sécheresses fréquentes du climat méditerranéen (Trigui, 1987; Fernandez & Moreno, 1999). Dans l'extrême Sud tunisien où les précipitations sont inférieures à 120 mm/an, l'oléiculture est la seule spéculation qui valorise des terres peu fertiles, sous des températures élevées. Ces dernières accroissent les contraintes hydriques entraînant souvent le dépérissement des plantations en commençant par le dessèchement de certaines branches de l'arbre (cas des grandes sécheresses des années 1987-1989 et 1999-2002) et en s'étendant aux branches principales et enfin à l'arbre entier.

Cette espèce s'adapte aux conditions difficiles de culture de plusieurs manières. La régulation stomatique (Figure 2) est parmi les moyens les plus sûrs puisqu'elle permet de commander d'une manière rationnelle les pertes en eau par transpiration et l'assimilation nette du CO_2 . Elle dépend de nombreux facteurs abiotiques (induits par

le climat) et biotiques propres à l'espèce (photosynthèse, transpiration, mécanismes et importance de la croissance et de la fructification, étendue du système racinaire).

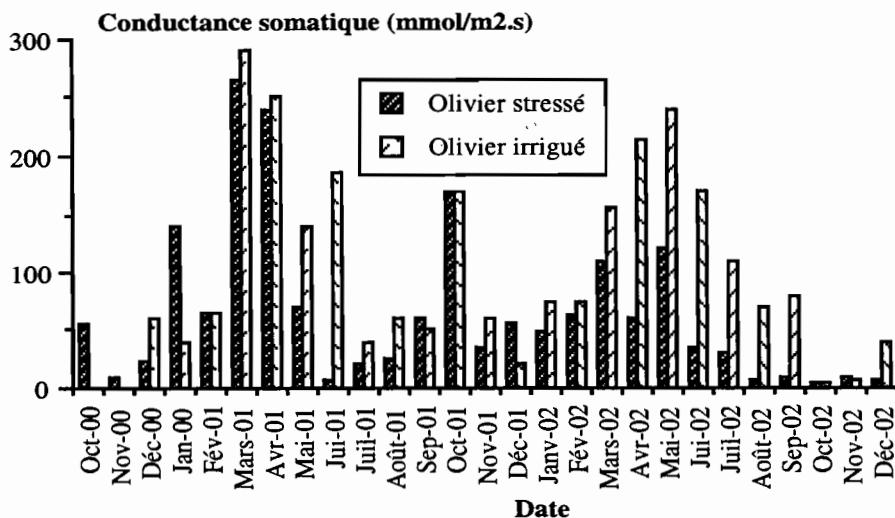


Figure 2. Évolution mensuelle de la conductance stomatique chez l'olivier conduit en pluvial et stressé en comparaison à celui qui est conduit en irrigué et recevant 600 mm par an

Chez l'olivier conduit en irrigué et recevant des quantités d'eau supérieures à ses besoins estimés à 450 mm.an^{-1} , les valeurs de g_s sont élevées sur une longue période de l'année. Toutefois, les moyennes annuelles sont légèrement différentes durant les deux années d'observation: $93,1 \text{ mmol.m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ la première année et $63,9 \text{ mmol.m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ la deuxième. Ces différences découlent probablement d'une demande évaporatoire de l'atmosphère plus accentuée, résultant de la sécheresse sévère de la deuxième année (2002).

En culture pluviale, des différences mensuelles et interannuelles sont enregistrées. Elles reflètent à la fois les conditions sévères de sécheresse, les températures excessives de la saison estivale et les caractéristiques hydriques du sol. En effet, si au cours de la première année, la moyenne annuelle est égale à $88 \text{ mmol.m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, elle ne sera que de $75 \text{ mmol.m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ au cours de la deuxième année encore plus sèche.

Travaillant sur Frantoio cultivée au plein champ au centre de l'Italie, Tognetti *et al.* (2002) obtiennent des valeurs de g_s évoluant au cours des mois entre 50 et 250 $\text{mmol.m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ pour des arbres irrigués et de 10 à 130 $\text{mmol.m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ pour ceux qui sont conduits en sec. L'allure de la courbe des variations mensuelles de g_s est comparable à celle qui a été enregistrée chez la Chemlali Sfax, avec deux pics printanier et estival. Chez le cultivar Kalamon âgé d'un an et conduit en plein champ, Giorio *et al.* (1999) notent des valeurs maximales égales à 200 $\text{mmol.m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ en mai et des minima de 2,3 $\text{mmol.m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ en août.

Ainsi, il semble que l'olivier Chemlali Sfax réduit sa transpiration par une régulation stomatique rigoureuse afin d'économiser l'eau, même en présence d'une alimentation

hydrique satisfaisante. Cette économie d'eau est assurée par une conductance stomatique moins élevée. Ce résultat est en parfaite concordance avec celui de Rejeb (1992) qui, chez le caroubier (*Ceratonia siliqua* L.), constate des valeurs élevées de g_s à Tabarka, Tunis et Béni Khier (région Nord humide) et faibles à Souassi et Sfax (région aride plus chaude). C'est à dire que l'année 2001/2002 caractérisée par une sécheresse sévère et des températures plus élevées a induit une réduction de la conductance stomatique par une régulation stomatique plus stricte que l'année d'avant moins sèche et moins chaude.

À ces valeurs relativement élevées de la conductance stomatique correspondent des valeurs proportionnelles de la transpiration (E). Chez les arbres du verger irrigué, les valeurs extrêmes de E ont évolué entre un minimum de $0,85 \text{ mmol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ en octobre et un maximum de $7,67 \text{ mmol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ en mars avec des moyennes annuelles respectives de 4 et $3,5 \text{ mmol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ durant les deux années de mesures. Ces mêmes valeurs n'ont été que de $6,3 \text{ mmol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ en mars et de $0,3 \text{ mmol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ en décembre chez les arbres du verger conduit en pluvial et subissant la sécheresse sévère. Les moyennes annuelles sont égales à $3,2 \text{ mmol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ la première année et $2 \text{ mmol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ la deuxième année.

Statistiquement, la transpiration est positivement et hautement corrélée à g_s à $p < 0,001$. L'équation de la fonction linéaire reliant ces deux paramètres écophysologiques est la suivante (Figure 3).

$$E = 0,015 C + 1,1825; \text{ avec } R^2 = 0,962 \text{ hautement significatif à } p < 0,001$$

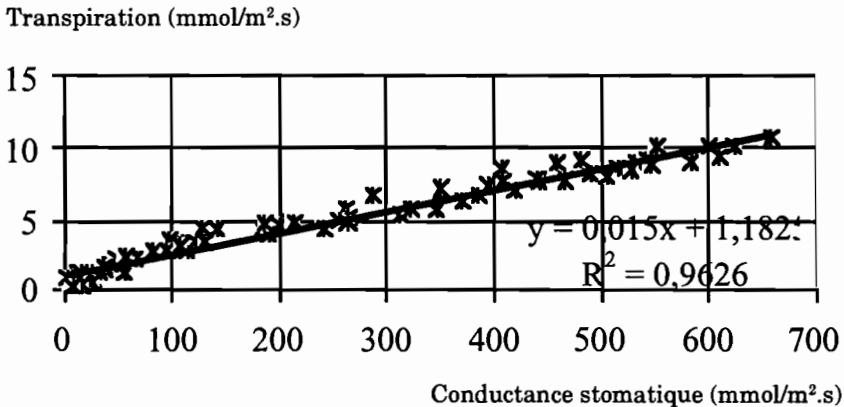


Figure 3. Relation linéaire entre la transpiration et la conductance stomatique chez l'olivier Chemlali Sfax évoluant en milieu aride tunisien

3.3. Potentiel hydrique chez l'olivier

Afin d'illustrer le comportement de l'olivier Chemlali Sfax conduit en plein champ vis-à-vis de l'état hydrique du sol et des phénomènes de résistance aux transferts d'eau induits par le climat, le suivi de l'évolution mensuelle du potentiel hydrique des arbres irrigués ou non a été effectué durant des journées entières durant les 12 mois de l'année 2002.

Les données mensuelles relevées et consignées sur la figure 4 montrent que:

- À l'aube, le potentiel foliaire de base est le plus élevé (Ψ_{base}). Ses valeurs chutent graduellement pour atteindre leurs minima au milieu de la journée (zénith solaire), atteignant ainsi le potentiel minimum de l'arbre.
- Au cours des mois, trois tendances distinctes sont observées aussi bien chez les arbres irrigués que ceux qui sont stressés. Ces variations découlent essentiellement des conditions climatiques imposant des demandes évaporatoires de l'air différentes, puisque les valeurs les plus basses du potentiel sont enregistrées en été.

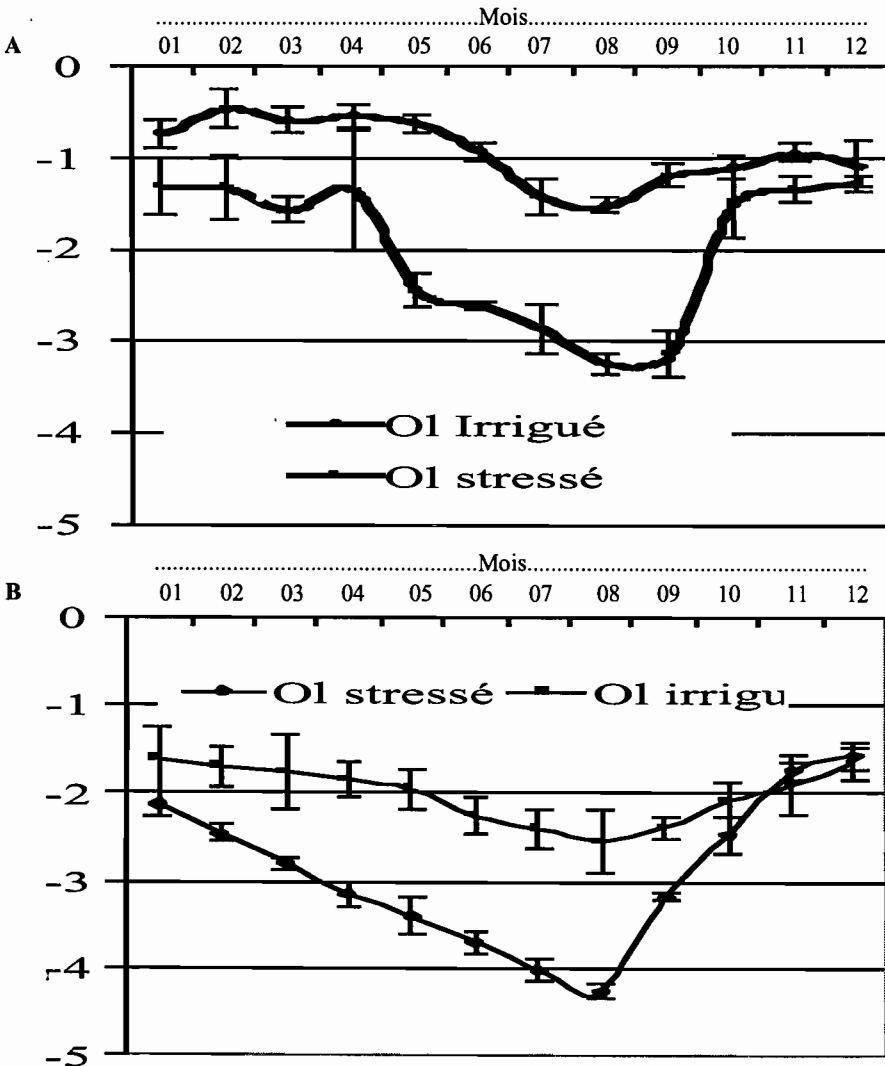


Figure 4. Évolution mensuelle des potentiels de base (A) et minimum (B) enregistrés chez l'olivier Chemlali Sfax en fonction du mode de conduite du verger

Les régulations physiologiques et morphologiques qui permettent à l'olivier de s'adapter à une alimentation déficiente en eau s'opèrent à différentes échelles. Dès qu'un déficit hydrique s'installe, la plante ajuste rapidement et de façon réversible les flux d'eau qui la traversent par la fermeture de ses stomates. Des déficits plus longs induisent des changements irréversibles, notamment morphologiques: réduction de la surface foliaire et système racinaire plus développé en profondeur et latéralement (Blum, 2002; Ben Rouina *et al.*, 1999).

Pendant les sécheresses sévères et fréquentes des régions arides, les plantes herbacées s'adaptent par le raccourcissement de leur cycle végétatif (Ludlow, 1980), une montée en graines plus rapide et une accumulation des réserves glucidiques au début du cycle de sécheresse. Dans ces mêmes conditions, les plantes pérennes en font face grâce à une régulation stomatique exemplaire, une réduction de leur potentiel hydrique et une déshydratation partielle de leurs tissus pour une meilleure efficacité d'utilisation des faibles ressources hydriques du sol.

4. CONCLUSIONS

L'interprétation des résultats relatifs à la photosynthèse obtenus chez l'olivier évoluant en plein champ sous un climat aride et soumis à l'effet d'une multitude de facteurs biotiques et abiotiques interdépendants est souvent délicate et très complexe. Malgré des corrélations statistiques très hautement significatives entre les différents paramètres (températures de l'air ambiant et des feuilles, températures et humidité atmosphériques, températures et éclaircissement, ...), d'une part, et entre ces paramètres et la photosynthèse, d'autre part, la réponse de la plante est parfois paradoxale.

Ce paradoxe semble découler de la multitude d'adaptations acquises par cette espèce plantée en milieu aride sous des pluviométries de loin inférieures à ses exigences ($P \geq 450$ mm/an). En effet, outre un ajustement stomatique adéquat et un système racinaire très puissant pour prospecter des volumes importants de sol, une grande efficacité d'utilisation de l'eau est observée.

Au verger, le quotient de l'assimilation nette du CO_2 à la transpiration est de $4,7 \mu\text{mol}$ de $\text{CO}_2 \text{ mmol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$ chez les oliviers bien irrigués. Il devient plus élevé chez les arbres conduits en pluvial en atteignant des valeurs de 7,6 et ce malgré un potentiel hydrique du sol très faible ($\Psi_{\text{sol}} = -3,7$ MPa). Ce phénomène semble résulter d'une réduction énorme de la transpiration et du maintien d'une fixation minimale du CO_2 par l'olivier soumis à un stress hydrique sévère, afin de subvenir à ses besoins énergétiques aux heures les plus chaudes de la journée.

Chez l'olivier bien irrigué (600 mm/an), l'intensité de la transpiration varie énormément au cours des différentes phases du cycle biologique. Elle est minimale lors des périodes d'arrêt végétatif (hiver et été) et maximale au cours des phases actives de croissance coïncidant avec la floraison et la nouaison (de mars à juin). En d'autres termes, il semble que la transpiration est plutôt liée à l'activité biologique (et/ou métabolique) de l'arbre et à la disponibilité de l'eau dans le sol qu'aux conditions climatiques (au cours des mois d'été, E est faible). Ce constat est confirmé chez l'olivier conduit en pluvial. En outre, malgré des potentiels hydriques chutant à des valeurs variant entre

-4 et -5 MPa, les activités photosynthétique et transpiratoire ne sont jamais nulles, témoignant du grand pouvoir adaptatif de l'olivier évoluant en milieu aride sous des conditions climatiques sévères.

5. RÉFÉRENCES CITÉES

- Ben Rouina B (1998) Contribution à l'étude de l'effet du climat et du sol sur la croissance et la production de l'olivier «Chemlali de Sfax», planté en milieu aride. Mémoire de DEA en Ecologie générale, Faculté des Sciences de Sfax, 76 p.
- Ben Rouina B & Trigui A (2002) Les exigences d'une oléiculture pluviale performante: climat, sol et façons culturales. Séminaire International sur l'Oléiculture: Acquis de Recherches et Contraintes du Secteur. Marrakech (Maroc) 14 - 16 Mars 2002. 12 p.
- Ben Rouina B, Taamallah H & Trigui A (1999) L'enracinement de l'olivier et ses variations en fonction de la nature du sol en milieu aride. *Revue des Régions Arides. Numéro spécial*. pp 182 - 190.
- Bongi G, Mencuccini M & Fontanazza G (1987) Photosynthesis of olive leaves: Effect of light flux density, leaf age, peltates and H₂O vapor pressure deficit on gas exchange. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 112: 143-148.
- Braham M (1997) Activité écophysio-logique, état nutritif et croissance de l'olivier soumis à une contrainte hydrique. Thèse d'État en Sciences Agronomiques et Biologie appliquées Université de Gent, Belgique. 247 p.
- Blum A (2000) The mitigation of drought stress. *Journal of Experimental Systems*. 16: 1 - 33
- Giorio P, Sorrentino G & d'Andria R (1999) Stomatal behaviour, leaf water status and photosynthetic response in field-grown olive trees under water deficit. *Environmental and Experimental Botany* 42: 95-104.
- Chartzoulakis K, Patakas A & Bosabadilis A (1999) Comparative study on gas exchange, water relations and leaf anatomy of two olive cultivars grown under well-irrigated and drought conditions. *Z. Naturforsch* 54c: 688-692.
- Fernandez JE, Moreno F, Giron IF & Blazquez OM (1997) Stomatal control of water use in olive tree leaves. *Plant and Soil* 190:179-192.
- Le Houérou H.N (1959) Ecologie, phyto sociologie et productivité de l'olivier en Tunisie méridionale. *Bull. Serv. Bot. Carte Phytogéo.* 4 (1): 7-71.
- Rejeb MN (1992) Etude des mécanismes de résistance à la sécheresse du caroubier (*Ceratonia siliqua* L.) en Tunisie. Thèse de doctorat es sciences naturelles, Faculté des Sciences de Tunis. 199 p.
- Tombesi A, Proietti P & Nottiani G (1986) Effect of water stress on photosynthesis, transpiration, stomata resistance and carbohydrate level in olive trees. *Olea* 17: 35-40.
- Tognetti R, Sebastiani L, Minnocci A, Vitagliano C & Raschi A (2002) Foliar responses of olive trees (*Olea europaea* L.) under field exposure to elevated CO₂ concentration. *Acta Horticulturae* 586(2): 449-451.
- Trigui A (1987) Relations entre le climat, le sol et la production de la variété d'olivier Chemlali dans la région de Sfax (Tunisie): Contribution à l'étude bioclimatique de l'espèce par l'analyse des propriétés biophysiques structurales et spectrales des feuilles et des arbres. Thèse de Doctorat d'État, ès-Sciences, USTL, Montpellier. 433 p.
- Trigui A (1994) Le milieu édapho-climatique au Sud tunisien: caractéristiques et effets sur la production de l'olivier. Proc. International Conference on Land and Water Resources Management in the Mediterranean Region. Ed. WRC/CIHEAM, IWRA, Vol. III, p 845-860.
- Xiloyannis C, Dichio B, Nuzzo V & Celano G (1996) L'olivo: pianta esempio per la sua capacità di resistenza in condizioni di estrema siccità. Seminari di Olivicoltura. Spoleto, Italia, 28 June - 2 July, pp 79-111.

Quelques aspects de la gestion de l'eau par l'olivier durant la sécheresse 2000-2002 en Tunisie aride

L'olivier (*Olea europaea* L.) espèce méditerranéenne par excellence a besoin de 450 mm de pluie par an pour végéter et produire convenablement. Cependant, en milieu aride tunisien où la pluviométrie varie de 150 à 250 mm et les températures estivales dépassent souvent 40°C engendrant une ETP supérieure à 1400 mm/an, toute alternative culturale autre que l'oléiculture est vouée à l'échec. L'extension de l'olivier dans ce milieu déséquilibré a été possible grâce à une gestion rationnelle du milieu environnant (travaux de conservation du sol et de l'eau, densité de plantation, dry farming) et à l'adaptation de cette espèce à travers une régulation parfaite de ses mécanismes biologiques et physiologiques. Au cours de la sécheresse des trois dernières années (140 mm de pluie en 1999/2000, 127 mm en 2000/2001 et 87 mm en 2001/2002) des recherches ont été menées pour connaître les mécanismes écophysologiques des oliviers conduits en culture pluviale sur un sol sableux profond comparés à ceux recevant une irrigation équivalente à 600 mm de pluie par an. Les résultats obtenus montrent que, durant la période estivale, le potentiel hydrique de base mesuré à l'aube (predawn potential Ψ_{pd}) chez l'olivier subissant le stress hydrique sévère a régressé à des valeurs de -3,24 MPa (-0,46 MPa chez l'arbre irrigué au goutte à goutte). Quant aux potentiels minimaux enregistrés au zénith (Ψ_{min}), ils ont régressé à -4,92 MPa (-1,65 MPa chez l'arbre irrigué). Malgré ces faibles valeurs du potentiel foliaire (Ψ_{pd} et Ψ_{min}), l'olivier a pu maintenir une légère activité photosynthétique et une bonne régulation stomatique. Les valeurs de l'assimilation nette du CO₂ évoluent au cours des mois entre 2 et 24 $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ avec une moyenne annuelle de 8 $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ dans la parcelle conduite en pluvial et de 28,4 à 2,32 $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (moyenne annuelle de 14,4 $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$) dans la parcelle irriguée. Pour ces mêmes arbres, la conductance stomatique varie entre un minimum de 8 $\text{mmol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ et un maximum de 272 $\text{mmol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$).

Mots-clés: Olivier - Culture pluviale - Photosynthèse - Transpiration - Potentiel hydrique

Some aspects of the water management by the olive tree during the drought of 2000-2002 in Tunisian arid zone

The olive tree (*Olea europaea* L.), that Mediterranean species, needs 450 mm of rainfall per year to appropriately vegetate and to produce. However, in Tunisian arid zones where the rainfall varies from 150 to 250 mm and the summery temperatures pass 40°C generating often an ETP higher than 1400 mm/year, all farming alternatives other than olives is vowed to failure. The extension of the olive tree in those limited conditions was first possible thanks to a rational management of the milieu (conservation of soil and water, density of plantation, dry farming) and to the adaptation of this species through a perfect regulation of its biologic and physiological mechanisms. During the drought of the last three years (140 mm of rain in 1999/2000, 127 mm in 2000/2001 and 87 mm in 2001/02), researches have been led to point out the eco physiological mechanisms developed by olive trees in rain fed conditions on a deep sandy soil compared to those receiving an irrigation equivalent to 600 mm of rain per year. The results obtained show that during the summery period, the basic hydrous potential measured at dawn (predawn potential Ψ_{pd}) on olive trees undergoing a severe hydrous stress regressed to values of -3,24 MPa (-0,46 MPa on trees irrigated by drippers). The minimal potential recorded at the zenith (Ψ_{min}) regressed to -4,92 MPas (-1,65 MPas on irrigated tree). In spite of these low values of the leaf potentials (Ψ_{pd} and Ψ_{min}), the olive tree could have maintained a light photosynthetic activity and a good stomata regulation. Values of CO₂ assimilation evolve in time between 2 and 24 $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ with a yearly average of 8 $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ on olives in rain fed conditions and from 28,4 to 2,32 $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (yearly average of 14,4 $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$) in the irrigated parcel. For these same trees, stomata conductance varies between a minimum of 8 $\text{mmol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ and a maximum of 272 $\text{mmol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$).

Keywords: Olive - Arid zones - Rain fed conditions - Photosynthesis - Perspiration - Hydrous potential

Conduite technique des oliveraies et impact sur les rendements en huile d'olive dans le périmètre du Tadla

Zehor AIT YACINE & Saïd HILALI

Faculté des Sciences et techniques, département de biologie, B.P. 523, Béni Mellal, Maroc
Auteure correspondante; courriel: z.yacine@fstbm.ac.ma

1. INTRODUCTION

L'olivier constitue, au Maroc, la principale culture fruitière qui s'étend sur plus de 500.000 hectares. Cette culture est représentée essentiellement par une seule variété population appelée Picholine Marocaine. La grande faculté d'adaptation de la dite variété, dans les conditions pédoclimatiques les plus critiques, lui a permis de se développer sur pratiquement tout le territoire national.

Par ailleurs, la production oléicole nationale reste assez faible devant les atouts que présente le secteur. En effet, et en dépit des innombrables efforts, le secteur oléicole marocain connaît plusieurs problèmes qui contribuent, à des degrés divers, à la baisse de production à savoir: les contraintes climatiques, les structures foncières et les pratiques culturales. Ces dernières sont quasi inexistantes dans la majorité des cas, sinon elles sont pratiquées de façon inadéquate (Chahbar, 1990; MAEE, 1997).

L'olivier est cultivé dans presque tout le territoire national. De ce fait, il est soumis à des régimes pluviométriques très variables allant de 800 à 1000 mm/an dans le Rif à moins de 200 mm/an dans le Haouz. Ainsi, l'apport d'une irrigation complémentaire est nécessaire dans les régions où la pluviométrie est insuffisante. Les besoins hydriques de l'olivier dépendent du climat, du type de sol de l'oliveraie, de la réserve d'eau disponible à la fin de l'hiver et de l'âge des arbres (Kabourakis, 1999).

L'apport de l'irrigation augmente la production des fruits, la teneur et la production en huile, le poids des drupes, le nombre de rameaux annuels et le nombre de fruits par arbre (Slolé Riera, 1994).

En outre, l'apport équilibré en éléments nutritifs s'avère nécessaire, non seulement pour maintenir la fertilité du sol, obtenir de bons rendements et assurer une longue vie aux oliviers, mais aussi pour réduire les problèmes de la protection phytosanitaire tenant à une nutrition déséquilibrée des oliviers (Cimato, 1990).

L'objectif de la présente étude préliminaire est d'avoir une idée sur le mode de conduite des vergers d'oliviers, dans la région du Tadla, à savoir: l'irrigation, la fertilisation, le traitement phytosanitaire ainsi que les rendements obtenus par les agriculteurs.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

La présente étude a été réalisée durant la campagne agricole 98/99. Une enquête sur le terrain a été effectuée auprès de 50 exploitations et le choix des agriculteurs a été fait de façon aléatoire en couvrant presque tout le périmètre du Tadla.

Le questionnaire établi comporte deux parties. La première concerne la conduite technique (fertilisation, irrigation et traitement phytosanitaire) et la seconde la récolte des olives (date de récolte et rendements en huile).

3. RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les résultats de l'enquête concernant les superficies des exploitations montrent qu'à part deux agriculteurs qui détiennent 10 et 20 hectares, la superficie moyenne est d'environ 1.45 ha. D'autre part, on note la prédominance des petites superficies dont la taille se situe entre 0.25 et 2 hectares et qui représentent 80% des exploitations enquêtées.

Les résultats obtenus, concernant les techniques culturales pratiquées, montrent que 86% des agriculteurs ne pratiquent pas de traitements phytosanitaires alors que 40% n'utilisent pas d'engrais. Concernant l'irrigation, malgré sa généralisation et son application, elle reste aléatoire et peut aller de 1 fois par semaine à 1 fois par an (Tableau 1).

Tableau 1. Pourcentage des agriculteurs pratiquant les techniques culturales étudiées

Techniques culturales	%
Fertilisation (engrais et/ou fumier)	60
Irrigation	98
Traitement phytosanitaire	14

Cette variation est liée aux disponibilités en eau et/ou aux types de cultures associées pratiqués par les agriculteurs au sein des oliveraies. L'olivier, étant toujours considéré comme une culture en dérobé, ne bénéficie pas des travaux d'entretien. Notons également que les agriculteurs pratiquent des cultures en intercalaire avec les oliviers, ce qui entrave la réalisation des différents travaux.

Plusieurs études se sont intéressées à l'étude de l'effet de l'irrigation (dose et moment d'apport) sur le rendement et la qualité de l'huile d'olive produite. Solé Riera (1994) a montré qu'une dose d'irrigation de 180 l/arbre.an augmente la production de 95% par rapport à un témoin non irrigué. Metochis (1999) a montré également que l'irrigation limitée accentue le phénomène de l'alternance et entraîne une réduction du rendement accumulé de 20%.

Par ailleurs, les apports d'irrigation pendant les mois antérieurs et postérieurs à la floraison améliorent le rendement de la récolte future (Tous, 1990; Lavee, 1994). D'autre part, l'huile d'olive issue des olivettes irriguées présente une composition en acides gras riche en acides palmitique, oléique et linoléique comparativement à une huile issue d'une olivette conduite en sec.

Il est à noter également que le fertilisant apporté par les agriculteurs est généralement sous forme de fumier. Ces fumures sont constituées essentiellement par l'azote, le potassium, le phosphore et le calcium.

La nutrition azotée joue un rôle important dans l'élaboration du rendement et plus particulièrement au stade repos végétatif. L'azote stimule la croissance, active le métabolisme de la feuille, agit sur la différenciation des fleurs et sur la fécondation et le développement du fruit. Ainsi, les engrais riches en azote retardent la maturité du fruit (Cimato *et al.*, 1994). Le potassium joue un rôle primordial dans la lipogénèse. En effet, Cimato *et al.* (1994) ont mis en évidence l'étroite corrélation entre l'accumulation du potassium et la teneur en huile.

Le rôle du phosphore a été signalé par Loussert & Brousse (1978). Un manque en cet élément porte atteinte à l'absorption du magnésium, du calcium et du bore et, par conséquent, occasionne une croissance lente de la plante.

Concernant les traitements phytosanitaires, les agriculteurs de la région ne portent pas d'intérêt à ce type de traitement malgré les maladies causées par certains ravageurs et champignons principalement l'œil de paon de l'olivier.

Les recherches réalisées montrent que les principaux ravageurs de la culture de l'olivier sont la mouche de l'olivier (*Dacus olea*), la teigne, la cochenille noire et la psylle de l'olivier. La mouche dont la larve endommage directement la pulpe, siège de la formation de l'huile, provoque la chute précoce des fruits, augmente l'acidité de l'huile et réduit significativement la qualité organoleptique de celle-ci (Lavee Wodner, 1995).

Parmi les maladies causées par les champignons, on distingue, outre l'œil de paon de l'olivier, la verticilliose de l'olivier et la lèpre de l'olivier (Tozi Zizzerini, 1998, Kabourakis, 1999).

Les résultats relatifs à la date de récolte des olives sont rapportés dans le tableau 2.

Tableau 2. Pourcentage des différentes dates de récolte des olives

Date de récolte	Effectif	(%)
Du 15/10 au 15/11	15	30
Du 15/11 au 15/12	17	34
Du 15/12 au 15/01	18	36

On note que la récolte des olives dans la région du Tadla s'étale sur trois mois (du 15 octobre au 15 janvier). Cependant, une légère supériorité de la période allant du 15 décembre au 15 janvier a été notée. Le faible pourcentage a été enregistré pour la première période qui s'étale entre le 15 octobre et le 15 novembre.

Plusieurs études convergent vers le fait que le niveau de maturation des fruits affecte la qualité de l'huile d'olive produite. En effet, Ryan *et al.* (1998) montrent que la récolte tardive affecte les propriétés organoleptiques de l'huile et produit une huile de qualité inférieure. Chimi (2001), Chimi & Attouati (1994) démontrent également que la teneur en polyphénols totaux, ayant un pouvoir antioxydant et qui confèrent à l'huile ses propriétés organoleptiques, est à son maximum au stade tournant et que ces composées diminuent avec l'avancement de la maturité des olives.

Dans le même ordre d'idées, Ait Yacine *et al.* (2001) montrent que c'est au-delà du mois d'octobre que les olives atteignent des dimensions et un poids optimum ainsi qu'une meilleure teneur en huile. Ces teneurs présentent un maximum à la mi-décembre.

Les rendements en huile (exprimés en litres/100 kg) obtenus par les agriculteurs de la région sont résumés dans le tableau 3.

Tableau 3. Classes des rendements obtenus par les agriculteurs

Classe de rendement (l/100 kg d'olives)	Effectif	%
13 à 18	36	72
18 à 22	14	28

Les rendements en huile obtenus par les agriculteurs enquêtés oscillent entre 13 et 22 l/100 kg d'olives. La plupart des exploitants (72%) obtiennent un rendement compris entre 13 et 18 l/100 kg alors que seuls 28 % déclarent avoir obtenu des rendements entre 18 et 22 l/100 kg. Ces rendements assez faibles par rapport aux potentialités de production de la Picholine Marocaine peuvent être dus, d'une part, au mode de conduite des techniques culturales qui sont inexistantes ou pratiquées de façon inappropriée et, d'autre part, à l'âge des plantations très avancé sans oublier l'effet du type de maâsras utilisées. Ces dernières sont généralement traditionnelles vu leur proximité et leur abondance par rapport aux maâsras modernes.

4. CONCLUSION

Les résultats de l'étude réalisée dans la région du Tadla permettent de tirer certaines conclusions quant à la conduite des oliveraies et qui peuvent être résumés en deux points essentiels:

- Les pratiques culturales apportées aux vergers d'oliviers ne se basent sur aucun critère scientifique fiable, la fertilisation généralement sous forme de fumier ne

respecte ni les besoins en éléments minéraux des oliviers, ni la disponibilité de ces éléments dans les sols. En outre, on note la quasi absence des traitements phytosanitaires et le fait que l'apport d'eau se fait avec méconnaissance des besoins en eau des cultures.

- Les rendements en huile obtenus restent faibles par rapport aux potentialités de production de la Picholine marocaine. Ceci est dû au mode de trituration, au choix de la date de récolte et à l'âge des plantations.

Les résultats de cette enquête suggèrent quelques réflexions concernant la réorganisation du secteur oléicole par:

- Instauration d'une aide pour l'acquisition des unités de trituration modernes.
- Réorganisation des agriculteurs au sein de coopératives oléicoles bien structurées.
- Organisation de campagnes de sensibilisation et de journées de démonstration.
- Encadrement continu et intensif par les services de vulgarisation agricole au profit des agriculteurs.

5. RÉFÉRENCES CITÉES

- Ait yacine Z., Hilali S., Serhrouchni M. (2001) Etude de quelques paramètres déterminants de la date de récolte des olives dans le périmètre du Tadla. *Olivae* 88: 39-45.
- Chahbar A. (1990) Bilan des travaux de recherche sur l'olivier au Maroc. *Al Awamia* 68: 1-20.
- Chimi H. (2001) Qualité des huiles d'olive au Maroc. Programme national de transfert de technologie en agriculture. *Bulletin mensuel d'information et de liaison*, 79: 1- 4.
- Chimi H., Attouati B.Y. (1994) Détermination du stade optimal de récolte des olives de la Picholine marocaine par le suivi de l'évolution des polyphénols totaux. *Olivae*, 54: 56-60.
- Cimato A. (1990) La qualité de l'huile d'olive vierge et les facteurs agronomiques. *Olivae*, 31: 20-31.
- Cimato A., Sani G., Marzi L., Marranci M. (1994) Performance et qualité de la production chez l'olivier: incidence de la fumure foliaire à l'urée. *Olivae*, 54: 48-55.
- Kabourakis E. (1999) Code de pratiques sur les systèmes de production oléicole écologique en Crète. *Olivae*, 77: 35-45.
- Lavee S. (1994) Porque la necesidad de nuevas variedades de olivos? *Fructicultura*, 62: 29-38.
- Lavee S., Wodner M. (1995) The effect of growing region, maturation and fruit handling on oil quality of CV. «Nabati» olives in the West Bank Mountains. *Agr. Med.* 125: 395-403.
- Loussert R., Brousse G. (1978) L'olivier, Techniques et production méditerranéennes. Edition G.P. Maisonneuve & Larousse, Paris.

- M.A.E.E. (1997) Ministère de l'agriculture de l'équipement et de l'environnement, Département de l'agriculture, Direction de la production végétale, Plan national oléicole: 1998-2010, Rapport principal.
- Metochis C. (1999) Irrigation des olives de la variété Koroneiki avec des eaux salines. *Olivae*. 76: 22-24.
- Ryan D., Robards K., Lavee S. (1998) Evaluation de la qualité de l'huile d'olive. *Olivae*. 72: 23-41.
- Solé Riera M.A. (1994) Influencia del riego de auxilio por goteo con pequenas dosis de agua en olivar de las Garrigas (CV. Arbequina). *Fruticultura profesional Especial Olivicultura*. 62: 24-36.
- Tosi L., Zizzerini A. (1998) Etude de la verticilliose de l'olivier en Italie centrale. *Olivae*. 71: 50-55.
- Tous J. (1990) El olivo, Situación y Perspectivas en Tarragona. Diputación de Tarragona, Spain.

Essais d'évaluation des pertes causées par l'hylésine (*Hylesinus oleiperda* Fabr., *Coleoptera*, *Scolytidae*): approche du seuil de nuisibilité

Mohieddine KSANTINI¹, Taïeb JARDAK¹⁰ & Imen BLIBECH HADHRI¹

Avec la collaboration de

M. Chaari, M. Ghorbel, Ch. Saadaoui, H. Smiri & Mme Njeh Assawer

¹ Unité de recherches: Protection des Plantes Cultivées et Environnement. Institut de l'Olivier BP 1087- 3000 Sfax, Tunisie

⁰ Auteur correspondant, courriel: jardak.taïeb@iresa.agrinet.tn

1. INTRODUCTION

En Tunisie, la faune entomologique nuisible à l'olivier comporte, en plus des espèces clé habituellement connues comme la mouche de l'olive, la teigne et le psylle de l'olivier, d'autres phytophages d'importance moindre, mais pouvant, sous certaines conditions environnementales, porter préjudice aussi bien à la production qu'à la survie de l'arbre lui-même. C'est le cas des xylophages et plus particulièrement du Neiroun, *Phloeotribus scarabaeoides* en période de sécheresse et de l'hylésine, *Hylesinus oleiperda* Fabricus dans les plantations jeunes et irriguées. Cette dernière espèce revêt encore plus d'importance si l'on considère qu'elle s'attaque aux arbres vivants et vigoureux et que les plantations intensives ne cessent de connaître de l'extension depuis plus de deux décennies. Mais si les ravageurs clé ont fait l'objet d'importants travaux ayant permis de jeter les bases de la lutte intégrée, il n'en est pas de même pour les espèces secondaires ou d'importance localisée comme l'hylésine (signalée en Tunisie, au Maroc et sur le littoral libanais) où les recherches qui lui ont été consacrées sont rares et relativement anciennes (Touzeau, 1957-1963; Gouider, 1983 en Tunisie; Graf, 1977 au Maroc).

Ceci nous a amené à entreprendre dès 1994 un programme de recherche visant l'approfondissement des connaissances sur la bioécologie de l'espèce et l'étude de sa nuisibilité (Jardak et al. 1996; Jardak et al., 1997; Jardak et al., 2002).

C'est dans ce cadre que se situe le présent travail qui vise l'estimation des dégâts causés par l'hylésine et l'approche de son seuil de nuisibilité, élément essentiel pour l'application d'une lutte intégrée.

2. MATÉRIELS ET MÉTHODES

Nos observations sur les dégâts occasionnés par l'hylésine ont été conduites dans la région de Kairouan située au centre de la Tunisie, à la société de mise en valeur et de développement de Sidi Saâd, localisée à Nasrallah. Il s'agit d'une zone continentale avec une pluviométrie annuelle moyenne située aux alentours de 250 millimètres et des températures maximales estivales assez élevées (moyennes des maximales supérieures à 35°C).

Deux parcelles ont fait l'objet d'observations sur la nuisibilité: la première n°1 comptant près de 100 pieds d'olivier où les observations ont été poursuivies de 1999 à 2003, la seconde, comptant près de 600 pieds, a été suivie de 2001 à 2003. Dans les 2 parcelles, les arbres sont âgés, en 2003, d'une douzaine d'années et sont conduits en intensif (7 x 7 mètres) sous irrigation goutte à goutte avec 2 variétés de table: la Meski et la Picholine.

La méthodologie de travail consiste à repérer et à classer les arbres selon leur degré d'infestation lequel est estimé à partir du relevé annuel du nombre de plaques de ponte par arbre, tout en tenant compte des plaques anciennes avant le démarrage des observations: arbres sains (zéro plaque/arbre); 1 à 5 plaques/arbre; 6 à 10 plaques/arbre; 11 à 20 plaques; 21 à 30 plaques et supérieur à 30 plaques/arbre.

L'impact de la présence de l'hylésine a été appréhendé par la mesure de la croissance végétative annuelle sur des rameaux marqués et le relevé de la production des arbres. Cet impact a été exprimé par la perte en production qui a été calculée en pourcentage par rapport à celle des arbres sains. L'analyse statistique des données, à l'aide du test de Duncan moyennant le logiciel SPSS 10.0, a permis de mettre en évidence les différences significatives de production entre les différentes classes d'infestation.

3. RÉSULTATS

3.1. Manifestations et symptômes des dégâts

Avant d'aborder les résultats proprement dits relatifs à la nuisibilité de l'hylésine, il importe de rappeler les symptômes des dégâts occasionnés à la suite de l'installation de l'insecte dans le tronc et les branches charpentières. Après le dépôt des œufs dans l'écorce et au fur et à mesure du développement sous cortical larvaire, la portion de l'écorce attaquée prend alors progressivement une couleur rougeâtre caractéristique de l'attaque d'hylésine délimitant ainsi une plaque appelée communément «plaque de ponte d'hylésine».

Les dégâts qui en résultent proviennent essentiellement des galeries maternelles et larvaires, mais aussi des trous d'émergence des adultes. En effet, au terme du développement pré-imaginal, la partie sous corticale détruite ne tarde pas à se nécroser et, à l'achèvement du cycle, la surface externe de l'écorce finit par présenter des craquelures caractéristiques de l'attaque de l'hylésine. Celles-ci sont à l'origine de l'affaiblissement de la vigueur de l'arbre et par conséquent d'une baisse de la production.

3.2. Effet de la densité de l'insecte sur la croissance et la production

Les données relatives à l'évolution de la croissance végétative et de la production moyenne par arbre en rapport avec le degré d'infestation (nombre de plaques de ponte/arbre) sont récapitulées dans les tableaux 1 (parcelle n°1) et 2 (Parcelle n°2). Pour cette dernière, l'estimation des dégâts s'est limitée au relevé de la production.

Tableau 1. Effet du degré d'infestation par l'hylésine exprimé par le nombre cumulé de plaques de ponte/arbre sur la croissance des rameaux et la production moyenne annuelle/arbre dans la parcelle n°1 durant la période (1999 - 2003)

Cli*	Nba* NcP*.....				El/r*.....		Prod*.....					M*	P*
		99#	00	01	02	03	00	01	02	99	00	01	02	03		
.....Années.....																
(0)*	18	0	0	0	0	0	23,6	25,5 ^a	28,86 ^a	29,9	14,35	7,9 ^a	59,0 ^a	22,4 ^a	27,1 ^a	-
6-12 §	24	8,32	9,72	10,4	10,54	10,78	20,7	24,9 ^a	25,1 ^b	29,4	10,85	3,48 ^{ab}	37,7 ^b	14,19 ^b	19,69 ^b	27.34
13-20 §	27	16,45	15,6	15,77	15,9	14,92	19,85	25,3 ^a	24,4 ^b	21,6	12,63	4,11 ^{ab}	37,1 ^{bc}	12,4 ^b	18,31 ^b	32.43
21-30 §	15	29,06	23,8	24	24,2	23,66	20,8	19,85 ^b	20,33 ^c	19,1	12,13	7,10 ^{ab}	30,2 ^d	7,73 ^{bc}	16,72 ^{bc}	38.3
> 30 §	19	40,57	38,1	36,26	39,84	40,73	18,4	19,1 ^b	20,7 ^c	20,4	14,81	2,72 ^b	30,8 ^{cd}	3,64 ^d	15,13 ^{bc}	44.17

* Nba: Nombre d'arbres; NcP: Nombre cumulé de plaques de ponte/arbre; El/r: Elongation/rameau en cm; Prod: Production en kg/arbre; Cli :Classe d'infestations; NbP: Nombre de plaques/arbre; M: moyenne 1999-2003; P: % de pertes; (0)*: Sain (0 plaque)

§: plaques

Nombre d'arbres par catégorie d'infestation différent des autres années

a, b, c: Les chiffres suivis de lettres différents sont significativement différents au seuil de 5%.

Tableau 2. Effet du degré d'infestation par l'hylésine exprimé par le nombre de plaques/arbre sur la production moyenne/arbre dans la parcelle n°2 durant la période (2001- 2003)

Cli*	Nba*	NbP*					Prod*				P*
		PA*	2001	2002	2003	T*	2001	2002	2003	M*	
(0)*	30	0	0	0	0	0	6,0 ^a	60,93 ^a	24.55 ^a	29.49 ^a	-
1 - 5 §	47	3.07	0,55	0,39	0,68	4,69	5,9 ^a	45,55 ^b	15.41 ^b	21.56 ^b	26.89
6-10 §	115	6,8	0,82	0,29	1,41	9,32	5,36 ^{ab}	37,4 ^c	10.51 ^c	16.13 ^c	45.3
11-15 §	68	12,9	0,3	0,16	1,75	15,11	4,36 ^b	35,13 ^c	9.44 ^{cd}	15.93 ^c	45.98
16-20 §	151	17,2	0,48	0,30	0,64	18,62	4,13 ^b	35,0 ^c	11.39 ^{cd}	15.72 ^c	46.69
21-30 §	115	23,83	0,70	0,42	0,83	25,78	4,92 ^{ab}	26,3 ^d	7.1 ^d	12.17 ^d	58.73
> 30 §	12	34,1	1,45	0,82	1,17	37,54	4,36 ^b	26,1 ^d	3.4 ^e	10.59 ^d	64.09

* Cli :Classe d'infestations; Nba: Nombre d'arbres; NbP: Nombre de plaques/arbre; Prod: Production en kg/arbre; M: moyenne 1999-2003; P: % de pertes par rapport au sain; (0)*: Sain (0 plaque); PA: Plaques anciennes avant 2001; T: Total; M: Moyenne

§: plaques

(a, b, c...): Les chiffres suivis de lettres différents sont significativement différents au seuil de 5%.

L'examen des tableaux 1 & 2 permet de dégager les remarques suivantes:

- La présence de l'hylésine semble bien se traduire par un effet dépressif sur la croissance végétative, mais surtout sur la production des arbres.
- L'impact de l'insecte sur la production est en rapport avec la densité de plaques de ponte par arbre.

3.2.1. Parcelle n° 1

La poursuite des observations durant cinq années successives a permis de mettre en évidence l'effet dépressif de l'insecte sur la croissance végétative et surtout sur la production des arbres. Mais les différences significatives pour les 2 paramètres étudiés (croissance et production) ne commencent à être observées qu'à partir de 2001 et surtout 2002 entre les différents degrés d'infestation. Pour la production, ces différences se confirment davantage au niveau de la production moyenne/arbre sur les 5 années d'observation et notamment entre les arbres sains, d'une part, et les arbres infestés, d'autre part.

En ce qui concerne l'effet sur l'allongement du rameau, il n'est ressenti en 2001 qu'au-delà de 20 plaques par arbre, alors qu'en 2002, les différences commencent à être significatives entre les arbres sains et ceux qui sont infestés avec 6 à 12 plaques/arbre (10.8 plaques en moyenne), mais les écarts les plus importants s'observent dès que la densité de plaques dépasse 20 par arbre et se maintiennent au même niveau jusqu'à 40 plaques par arbre.

Quant à l'impact sur la production, il n'apparaît très net qu'au niveau des productions 2002 (année plus), 2003 (production moyenne) et de la moyenne des 5 années d'observation, où les différences significatives entre arbres sains et arbres infestés apparaissent dès qu'on se rapproche de 10 plaques de ponte/arbre (10.5 en moyenne) avec une perte moyenne de production de 27.3% par rapport aux arbres sains.

Cette perte tend à s'accroître avec la densité de l'insecte pour atteindre 32.4% pour des arbres attaqués avec 15 plaques/arbre, 38% avec une infestation comprise entre 21 et 30 plaques (24 plaques en moyenne/arbre) et près de 44% lorsque la densité de plaques dépasse la trentaine/arbre et se rapproche de 40.

3.2.2. Parcelle n° 2

Pour cette deuxième parcelle, la production montre des différences significatives même en année d'alternance (2001) entre arbres sains et ceux qui sont infestés avec 15 plaques et plus par arbre, mais qui deviennent plus nettes en 2002, 2003 et au niveau de la production moyenne des trois années même par rapport à la densité la plus faible (4.7 plaques en moyenne/arbre).

Cette dernière engendre déjà une perte moyenne en production de l'ordre de 27%, valeur comparable à celle qui est observée dans la parcelle n°1, mais avec une infestation pratiquement double (10.8 plaque de ponte/arbre).

Cet effet dépressif sur la production tend à s'accroître avec le degré d'infestation: 45% avec une densité comprise entre 6 et 10 (9.3 en moyenne), 46% chez les arbres portant 15 à 18.6 plaques en moyenne/arbre et 59 à 64% chez les sujets fortement infestés avec plus de 25 plaques de ponte par arbre.

Ainsi, pour des niveaux d'infestation comparables, l'effet dépressif de l'hylésine sur la production apparaît plus important dans la parcelle n°2 que dans la parcelle n°1.

Finalement, en tenant compte des résultats obtenus dans les deux parcelles, on peut retenir pour l'instant que pour des arbres âgés d'une douzaine d'années, l'effet dépressif de l'insecte sur la production commence à se faire sentir dès que la densité de plaques de ponte se rapproche de 5 par arbre.

On peut penser que pour des arbres plus jeunes, cette limite serait vraisemblablement plus basse et, par conséquent, inférieure à 5 plaques par arbre.

4. CONCLUSION

L'estimation des dégâts causés par l'hylésine de l'olivier, *Hylesinus oleiperda*, a permis, au terme de cinq années d'observations, de mettre en évidence la nuisibilité de ce xylophage et de montrer qu'il s'agit là d'un ravageur d'importance primaire.

En effet, le développement pré-imaginal de l'insecte dans la partie sous corticale du tronc et des charpentières, engendrant successivement la formation de plaques caractéristiques au niveau de l'écorce puis la craquelure de celle-ci à la suite de la sortie des adultes, affecte la croissance végétative et surtout la production de l'arbre.

Les résultats obtenus ont montré que l'impact de la présence de l'insecte est en rapport avec la densité de plaques par arbre. Si pour la croissance végétative, les écarts entre arbres sains et arbres infestés restent relativement faibles jusqu'à la densité de 20 plaques par arbre, il n'en est pas de même pour la production, où l'effet dépressif commence à être perceptible dès qu'on se rapproche de 5 plaques de ponte par arbre avec une perte de production de l'ordre de 27%. Celle-ci tend à augmenter avec le degré d'infestation tout en montrant une certaine stabilisation entre les densités de 10 à 20 plaques (45 à 46%) avant d'enregistrer un accroissement important lorsqu'on dépasse 20 plaques par arbre.

Finalement, on peut retenir que pour des arbres actuellement âgés d'une douzaine d'années, une densité proche de 5 plaques par arbre est susceptible d'engendrer une perte significative de la production.

On peut imaginer que pour des arbres plus jeunes, le seuil serait vraisemblablement plus bas.

5. RÉFÉRENCES CITÉES

Gouider J. (1983) Quelques observations sur la bioécologie de l'hylésine de l'olivier. Mémoire de fin d'étude du 3^{ème} Cycle de Spécialisation de l'INAT, Tunisie, 59 p.

Graf P. (1977) Étude sur la bioécologie de l'hylésine de l'olivier au Maroc, pp. 52-62.

Jardak T., Moalla M. & Ksantini M. (1996) Contribution à l'étude de l'hylésine de l'olivier, *Hylesinus oleiperda* F. (Coleoptera, Scolytidae). Actes des 3^{èmes} Journées Nationales sur les Acquis de la Recherche Agronomique, Halieutique et Vétérinaire, 29/11 au 01/12-1996 Nabeul.

Jardak T., Moalla M. & Ksantini M. (1997) Facteurs de mortalité agissant sur la dynamique des populations de l'hylésine de l'olivier, *Hylesinus Oleiperda* F. (Coleoptera, Scolytidae). 4^{èmes} Journées Nationales sur les Acquis de la Recherche Agronomique, Halieutique et Vétérinaire, 1997.

Jardak T., Moalla M. & Ksantini M. (2002) Mortality factors affecting populations dynamics of the scolytid *Hylesinus oleiperda* Fabr. (Coleoptera, Scolytidae). *Acta Horticultura* 2 (586): 823-825.

Touzeau J. (1957) Observations sur l'hylésine de l'olivier en Tunisie. Serv. Production végétale et de la défense des cultures. 29134 -Imp. Off. Tunis.

Touzeau J. (1963) *Hylesinus oleiperda* In: Balachowsky: Traité d'Entomologie appliquée à l'agriculture. Édition Masson, Paris, 1, 2: 1264-1269.

Essais d'évaluation des pertes causées par l'hylésine (*Hylesinus oleiperda* Fabr., *Coleoptera*, *Scolytidae*): approche du seuil de nuisibilité

La connaissance du seuil de nuisibilité économique est un élément déterminant pour la mise en place d'une stratégie de lutte intégrée contre les ravageurs des cultures. Dans le cas de l'olivier, si pour la plupart de ses ennemis clé l'on dispose de données sur leur nuisibilité, il n'en est pas de même pour l'hylésine, insecte xylophage d'importance primaire. Ainsi, dans le souci de consolider les bases d'une protection intégrée en oléiculture et dans le cadre de travaux consacrés à l'étude de la bioécologie de cette espèce, des essais ont été conduits durant plusieurs années (1999 - 2003) dans le Centre de la Tunisie en vue de l'estimation des dégâts causés par ce ravageur et d'une approche de son seuil de nuisibilité. L'évaluation des pertes, basée sur le suivi de la croissance végétative et de la production dans deux parcelles plantées en 1990, a montré que la présence de l'insecte (estimée par le nombre de plaques de ponte par arbre), affecte négativement ces deux paramètres et en particulier la production. L'analyse des données met en évidence une relation significative entre la densité de plaques de ponte/arbre et le rendement moyen par arbre. Pour la première parcelle (suivie de 1999 à 2003), les pertes de récolte deviennent significatives (27.3% par rapport aux arbres sains) lorsque le nombre cumulé de plaques de ponte avoisine 10 par arbre. En revanche, dans la seconde parcelle (observations effectuées de 2001 à 2003), cette même perte de rendement (27%) est enregistrée avec une densité moyenne de plaques de ponte/arbre proche de 5. L'effet dépressif sur la production tend à s'accroître avec le nombre de plaques de ponte par arbre dans les 2 parcelles pour atteindre des pertes variant de 44 à 64% par rapport aux arbres sains lorsque la densité de plaques dépasse 30/arbre. Sur la base de ces données, on peut considérer que la présence du scolyte est préjudiciable à la production et qu'une densité de 5 plaques par arbre âgé d'une douzaine d'années, suffit pour entraîner une perte significative du rendement.

Mots-clés: *Hylesinus oleiperda* - Seuil de nuisibilité - Olivier

Study of the possibility to control olive powdery mildew (*Leveillula taurica*) with the use of soft and biological fungicides

Vagellis A. BOURBOS & Eleni A. BARBOPOULOU

NAGREF, Institute of Olive Tree and Subtropical Plants of Chania, Lab. of Plant Pathology and Ecotoxicology of Plant Protection Products, Agrokipio, 73100 Chania, Crete, Greece
Tel: 28210 83410, 83425 Fax: 28210 93963,
E-mail: vbourbos@nagref-cha.gr, ebarbopoulou@nagref-cha.gr

1. INTRODUCTION

Olive powdery mildew is caused by the fungus *Leveillula taurica* (Lev.) Arnaud. teleomorph of *Oidiopsis taurica* (Lev.) Salm. (= *Ovularia indica* Rao). It is well known with the synonymous *Erysiphe taurica* Lev., *E. taurica* Lev. var. *andina* and *E. taurica* var. *zygophylli*, *Oidiopsis sicula* Scalia, *Oidium cynareae* Ferr. and Massa, *Ovulariopsis cynareae* (Ferr. and Massa) Cicc. (Goidanish, 1964; Mukerji, 1968). It is considered as the major powdery mildew in the mediterranean basin. It is a cosmopolitan species since it has been found to infect more than 700 plant species belonging to 60 families. Most of the species, about 149, belong to *Compositae*, but the damages caused on *Solanaceae* (tomato, pepper, eggplant) present more economic importance. Infections on *Allium* genus have also been reported (Kranz *et al.*, 1981). In olive tree, infection on the young vegetation of nursery trees was described for the first time in 1954 (Moriondo, 1955). Infection from *Leveillula taurica* on olive tree was also reported by Goidanich (1964) and Palti (1971). In Greece, olive powdery mildew was firstly described on nursery trees at Heraklion in 1971 (Malathrakis, 1978). It mainly infects the young vegetation of olive trees. Leaves at the base of new vegetation of nursery trees, rejuvenated trees and leaf-cuttings mostly suffer. At the upper leaf surface could be observed light green to yellow green spots with diffused margins that might be confused with *Phytoptis oleae* mite infestation. At the down leaf surface of these spots, white powdery covering representing the conidial fructifications of the pathogen. In intense infection, these spots dry and acquire brown coloration. Severe leaf fall is also observed making nursery trees and leaf-cuttings not marketable and delays the growth of rejuvenated trees.

Regarding control of the pathogen, sulphur and other products except copper have been used in other crops (Palti, 1971; Ciccarese & Cirulli, 1980; Fiume, 1997; Bourbos *et al.*, 1999). Plant protective products friendly to the environment (Rathore & Rathore, 1995; Fallik *et al.*, 1997; Reuveni *et al.*, 1998; Grigaliunaite, 1999) and biological products alone or in combination with fungicides (Sztejnberg, 1998; Elad, 2000; Bourbos & Barbopoulou, 2000; Bourbos *et al.*, 2002) have also been used. Reports concerning control of the pathogen in olive tree do not exist in Greece.

2. METHODS AND MATERIALS

Trials were conducted on three-years old rejuvenated olive trees of Koroneiki cultivar. Experimental plots included 4 olive trees. In every tree 10 branches were marked. Experiment included 4 treatments in 5 replications. Three sprayings were performed in 8 days interval in April-May period. The fungicide pyrifenoX in the dose of 20 ml/hl of the commercial product Dorado 20 EC was used as the reference product. The plant protective products based on wetting sulphur and biological product containing the antagonistic fungus *Ampelomyces quisqualis* strain M-10 were tested. Wetting sulphur in the dose of 400 g/hl of the commercial product Thiovit 80 WP and biological product Aq10 in the dose of 5 g/hl were used. Trees of the control treatment were sprayed with water.

Estimation of the effectiveness was based on the measurement of infected leaves before and 8 days after the final spaying as well as on the percentage of leaf fall 6 months after the final spaying. Effectiveness was estimated with the help of Hederson-Tilton equation regarding leaf infection and Abbott equation regarding leaf fall. Statistical analysis of the experimental results was based on Duncan test.

3. RESULTS

The percentage of infected leaves in the olive trees sprayed with water ranged from 89.4 to 91.5%, while the percentage of leaf fall ranged from 19.6 to 22.1% (Tables 1, 2). The effectiveness of the tested plant protective products regarding the criterion of leaf infection (99.4 - 99.8%) as well as the criterion of leaf fall (97.1-97.4 %) did not present any statistical difference compared to the reference product (99.7 - 99.7 and 98.9 - 99 % respectively).

Table 1. Effect of wetting sulphur and *Ampelomyces quisqualis* on the percentage of leaf infection

Treatments1 st year.....		Effectiveness*2 nd year.....		Effectiveness*
	Infected leaves* before	after		Infected leaves* before	after	
Control	0.70	91.50	—	0.95	89.40	--
PyrifenoX	1.30	0.45	99.74	0.70	0.20	99.70
Sulphur	1.30	1.00	99.41	0.90	0.20	99.75
<i>Ampelomyces quisqualis</i>	1.35	1.10	99.38	0.80	0.25	99.67

*: (%)

Table 2. Effect of wetting sulphur and *Ampelomyces quisqualis* on the percentage of leaf fall

Treatments1 st year.....	2 nd year.....	
	Leaf fall*	Effectiveness*	Leaf fall	Effectiveness*
Control	19.56	—	22.06	—
PyrifenoX	0.19	99.04	0.25	98.87
Sulphur	0.56	97.12	0.63	97.17
<i>Ampelomyces quisqualis</i>	0.50	97.44	0.63	97.17

*: (%)

4. DISCUSSION

Olive powdery mildew, under specific prevailing conditions, is a serious problem for rejuvenated olive trees, young nursery trees and olive leaf-cuttings in Crete. Experiments for the effective control of the pathogen in olive trees with chemicals or with environmental friendly or biological plant-protection products had not been performed till today. The synthetic chemical product pyrifenoxy that was used as reference product satisfactorily controlled the pathogen. Proportional effectiveness had also sulphur as well as the biological product containing the antagonistic fungus *Ampelomyces quisqualis* strain M-10. The antagonistic fungus had also been used to control *Leveillula taurica* in other crops with excellent effectiveness. Results showed that olive growers in conventional as well as in organic farming might use plant-protection products to control the olive powdery mildew (Jarvis & Slingsby, 1977; Wilson, 1997; Pasini *et al.*, 1997; Elad *et al.*, 1998; McGrath & Shishkoff, 1999). The effect of the antagonistic fungus on non-target microorganisms of pathoeecosystem need to be studied (Brimner and Boland, 2003).

5. REFERENCES

- Bourbos V.A. & Barbopoulou E.A. (2000) Biological control of powdery mildew on greenhouse cucumber. *IFOAM 2000*, Basel, Switzerland.
- Bourbos V.A., Barbopoulou E.A. & Vevetis K. (2002) Control of *Leveillula taurica* (Lev.) Arnaud in pepper by the utilization of sulphur into the soil in combination with *Thiobacillus* spp. 11th Hellenic Phytopathological Congress, 1-4 Oct., Preveza, Greece.
- Bourbos V.A., Skoudridakis .. & Barbopoulou E.A. (1999) Sodium bicarbonate for the control of *Erysiphe polygoni* in greenhouse tomato. 6th ISHS International Symposium of the Processing Tomato, 25-28 May 1998, Pamplona, Navarra (Spain). *Acta Hort.* 487: 275-278.
- Brimner T.A. & Boland G.J. (2003) A review of the non-target effects of fungi used to biologically control plant diseases. *Agriculture Ecosystems & Environment* 100 (1): 3-16.
- Ciccarese F. & Cirulli M. (1980) Further field trials for the control of *Leveillula taurica* in tomato, pepper and eggplant. *Informatore Fitopatologico* 30 (11-12): 35- 39.
- Elad Y. (2000) *Trichoderma harzianum* T39 preparation for biocontrol of plant diseases: Control of *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum* and *Cladosporium fulvum*. *Biocontrol Science and Technology* 10(4): 499-507.
- Elad Y., Kirshner B. & Szejnberg A. (1998) Management of powdery mildew and gray mold of cucumber by *Trichoderma harzianum* T39 and *Ampelomyces quisqualis* AQ10. *Biocontrol* 43 (2): 241-251.
- Fallik Elezar, Oded Ziv, Shoshana Grinberg, Sharon Alkalai & Klein Joshua D. (1997) Bicarbonate solutions control powdery mildew (*Leveillula taurica*) on sweet red pepper and reduce the development of postharvest fruit rotting. *Phytoparasitica* 25 (1): 41- 43.
- Fiume F. (1997) Therapeutical or protective effects of two new fungicides against powdery mildew on sweet pepper and their physiological implications. Mededelingen Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen Universiteit Gent 62 (3B): 1141- 1150.
- Goidanish G. (1964) Handbook of Phytopathology, vol. II. Ed. Giourdas Athens, pp. 629-634.
- Grigaliunaite B. (1999) *Leveillula taurica* (Lev.) Arnaud on *Solanum melongena* L. - new powdery species in Lithuania. Horticulture and vegetable growing. *Scientific Works* 18 (3): 195- 199.

- Jarvis W.R. & Slingsby K. (1977) The control of powdery mildew of greenhouse cucumber by water sprays and *Ampelomyces quisqualis*. *Plant Disease Reporter* 61: 728-730.
- Kranz J., Schmatterer H. & Koch W. (1981) Maladies, ravageurs et mauvaises herbes des cultures tropicales. Ed. Verlag Paul Parey, Berlin et Hambourg, pp. 130-132.
- Malathrakis N.E. (1978) An olive tree disease caused by the fungus *Leveillula taurica* (Lev.). *Ann. Agricultural Research II*: 192-199 [In Greek].
- McGrath M.T. & Shishkoff N. (1999) Evaluation of biocompatible products for managing cucurbit powdery mildew. *Crop protection* 18(7): 471-478.
- Moriondo F. (1955) Un nuovo parassita dell'olivo. *Rivista "Olearia"* 9: 69-71.
- Mukerji K.G. (1968) CMI description no 82. *Leveillula taurica*.
- Palti J. (1971) Biological characteristics, distribution and control of *Leveillula taurica* (Lev.). *Ann. Phytopathologia Mediterranea* 10: 139-153.
- Pasini C., Daquila F., Curir P. & Gullino ML (1997) Effectiveness of antifungal compounds against rose powdery mildew (*Sphaerotheca pannosa* var. *rosae*) in glasshouses. *Crop Protection* 16(3): 251-256.
- Rathore B.S. & Rathore R.S. (1995) Studies on varietal resistance and chemical control of powdery mildew of Fenugreek (*Trigonella foenum-graceum*). *Indian Journal of Mycology and Plant Pathology* 25 (3): 260- 262.
- Reuveni R., Dor G. & Reuveni M (1998) Local and systemic control of powdery mildew (*Leveillula taurica*) on pepper plants by foliar spray of mono-potassium phosphate. *Crop protection* 17(9): 703-709.
- Szteinberg A. (1998) Biological control of powdery mildew by *Ampelomyces quisqualis* in protected crops. 7th Intern. Congress of Plant Pathology, 9-16 Aug., Edinburgh, Scotland.
- Wilson M. (1997) Biocontrol of aerial plant diseases in agriculture and horticulture: current approaches and future prospects. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 19(3): 188-191.

Study of the possibility to control olive powdery mildew (*Leveillula taurica*) with the use of soft and biological fungicides

Olive powdery mildew caused by the fungus *Leveillula taurica* (Lev.) Arnaud. could cause, under favourable conditions, serious damages in young vegetation. Infection is more severe at the leaves of new vegetation of rejuvenated olive trees, young nursery trees and olive leaf-cuttings. This work studies the possibility to control the pathogen with the use of soft and biological fungicides. Wetting sulphur in the dose of 400 g/hl of the commercial product Thiovit 80 WP and the biological product based on the antagonistic fungus *Ampelomyces quisqualis* Ces. Schlecht. (strain M-10) in the dose of 5 g/hl of the commercial product Aq10 were used. These products could also be used in organic oliviculture after authorisation from the organization for control and certification of biological products. The fungicide pyrifenoxy in the dose of 20 ml/hl of the commercial product Dorado 20 EC was used as reference product. The trial took was conducted on the rejuvenated olive trees of Koroneiki cultivar. Estimation of the effectiveness was based on the measurement of infected leaves as well as on the percentage of leaf fall. Taking leaf infection as criterion, sulphur as well as biological product controlled, under the conditions of the experiment, the pathogen with an effectiveness ranging from 99.4 to 99.7% that did not differ significantly from the reference product (99,7%) while infection at the control plots increased to 89,4-91,5%. Regarding the criterion of leaf fall, effectiveness ranged from 97.1% for sulphur and from 97.2 to 97.4% for the biological product.

Screening of salt tolerant *Olea europaea* L. seedlings by *in vitro* technology

Tania BRACCI, Antonio MINNOCCI & Luca SEBASTIANI

Scuola Superiore Sant'Anna di Studi Universitari e di Perfezionamento, I-56100, Pisa, Italia
E-mail: bracci@sssup.it, minnocci@sssup.it, l.sebastiani@sssup.it

1. INTRODUCTION

Salinity is one of the main stress factor limiting agricultural development and crop productivity in the world. This problem, that especially interests arid and semiarid areas, is due to the high evapo-transpiration and to the use of salt water to irrigate which result in a gradual increase of salts concentration in the soil. Approximately 25% of the worldwide soil is considered saline and about the half of irrigated soil surface is seriously affected by salinity. It is estimated that 10 million hectares of cultivated land are annually left uncultivated because of the salinization as a result of irrigating with low quality water. Since this trend is in rapid growth, it is necessary to utilize also these marginal lands and plant crops that can establish and be productive on these soils (Flowers *et al.*, 1995).

Olive (*Olea europaea* L.) is a glycophytic species of intermediate tolerance to salinity (Rugini & Fedeli, 1990), but it is more salt and drought tolerant than the other fruit trees. It is one of the major crops of the mediterranean area and so is cultivated in high salinity and drought conditions. The level of olive resistance to salinity depends on genotype and is highly variable between cultivars. In olive, as in the other nonhalophytes plants, salt exclusion and compartmentation in the roots is the mechanism that limits the ions translocation to the shoot. This capacity to exclude Na^+ and Cl^- ions is the basis of the different salinity tolerance among the cultivars (Gucci & Tattini, 1997).

In vitro culture is a method largely used to select plant species because it is a valid and fast system to screen plants for the resistance to stresses (Lombardi *et al.*, 2003; Vijayan *et al.*, 2003).

This technique presents a major control of cultural conditions than *in vivo* system; in fact *in vitro* cultures permit a precise measurement of growth and response to the imposed treatment. The use of *in vitro* cultures to test stress resistance simplify the interpretation of plant responses, particularly in the case of salinity where there are complex interactions between the plant and the different soil components.

Only recently some work about the response of *in vitro* grown olive plant to salinity (Shibli *et al.*, 2002) and osmotic (Brito *et al.*, 2003) stresses have been reported.

The aim of this work is to evaluate the effects of different concentrations of NaCl on the growth of *in vitro* olive plantlets obtained from olive seedlings and established *in vitro* by embryoculture. The seedlings analyzed originated from seeds of free-pollinated plants of Frantoio and Moraiolo cultivars which, respectively, have high and medium resistance to salinity.

Moreover, cellular distribution of the Na⁺, Cl⁻ and K⁺ ions in frozen-hydrated leaf tissues was examined using Low-temperature Scanning Electron Microscopy and energy-dispersive X-ray microanalysis. Actually, to study explants cultivated *in vitro*, which are very fragile and living in a high humidity conditions, this technique is the best choice to analyze actual morphological and microanalytical composition of the different organs (Sebastiani *et al.*, 2001), without artifacts and ions translocation.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. *In vitro* experiment

Drupes of free-pollinated plants of Frantoio and Moraiolo cultivars were broken and seeds were collected. Seeds were washed for 15 minutes and sterilized with 70% alcohol for 2 minutes and with 20% sodium hypochlorite for 15 minutes. They were rinsed three times with sterile distilled water for 5 minutes. The sclerified endocarp was aseptically broken using a vice and the embryos enclosed into the endosperm were placed on a double layer of sterile filter paper inside a 100 mm glass Petri dish. Three ml of sterile distilled water were added and the Petri were placed for five days at 23°C in the darkness. The embryos were then removed from endosperm with a scalpel under sterile conditions, placed on half strength Olive Medium (OM) (Rugini, 1984). After 45 days of culture from every plantlets were excised the single nodes, placed on OM containing 1 mg/l *trans*-zeatine riboside and subcultured every 6 weeks using axillary buds.

Seedling lines with high proliferative coefficient (data not shown) were selected for these experiments to apply the saline stress only to plantlets well adapted to the *in vitro* conditions.

Apices from six-weeks-old subcultures of the six seedling lines chosen (Frantoio A, C, Z and Moraiolo G, J, Z) were placed in sterile tube with 5 ml of OM medium added with *trans*-zeatine riboside and increasing NaCl concentrations (0, 50, 100, 200 mM). Growth conditions were 24°C temperature and 16/8 h day/night photoperiod and 55 µmol PAR m⁻² s⁻¹ light intensity.

Fresh (FW) and dry (DW) weights of the plantlets were evaluated at 6 weeks from the beginning of the treatment. DW was recorded on oven dried (60°C) plantlets until constant weight was reached. Relative growth rate (RGR) for FW and DW was calculated using the equation:

$$\text{RGR} = (\ln W_2 - \ln W_1) / t_2 - t_1$$

where “W” is whole plant fresh or dry weight and “t” is the time. Subscripts 1 and 2 denote the initial (0 days) and final time (42 days). The experimental design was a complete random block with ten replicates per treatment. Analysis of variance was used to determine significant differences and the LSD test was employed for mean comparison at 5%.

2.2. Energy-dispersive X-ray microanalysis of frozen-hydrated leaf tissues

Leaves from the most basal node of Frantoio C and Z and Moraiolo J and Z plants, treated with 200 mM NaCl, were analysed in energy-dispersive X-ray microanalysis (EDXMA). The advantages and limitations of EDXMA analysis of frozen hydrated (FH) plant tissues have been critically reviewed by Van Steveninck and Van Steveninck (1991) and Frey (2006). A small portion from the middle of the leaves was excised, mounted in a stub and rapidly frozen in liquid nitrogen. The sample was transferred to a dedicated SEM cryo-preparation chamber (SCU 020 SEM Cryo Unit-Bal-Tec) and freeze-fractured by a motor-driven fracturing microtome at -120°C just above the level of the stub to reveal the surfaces of cells. FH samples were surface etched for 5 min at -80°C under high vacuum ($P < 2 \times 10^{-4}$ Pa) and sputter-coated with 3 nm of gold (measured by a quartz thin-film monitor) in an argon atmosphere ($P < 2.2 \times 10^{-2}$ Pa) to produce an electrically conductive surface. Frozen-hydrated (FH) specimen was then transferred to a cryo-stage (-180°C) inside a scanning electron microscope (Philips SEM 515, Eindhoven, the Netherlands) equipped with a SEM Cryo Unit SCU 020 (Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein). EDXMA analysis was performed in the SEM using an acceleration voltage of 17 kV, a take-off angle of 16.5° and a working distance (sample to final lens of SEM) of 12.0 mm. Spectra from 0 to 20 keV were collected at increments of 10 eV per channel with the electron beam focused on a spot area in the center of selected cells. The background and element-specific peak spectra were analysed using the program EDAX DX-4 2.0 (EDAX, San Francisco, CA, USA), which fully deconvolutes the spectra and allows the corrections for interference between elements. The results are presented as peak/background ratios percentage for Na^+ , Cl^- and K^+ and Ca^{++} elements. In addition, two-dimensional distribution pattern was recorded by scanning area of the specimen repeatedly for 30 min and integrating the counts for the most abundant elements Na^+ , Cl^- and K^+ , within their respective spectrum windows into dot maps. Therefore, the dot maps collected provided only qualitative information of element distribution and were not sensitive in depicting small variations.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Effects of the NaCl treatments on the *in vitro* olive plantlets growth

Six seedling lines obtained from free-pollinated plants of Frantoio and Moraiolo cultivars were established *in vitro* for one year and tested for salinity resistance. The response to increasing NaCl concentrations was evaluated as RGR of FW and DW (Tables 1 & 2).

ANOVA analysis of FW and DW RGR data shows that the Moraiolo lines are most sensitive than Frantoio lines at the different NaCl treatments (Tables 1 & 2).

Between the different Frantoio seedling lines was found few differences in the FW and DW RGR values following to the salt treatment applied. The FW RGR analysis indicates a significant different response only to 200 mM NaCl concentration for Frantoio A and C, while Frantoio Z not shows significant differences in the growth between the salt treatments. The DW RGR data confirm the FW RGR analysis only for Frantoio C, showing different responses to 200 mM NaCl. Frantoio Z and A lines not showing growth differences between the thesis results the more Frantoio seedlings salt tolerant.

Between the different Moraiolo lines results more significantly different responses to NaCl stress. In fact, Moraiolo J and Z show FW significant reduction at 200 mM of NaCl, while Moraiolo G reduces significantly its growth already at 100 mM of NaCl. The DW RGR analysis indicates a significant growth reduction at 100 mM salt concentration in Moraiolo G and J lines, while Moraiolo Z is sensitive only to 200 mM NaCl treatment, showing higher salt tolerance than the other Moraiolo lines.

These data show that the more salt sensitive Frantoio seedlings start to respond negatively to salt only at the highest NaCl concentration (200 mM), showing higher salinity tolerance than Moraiolo lines that significantly reduce their growth at 100 mM NaCl.

Table 1. FW RGR of Frantoio and Moraiolo seedling lines at increasing NaCl concentrations. Different letters indicate significance at least at 5%

NaCl (mM).....				A*
	0	50	100	200	
Frantoio A	2.68 ± 1.02 a	2.44 ± 0.90 a	2.11 ± 0.86 ab	1.53 ± 0.92 b	*
Frantoio C	2.62 ± 0.77 a	2.79 ± 0.70 a	2.26 ± 0.63 ab	1.68 ± 0.97 b	*
Frantoio Z	1.69 ± 0.47	1.86 ± 0.45	1.86 ± 1.59	1.19 ± 0.64	n.s.
Moraiolo G	2.40 ± 0.75 a	3.00 ± 0.94 ab	2.33 ± 0.62 b	1.60 ± 0.41 c	**
Moraiolo J	2.49 ± 1.27 a	2.22 ± 0.59 a	1.84 ± 0.48 ab	1.43 ± 0.45 b	*
Moraiolo Z	2.77 ± 0.88 a	2.83 ± 0.53 a	2.77 ± 0.49 a	1.26 ± 0.29 b	***

* A: ANOVA 1 way

Table 2. DW RGR of Frantoio and Moraiolo seedling lines at increasing NaCl concentrations. Different letters indicate significance at least at 5%

NaCl (mM).....				A*
	0	50	100	200	
Frantoio A	2.79 ± 0.80	2.43 ± 0.68	2.30 ± 0.63	2.04 ± 0.75	n.s.
Frantoio C	2.51 ± 0.75 a	2.52 ± 0.59 a	2.03 ± 0.59 ab	1.77 ± 0.86 b	*
Frantoio Z	2.30 ± 0.41	2.40 ± 0.97	2.10 ± 1.11	1.82 ± 0.53	n.s.
Moraiolo G	3.52 ± 0.97 a	3.07 ± 0.65 ab	2.79 ± 0.69 bc	2.43 ± 0.38 c	**
Moraiolo J	2.81 ± 1.07 a	2.21 ± 0.48 ab	1.94 ± 0.29 b	1.61 ± 0.56 b	**
Moraiolo Z	3.28 ± 0.86 a	2.94 ± 0.53 a	2.83 ± 0.78 a	2.10 ± 0.32 b	**

* A: ANOVA 1 way

3.2. Distribution of Na, Cl and K in different leaf tissues

In vitro olive leaves are obviously not completely developed, so structural characteristics of the different leaf layers showed by LTSEM images (Figures 1d; 2d) of FH *lamina* transverse freeze-fractures, do not correspond to those usually known. The palisade layer (*p*) shows only one layer of cells and spongy mesophyll (*s*) cells are completely compacted, without any intercellular space, as is expected for mature leaves. In addition, both the upper (*ue*) and lower (*le*) epidermal cells are very small in size.

From Frantoio C and Frantoio Z seedling lines (showing a different growth response to NaCl treatment) were collected EDXMA dot maps (Figures 1 and 2) to analyse the qualitative element distribution inside FH freeze-fractured leaves. Na⁺, Cl⁻ and K⁺ have been found in different leaf tissues throughout the whole freeze-fractures, but with a different pattern between Frantoio C (most sensitive) and Moraiolo Z (less sensitive) samples, when treated with 200 mM NaCl.

While Frantoio C shows a uniform distribution of Na⁺ and Cl⁻ in all the leaf tissues (Figure 1), in the Frantoio Z the presence of these two ions is scarcer, particularly in palisade mesophyll (Figure 2).

Regarding K⁺, that is an osmoprotectant and compete with Na⁺ for the uptake through plasma membrane channels (Liu *et al.*, 1998), is more present in Frantoio Z than in Frantoio C, confirming the best growth response of Frantoio Z to NaCl stress. We suppose that in Frantoio Z the uptake of K⁺ is less affected by the high NaCl concentration in the medium culture than in Frantoio C.

FH freeze-fractured leaves of Frantoio C and Z, Moraiolo J and Z were analysed by EDXMA for element-specific spectra in the different leaf cell layers. Semi-quantitative differences between different leaf cells in the ratios of peak/background reported to percent for Na⁺, Cl⁻ and K⁺ and Ca⁺⁺ were reported (Figure 3).

Na⁺ and Cl⁻ are every time more present in the mesophyll tissues than in the epidermis, excepted in Moraiolo Z, the seedling line resulted less sensitive to NaCl stress, as found also on EDXMA dot maps (Figure 2).

K⁺ was found in all the tissues, as expected, while Ca⁺⁺ is more present in the epidermis than in the mesophyll, except for Moraiolo Z. Ca⁺⁺ was also analysed because it is an important factor in salinity tolerance, sustaining K⁺ transport and K⁺-Na⁺ selectivity in Na-challenged plants (Liu *et al.*, 1998).

These results indicate that Na⁺ and Cl⁻ uptake in leaf tissues is considerable and differently localized in the seedling lines, according with the plantlet growth responses to NaCl treatments.

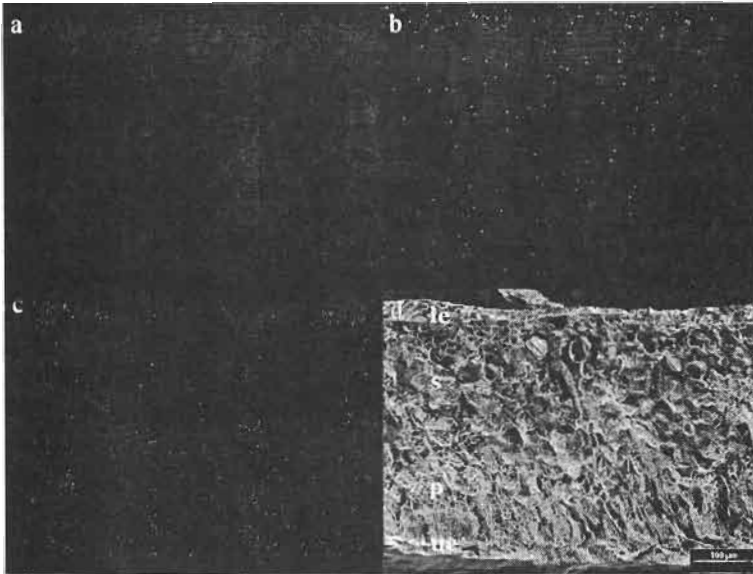


Figure 1. EDXMA dot maps for K⁺ (a), Na⁺ (b) and Cl⁻ (c) of leaf *lamina* transverse freeze-fracture of *in vitro* Frantoio C seedling (most sensitive) cultivated at 200 mM NaCl (d); *le* (low epidermis), *s* (spongy mesophyll), *p* (palisade mesophyll), *ue* (upper epidermis)

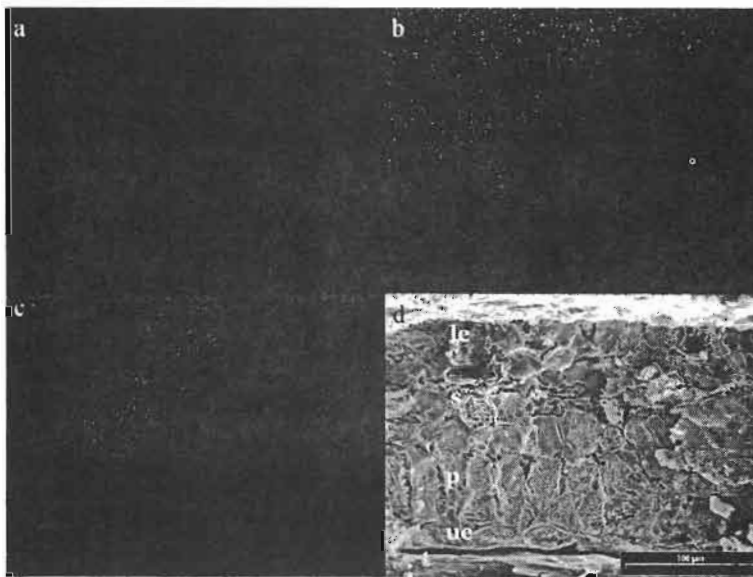


Figure 2. EDXMA dot maps for K⁺ (a), Na⁺ (b) and Cl⁻ (c) of leaf *lamina* transverse freeze-fracture of *in vitro* Frantoio Z seedling (less sensitive) cultivated at 200 mM NaCl (d); *le* (lower epidermis), *s* (spongy mesophyll), *p* (palisade mesophyll), *ue* (upper epidermis)

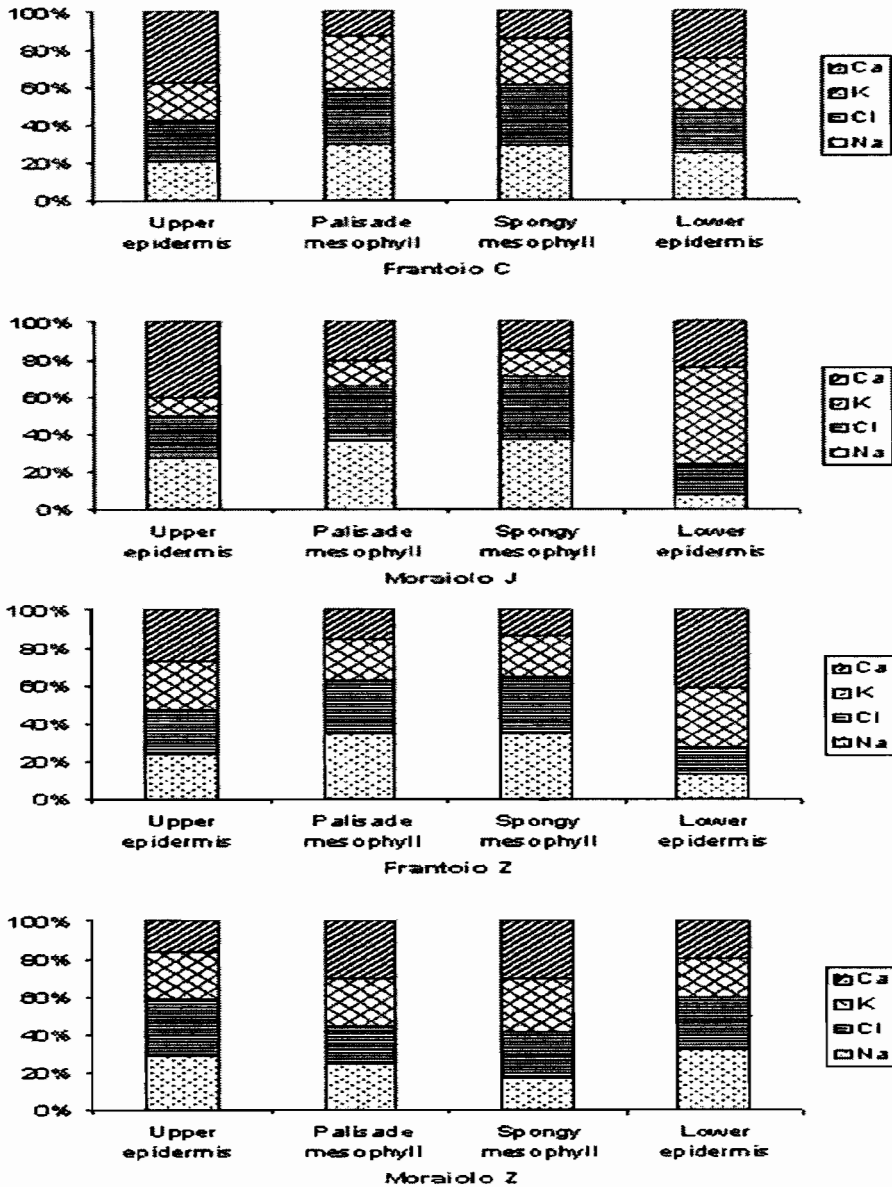


Figure 3. EDXMA peak/background ratios percentage of Na^+ , Cl^- , K^+ and Ca^{++} ions in the different leaf cell layers of Frantoio C (most sensitive), Frantoio Z (less sensitive), Moraiolo J (most sensitive) and Moraiolo Z (less sensitive)

4. CONCLUSIONS

This work shows the opportunity of using *in vitro* culture and the Low-temperature Scanning Electron Microscopy/energy-dispersive X-ray microanalysis techniques to discriminate salinity plant responses.

5. REFERENCES

- Brito G., Costa A., Fonseca H. & Santos C.V. (2003) Response of *Olea europaea* ssp. *maderensis* *in vitro* shoots exposed to osmotic stress. *Scientia horticulturae* 97: 411-417.
- Flowers T.J. & Yeo A.R. (1995) Breeding for salinity resistance in crop plants: where next? *Austral. J. Plant Physiol.* 22: 875-884.
- Frey B. (2006) Botanical X-ray microanalysis in Cryo-Scanning Electron Microscopy. *In: Electron Microscopy: Methods and Protocols*, J. Kuo (ed.), second edition. Humana Press Inc. (in press).
- Gucci R. & Tattini M. (1997) Salinity tolerance in olive. *Horticultural Reviews* 21: 177-213.
- Liu J. & Zhu J. (1998) A calcium sensor homolog required for plant salt tolerance. *Science* 280: 1943-1945.
- Lombardi L., Sebastiani L. & Vitagliano C. (2003) Physiological, biochemical, and molecular effects of *in vitro* induced iron deficiency in peach rootstock Mr.S 2/5. *Journal of Plant Nutrition* 26 (10-11): 2149 - 2163.
- Rugini E. (1984) *In vitro* propagation of some olive (*Olea europaea sativa* L.) cultivars with different root-ability, and medium development using analytical data from developing shoots and embryos. *Scientia Horticulturae* 24: 123.
- Rugini E. & Fedeli E. (1990) Olive as an oilseed crop, pp. 593-641. In.: Y.P.S. Bajaj (ed.), Legumes and oilseed crops, vol.10. Springer-Verlag, Berlin.
- Sebastiani L., Minnocci A., Vitagliano C., Gribaudo I. & Novello V. (2001) Morphological and anatomical studies on *in vitro* grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Nebbiolo) plants by Low Temperature Scanning Electron Microscopy. *Adv. Hort. Sci.* 15 (1-4): 103-111.
- Shibli R.A. & Al-Juboory K. (2002) Comparative responses of Nabali olive microshoot, callus and suspension cell culture to salinity and water deficit. *Journal of Plant Nutrition* 25(1): 61-74.
- Van Steveninck R.F.M. & Van Steveninck M.E. (1991) Microanalysis. *In Electron Microscopy of Plant Cells* (eds J.L. Hall & C. Hawes), pp. 415-455. Academic Press, London.
- Vijayan K., Chakraborti S.P. & Ghosh P.D. (2003) *In vitro* screening of mulberry (*Morus spp.*) for salinity tolerance. *Plant Cell Reports* 22: 350-357.

Screening of salt tolerant *Olea europaea* L. seedlings by *in vitro* technology

Olive (*Olea europaea* L.) is one of the major crops of the mediterranean area and is cultivated in high salinity and drought conditions. The salinity is one of the main stress factors limiting olive productivity. Approximately 25 % of the world wide soil is considered saline; moreover it is estimated that about half of irrigated soil surface is seriously affected by salinity and that 10 million hectares of cultivated land are annually left uncultivated because of salinization as a result of irrigating with low quality water. The level of olive resistance to salinity depends on genotype and this is highly variable between cultivars. The aim of this work was to test NaCl tolerance of different olive seedlings by *in vitro* techniques. The seedlings analysed originated from seeds of free-pollinated plants of Frantoio and Moraiolo cultivars which, respectively, have high and medium resistance to salinity. The clonal progenies from each seedling were established *in vitro* by embrioculture and axillary buds propagation. Each progeny has been tested for NaCl tolerance on Olive Medium (OM) supplemented with 0, 50, 100 and 200 mM of NaCl for six weeks. The parameters used to test genotype tolerance were dry weight (DW) and fresh weight (FW). Leaf anatomical response and NaCl tissue localization on freeze-fractured frozen-hydrated samples by Low Temperature Scanning Electronic Microscopy (LTSEM) and energy-dispersive X-ray Microanalysis (EDXMA) have been evaluated on the plantlets exposed to higher NaCl treatment.

Élevage en masse des *Trichogrammes* spp. Amélioration des conditions de production

Imen BLIBECH¹, Mohiedine KSANTINI¹ & Taieb JARDAK¹

¹ Unité de recherches: Protection des Plantes Cultivées et Environnement. Institut de l'Olivier
BP 1087 - 3000 Sfax, Tunisie
Auteur correspondant, courriel: jardak.taieb@iresa.agrinet.tn

1. INTRODUCTION

Les parasitoïdes oophages du genre *Trichogramma* sont considérés comme l'exemple de réussite le plus spectaculaire dans la conception moderne de la lutte biologique. Ils peuvent être élevés massivement sur un hôte de substitution: *Ephestia kuehniella* dont les œufs sont particulièrement performants pour la multiplication des trichogrammes (Voegelé *et al.*, 1974).

Dans ce but, les études ont surtout porté sur le rendement des élevages de l'hôte, qui suppose des vitesses de développement rapides et des fécondités importantes associées à des contraintes biotechnologiques réduites.

Le bon développement des trichogrammes est conditionné par la qualité des œufs hôtes présentés au parasitoïde (Pizol & Voegelé, 1988). Ainsi, le stockage au froid durant des périodes plus ou moins longues peut altérer la qualité des œufs hôtes et, par voie de conséquence, les potentialités biotiques des parasitoïdes multipliés (Voegelé *et al.*, 1974).

C'est pourquoi, on a essayé de déterminer les conditions optimales d'élevage de l'hôte de substitution *Ephestia kuehniella* et d'évaluer l'impact des améliorations sur les potentialités biotiques des Trichogrammes destinés à être utilisés en lutte biologique sous forme de lâchers inondatifs contre les lépidoptères, principalement la teigne de l'olivier *Prays oleae*.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. Production de l'hôte, *Ephestia kuehniella* ZELL. (*Lepidoptera*, *Pyralidae*)

L'élevage d'*E. kuehniella* passe par différentes étapes: ensemencement de l'aliment utilisé par les œufs de la pyrale de la farine, développement larvaire sous conditions contrôlées, émergence et collecte des papillons en pondoirs, récolte des œufs pondus, traitement et stockage des œufs hôtes en vue de leur utilisation pour la multiplication des parasites oophages.

2.1.1. Conditions d'ensemencement de l'aliment

2.1.1.1. Dispositif d'élevage utilisé

Les prises alimentaires au cours du développement larvaire s'effectuent dans des boîtes carrées en matière plastique transparente, qui mesurent 21 x 21 x 8 cm, munies chacune d'un couvercle emboîtant en matière plastique opaque troué au centre d'un carré de 12 x 12 cm, lequel est couvert d'un tissu blanc en mousseline servant à l'aération de la boîte.

2.1.1.2. Milieu d'élevage

2.1.1.2.1. Aliment et dose appliquée

Les résultats d'études concernant l'alimentation montrent le bien fondé de l'utilisation de la semoule de blé dur comme étant un milieu complet aux larves (Daumal & Pintureau, 1985) et de la pratique du renouvellement total de l'aliment à chaque génération dans les élevages intensifs d'*E. kuehniella* (Daumal *et al.*, 1975). Étant encore abondant sur le marché et commode d'emploi, il a été adopté.

La dose de semoule appliquée est choisie selon le mode de remplissage des alvéoles dans l'enceinte de développement larvaire et nymphal (Daumal *et al.*, 1975). Dans le cas de nos essais, l'enceinte contient une plaque carrée en carton de 20 x 20 cm à laquelle sont collés des blocs de carton alvéolés. Ces alvéoles sont à faces rectangulaires de 1 cm de côté, de 2,5 cm de hauteur, 2 mm d'épaisseur et 80 alvéoles au mètre.

Pour le choix de la dose, on s'est inspirés de la méthode utilisée par Daumal *et al.* (1985) qui recommande un remplissage des alvéoles au $\frac{1}{2}$. Ce rapport est utilisé pour des alvéoles cylindriques de 1 cm de côté et de 2 cm de hauteur. On a réparti ainsi la semoule, uniformément à l'aide d'un entonnoir jusqu'à remplissage des alvéoles à une hauteur de 1,9 cm. La quantité d'aliment retenue est pesée, soit 420 g. À partir de ce test, on a retenu trois doses (300, 400 et 500 g) pour étudier leur impact sur les performances des papillons produits.

2.1.1.2.2. Œufs hôtes (qualité et quantité)

Les œufs hôtes ensemencés dans la semoule proviennent de «pondoirs» contenant 1500 imagos. Trois catégories d'œufs ont été utilisés: œufs pondus durant les deux premiers jours (œufs des premières 48 heures de ponte), œufs émis au cours du 3^{ème} et du 4^{ème} jour de ponte (œufs des 2^{ème} 48 heures) et œufs pondus durant le 5^{ème} et le 6^{ème} jour (œufs des 3^{ème} 48 heures de ponte).

Ces œufs employés pour la contamination de la semoule ont subi 48 heures d'incubation à 20°C. Ce traitement les rend, en effet, beaucoup moins fragiles (Daumal *et al.*, 1975). La quantité d'œufs hôtes ensemencée est en relation avec la dose de semoule apportée à l'élevage, car la densité de population aura plus tard une très forte influence sur la durée de développement larvaire (compétition spatiale et alimentaire, présence excessive d'aliments préalablement utilisés: effets toxiques) (Daumal & Pintureau, 1985).

En se référant aux travaux de Daumal *et al.* (1975) pour la production en masse d'*Ephestia*, on a opté pour une quantité fixe de 45 mg d'œufs par boîte d'élevage et ce pour les trois doses de semoule (300, 400 et 500 g). Après 48 heures d'incubation à 20°C, les œufs sont mélangés dans 100 g de semoule prise à chaque dose à ensemercer. Le mélange est ensuite étalé minutieusement et d'une façon homogène à l'aide d'un petit tamis à mailles fines de l'ordre de 1 mm de diamètre.

2.1.2. Conditions d'élevage

Le dispositif expérimental comporte deux conditions thermiques:

- Développement continu à une température constante de 20°C du stade œuf jusqu'aux premières émergences des papillons.
- Développement à température alternée 20°C-12°C-20°C. L'élevage se déroule sur une période de trois mois environ: un mois à 20°C jusqu'à l'apparition du stade larvaire L3, ensuite les boîtes d'élevage sont transférées à la chambre de 12°C où a lieu un ralentissement du cycle de développement d'une cinquantaine de jours encore.

2.1.3. Collecte des adultes et mise en pondoirs

Dès leur émergence, les papillons s'accouplent aussitôt. Dans chaque boîte d'élevage, ils sont récoltés tous les deux jours au matin à l'aide d'un aspirateur de 1500 watts de puissance et transférés dans les pondoirs vers la chambre d'élevage des adultes. Le pondoir est formé d'un seau de collecte des papillons relié à sa base à une enceinte qui sert à la récolte des œufs pondus. Les papillons mis en pondoirs sont alimentés au miel durant toute leur vie. Le contrôle de la mortalité est basé sur le comptage du nombre d'adultes morts, qui tombent au fond du pondoir tous les 2 jours.

2.1.4. Ponte

2.1.4.1. Conditions de ponte

Selon Payne (1934), la fécondité optimale se situe aux alentours de 27°C. À cette température, une certaine stérilité s'établit chez les mâles (Norris, 1933). Il est souhaitable, cependant, d'obtenir des œufs d'âge connu et peu évolués, ce qui n'est réalisable qu'à des températures relativement peu élevées. Ces impératifs nous ont conduit à choisir la température constante de 20°C, avec une humidité relative de l'ordre de 60 à 65%, pour l'élevage et la ponte des imagos. La chambre d'élevage est équipée d'un climatiseur et dotée d'un thermohygrographe pour le contrôle régulier de la température et de l'humidité.

2.1.4.2. Récolte des œufs

Elle s'effectue manuellement en faisant vider soigneusement, en premier lieu, les pondoirs de leur contenu en œufs, ensuite, on essaye d'éliminer les écailles et les déchets qui adhèrent aux parois à l'aide de l'aspirateur. Les œufs sont recueillis et pesés. Cette opération se fait pour chaque pondoir, à part, tous les deux jours durant toute la période d'émergence des papillons à partir de chaque éclosoir.

2.1.5. Paramètres contrôlés

Les paramètres suivants sont contrôlés:

- Durées de développement et d'émergence des imagos.
- Quantité d'adultes sortis.
- Fécondité totale.

C'est la quantité totale d'œufs pondus par toutes les femelles collectées dans chaque pondoir durant leur vie.

2.1.6. Traitements et nombre de répétitions

La production en masse des œufs d'*Ephestia kuehniella* est réalisée en adoptant un essai multifactoriel avec trois répétitions au niveau de chaque traitement élémentaire.

* Facteur I: Température d'élevage avec deux traitements: Tc et Ta

Ta: Développement continue à température constante de 20°C.

Tc: Développement sous températures alternées de 20°C-12°C-20°C.

* Facteur II: Dose de semoule à ensemercer avec trois doses:

D1: 300 g

D2: 400 g

D3: 500 g

* Facteur III: qualité des œufs ensemençés dans la semoule, qui ont servi à l'ensemencement de la semoule: œufs des 1^{ères}, 2^{èmes} et 3^{èmes} 48 heures de ponte.

Ainsi, on a obtenu des séries de combinaisons faisant intervenir la dose de semoule, la qualité des œufs ensemençés et la température d'élevage, totalisant 54 boîtes d'élevages qui serviront elles-mêmes d'éclosoirs pour l'émergence des papillons.

2.2. Production des parasitoïdes du genre *Trichogramma*

2.2.1. Souches de trichogrammes testées

L'effet de la qualité des œufs hôtes a été testé sur des souches de Trichogrammes appartenant à l'espèce *Trichogramma oleae*. La souche 2 importée en 1986 de France et maintenue en élevage permanent à l'Institut de l'Olivier et la même souche (2F) introduite de France en 2001 ont été comparées avec celle de 1986.

2.2.2. Durée de stockage au froid des œufs hôtes

Les œufs hôtes utilisés pour la multiplication des trichogrammes proviennent de deux types d'élevage d'*E. kuehniella* à températures alternées de 20-12°C et 20°C et de la ponte des papillons durant les 1^{ères} 48 heures. Ces œufs ont subi trois durées progressives de stockage au froid à 3°C: 48 heures (2 jours), 96 heures (4 jours) et 144 heures (6 jours) après irradiation aux ultraviolets pendant 30 minutes.

2.2.3. Technique de parasitisme

La technique pratiquée pour la multiplication des souches dérive de celle qui a été suivie par Jardak (1980). Les femelles sont isolées individuellement dans des tubes à hémolyse et sont alimentées au miel pendant 24 heures avant de recevoir les œufs

hôtes à parasiter. Ainsi, chaque femelle dispose environ de 150 œufs d'*E. kuehniella* ayant subi 2 ou 4 ou 6 jours de stockage à 3°C. Les plaquettes contenant ces œufs hôtes sont ensuite renouvelées tous les deux jours jusqu'à la mort de la femelle. Pour chaque traitement, 18 répétitions ont été réalisées. Toutes les femelles des deux souches ont été testées toujours ensemble et dans les mêmes conditions. Ainsi, on a disposé au total 6 traitements pour les deux souches soit 108 répétitions (2 souches x 3 traitement x 18 répétitions).

Pour chaque femelle, sont notées la date de son émergence et celle de sa mort. Au cours de l'expérimentation, toutes les précautions sont prises afin d'éviter le traumatisme des femelles lors de l'introduction des plaquettes d'œufs hôtes. Tout accident entraîne l'élimination de la répétition.

2.2.4. Paramètre étudié

Le paramètre étudié durant cette étude est la fécondité totale exprimée par le nombre d'œufs parasités (noircis) par la femelle tout au long de sa vie, depuis le jour du démarrage de l'essai jusqu'à sa mort et considéré comme critère essentiel de performance des trichogrammes.

3. RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

3.1. Production de l'hôte, *Ephestia kuehniella* ZELL. (Lepidoptera, Pyralidae)

3.1.1. Effet des conditions d'élevage sur les durées de développement et d'émergence des imagos d'*Ephestia kuehniella*

Rappelons que les boîtes d'élevage de l'hôte de substitution *Ephestia kuehniella* sont utilisées elles mêmes comme des éclosiers pour l'émergence des imagos. Les durées de développement larvaire ainsi que les durées d'émergence des adultes pour tous les éclosiers aux deux températures d'élevage (continue et alternée) sont récapitulées dans le tableau 1.

Tableau 1. Durées de développement et d'émergence des imagos

Dose	Q.O*	...Température continue de 20°C.....				Températures alternées de 20°-12° et 20°C			
		D.Ecl*	NT*	D.Dév*	NJE*	D.Ecl*	NT*	D.Dév*	NJE*
300	1 ^{ères} 48h	D1A1Tc	3	48 ± 0	40 ± 0	D1A1Ta	3	121,6 ± 1,1	39,3 ± 0,6
300	2 ^{èmes} 48h	D1A2Tc	3	48 ± 0	40 ± 0	D1A2Ta	3	122,3 ± 1,5	39,6 ± 1,1
300	3 ^{èmes} 48h	D1A3Tc	3	47,6 ± 0,5	40 ± 0	D1A3Ta	3	121,3 ± 0,5	39,3 ± 0,5
400	1 ^{ères} 48h	D2A1Tc	3	48,6 ± 1,1	39,6 ± 0,5	D2A1Ta	3	121 ± 1	40 ± 0
400	2 ^{èmes} 48h	D2A2Tc	3	48 ± 0	40 ± 0	D2A2Ta	3	121,3 ± 0,5	40 ± 0
400	3 ^{èmes} 48h	D2A3Tc	3	48,6 ± 1,1	40 ± 0	D2A3Ta	3	121 ± 0	40 ± 0
500	1 ^{ères} 48h	D3A1Tc	3	48 ± 0	40 ± 0	D3A1Ta	3	121,6 ± 0,5	39,3 ± 0,6
500	2 ^{èmes} 48h	D3A2Tc	3	47,6 ± 0,5	39,6 ± 0,5	D3A2Ta	3	121 ± 0	40 ± 0
500	3 ^{èmes} 48h	D3A3Tc	3	48 ± 0	40,6 ± 0,5	D3A3Ta	3	122,3 ± 1,1	39,6 ± 0,5

* Dose en g; Q.O: Qualité des œufs; D.Ecl: Désignation des éclosiers; NT: Nombre de traitements; D.Dév: Durée de développement en jours; NJE: Nombre de jours d'émergence des adultes

Exp: D1, A1, Ta: dose de 300 g de semoule, œufsensemencés des 1^{ères} 48 heures et élevage à températures alternées de 20°-12°C et 20°C.

Il ressort du tableau 1 que les durées de développement larvaire à températures alternées sont beaucoup plus importantes que celles à température continue quelle que soit la dose de semoule et la qualité des œufs ensemencés. En effet, la différence de durée de développement larvaire entre les deux types d'élevage atteint 70 jours environ pour chaque traitement.

L'analyse de la variance a montré un effet significatif seulement de la température sur la durée de développement larvaire. Ainsi, la dose de semoule et la qualité des œufs ensemencés n'ont pas d'effet significatif sur cette durée.

Concernant les durées d'émergence, l'analyse statistique ne montre aucune différence significative entre tous les traitements réalisés. Cette durée est de 39 à 40 jours.

Le cycle de développement de la teigne de la farine de l'œuf jusqu'à l'apparition des premiers imagos à température continue de 20°C, dure 48 jours en moyenne. Par contre, lorsque l'élevage est conduit à températures alternées (20-12-20°C), le développement larvaire dure 40 jours en moyenne à 20°C jusqu'à l'apparition du stade L4. Ensuite et à partir de ce stade, le développement se poursuit encore 60 jours à la température de 12°C. Le début d'émergence des adultes s'observe presque une vingtaine de jours après transfert des boîtes d'élevage à la température de départ, c'est à dire à 20°C. Ainsi, la durée totale de développement de l'œuf jusqu'à l'apparition des premiers adultes à températures alternées est environ de quatre mois, soit 121, 52 jours en moyenne.

On peut penser que le développement larvaire s'est déroulé dans de bonnes conditions à cause des faibles écarts observés dans les dates de début d'émergence des adultes entre les différents éclosiers étudiés et ce pour les deux types d'élevage continu et alterné pris séparément.

En revanche et concernant les durées de développement larvaire, il en ressort que l'élevage à température continue de 20°C conduit à une durée de développement inférieure à celle qui est enregistrée à températures alternées (écart de 70 jours). Ainsi le développement à température constante de 20°C peut être envisagé dans les élevages intensifs vu la rapidité de déroulement du cycle vital de l'hôte.

À cette température, les premiers adultes d'*E. kuehniella* apparaissent après 48 jours, ce qui est conforme aux résultats rapportés par Daumal *et al.* (1975) qui signalent une période de 45 à 47 jours dans des conditions similaires. Cependant, le développement à températures alternées dure quatre mois jusqu'à l'apparition des premiers imagos. Cet écart de 70 jours s'explique par les conditions abiotiques du milieu d'élevage. Les conditions thermiques jouent, en effet, un rôle important dans la modification des durées du développement larvaire. Ainsi, Daumal & Pintureau (1985) ont montré que l'élevage à une température de 20°C allonge la durée de développement par rapport à une température de 25°C. D'après Payne (1934), le cycle évolutif d'*E. kuehniella* dure 25 à 65 jours à 32°C et se prolonge pendant 110 à 205

jours à 10°C. D'autres études ont montré que le passage aux basses températures évite l'échauffement brutal du milieu et allonge le développement larvaire (Daumal *et al.*, 1975). On observe, dans ce cas, des retards de nymphose des chenilles du dernier stade. Ainsi, ce blocage de la nymphose à 12°C contribue à l'allongement du cycle de développement larvaire se manifestant par une sorte de quiescence larvaire provoquée par le passage sous basses températures.

Cette quiescence provoquée permet à cette espèce, qui ne possède pas de diapause, d'étaler son cycle de développement. Cette plasticité du développement de l'hôte peut être exploitée pour des prévisions de production de l'auxiliaire parasitoïde

3.1.2. Effet des conditions d'élevage sur la quantité d'adultes d'*E. kuehniella* sortis

La quantité totale d'adultes sortis diffère d'un éclosoir (traitement) à l'autre (Figure 1). En effet, il apparaît que la température d'élevage, la dose de semoule employée et la qualité des œufsensemencés ont des effets perceptibles sur les quantités d'adultes obtenus.

Il ressort de la figure 1 l'existence d'un écart important entre les quantités d'adultes sortants (mâles et femelles) à partir de l'élevage à températures alternées de 20-12°C et 20°C par rapport à celles qui sortent de l'élevage à température continue de 20°C quelles que soient la dose de semoule et la qualité des œufsensemencés. Cependant, l'effet de la température est d'autant plus important que la dose de semoule augmente. Ainsi, cet effet ne devient perceptible et significatif que pour les doses de 400 et de 500 g de semoule et avec l'emploi des œufsensemencés les moins vieillis (Figure 1).

3.1.3. Effet des conditions d'élevage sur la fécondité des adultes d'*E. kuehniella*

La fécondité des femelles par période d'émergence est définie comme étant le rapport de la quantité totale d'œufs pondus par le nombre de femelles issues de chaque traitement au terme de chaque période d'émergence de 8 jours. Pour illustrer la fécondité des adultes émergés, la présentation des données est simplifiée en rassemblant les sorties par période de 8 jours, soit 5 périodes durant les 40 jours.

Les données relatives à l'évolution de la fécondité moyenne des femelles par période d'émergence exprimée en mg d'œufs par femelle pour les deux températures d'élevage et en tenant compte des trois doses de semoule et de la qualité des œufsensemencés sont illustrées par la figure 2.

Il en ressort que la fécondité des femelles tend généralement à diminuer au cours du temps pour tous les traitements réalisés. En effet, son évolution temporelle montre parfois une allure en dents de scie avec souvent une chute vertigineuse de la fécondité à la fin de la deuxième semaine et à la fin de l'émergence des adultes (Figure 2).

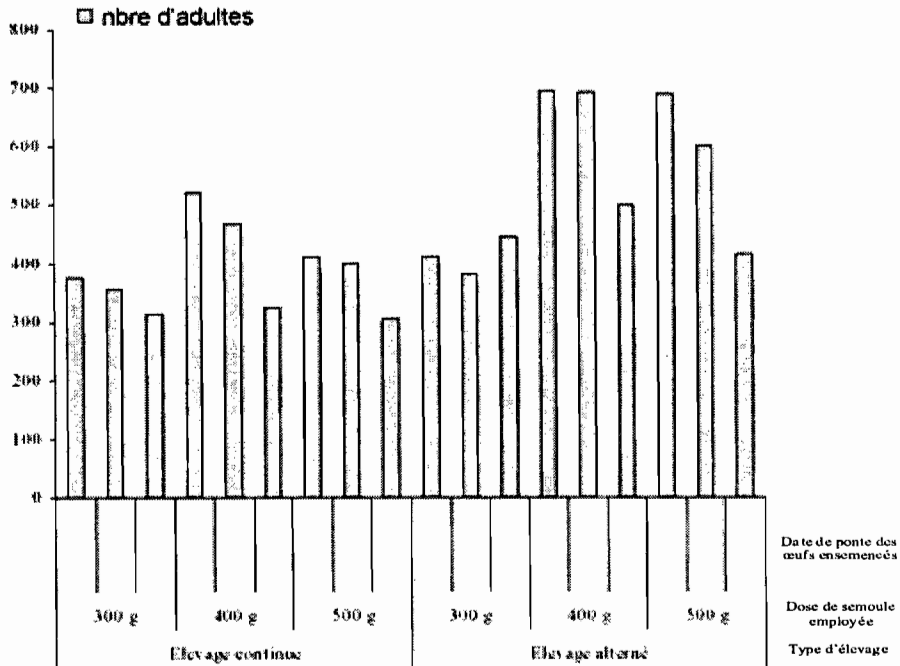


Figure 1. Effet de la température d'élevage sur le nombre d'adultes sortis à partir des différents éclosiers (Traitements)

Ainsi, les fécondités moyennes maximales qui atteignent plus de 6 mg d'œufs par femelle sont observées au cours de la première période d'émergence des adultes. Elles sont minimales à la dernière semaine de sortie.

Par ailleurs, les pontes maximales sont obtenues pour les traitements conduits seulement à températures alternées avec l'emploi de la dose de 400 g de semoule et les œufs des 1^{ères} 48 heures, mais aussi avec l'emploi de la dose 500 g et les œufs des 1^{ères} et des 2^{èmes} 48 heures.

En comparant les fécondités moyennes des femelles d'*E. kuehniella* pour les deux types d'élevages durant les cinq périodes d'émergence, on remarque qu'il y a un écart important en faveur de l'élevage à températures alternées (Figure 2). Cet écart varie avec la période d'émergence, la dose de semoule employée, mais aussi avec la qualité des œufs ensemencés.

La comparaison des deux types d'élevage montre que les différences significatives apparaissent au cours de la première quinzaine d'émergence des adultes (première et deuxième période) chez les lots ensemencés avec les œufs des 1^{ères} 48 heures de ponte quelle que soit la dose de semoule employée. De même, il y a un effet significatif qui apparaît au cours de la première, deuxième et troisième période pour les traitements

ensemencés avec les œufs des 2^{èmes} 48 heures et ce pour la dose de 500 g de semoule. Cependant, il n'y a pas d'effet significatif entre les deux types d'élevages dans le cas de l'emploi des œufs des 3^{èmes} 48 heures quelle que soit la dose de semoule utilisée.

Ces résultats montrent que la température d'élevage influe sur la fécondité moyenne des femelles. En effet, par le passage sous une basse température de 12°C, l'élevage à température alternée améliore sensiblement la fécondité des femelles obtenues quelle que soit la dose d'aliment mise à la disposition des chenilles quiescentes. Toutefois, cette amélioration est tributaire de la qualité des œufs ensemencés dans la mesure où on ne distingue aucune différence significative entre les deux élevages dans le cas de l'ensemencement des œufs des 3^{èmes} 48 heures et ce pour les trois doses de semoule et les cinq périodes d'émergence, alors que ce sont les œufs des 1^{ères} 48 heures qui permettent d'obtenir les meilleures performances des adultes.

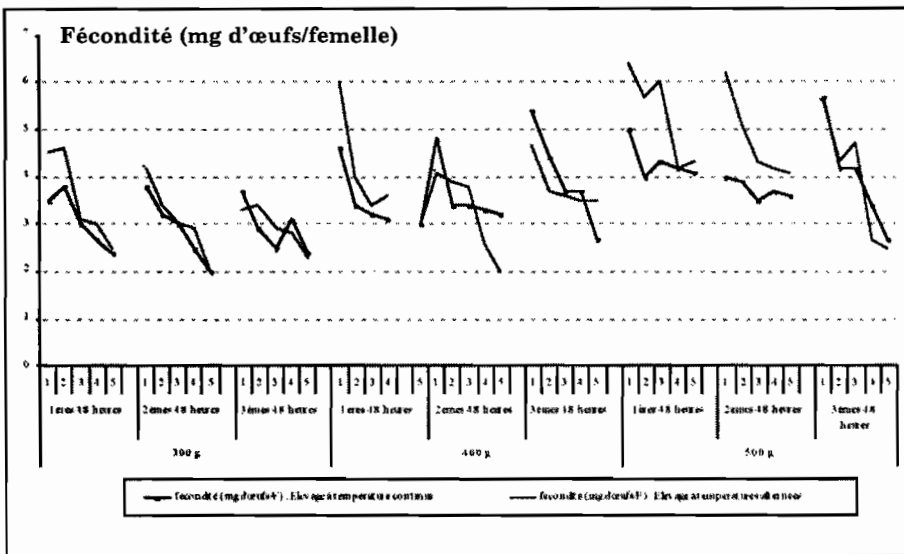


Figure 2. Fécondité moyenne des femelles issues des différents traitements durant les 5 périodes d'émergence (en mg d'œufs/ Femelle)

3.2. Impact de la qualité des œufs hôtes sur le potentiel biotique des parasitoïdes oophages du genre *Trichogramma*

3.2.1. Effet de la durée de stockage au froid sur la fécondité totale des deux souches de trichogrammes

Après avoir défini les conditions optimales pour une meilleure production quantitative et qualitative des œufs hôtes, on a essayé d'étudier l'effet de la durée de stockage des œufs d'*E. kuehniella* au froid sur les performances biologiques de deux souches de *Trichogramma oleae*: souche n°2 et souche n°2F, afin de déterminer la durée maximale

de stockage des œufs au froid au-delà de laquelle la qualité des œufs hôtes est altérée et affecte les performances du parasitoïde (Babi, 1985). Les données afférentes à la fécondité totale des deux souches testées en fonction de la durée de stockage des œufs hôtes sont illustrées par les figures 3 et 4.

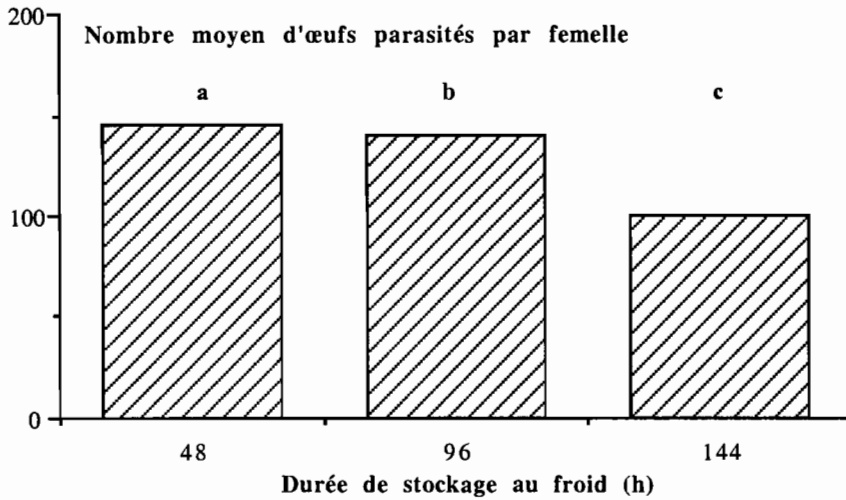


Figure 3. Fécondité totale de la souche 2 pour les trois durées de stockage au froid des œufs hôtes

(a, b: Les fécondités moyennes suivies de lettres différentes sont significativement différentes au seuil de 5%.)

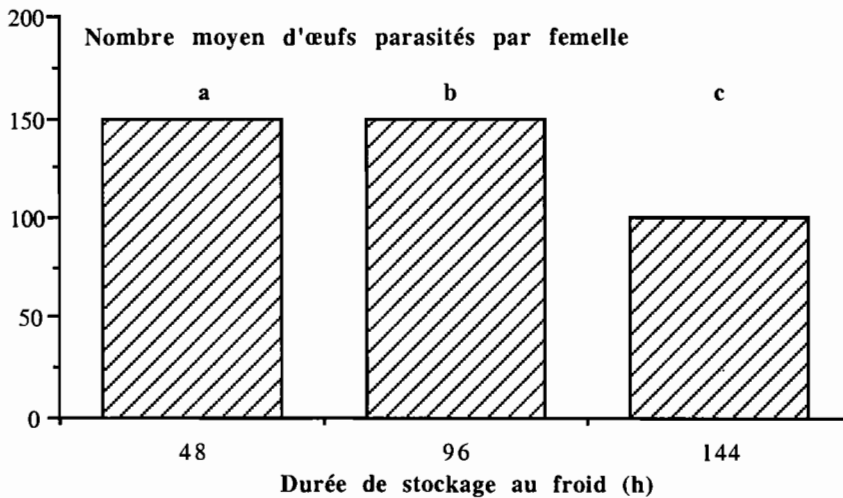


Figure 4. Fécondité totale de la souche 2F pour les trois durées de stockage au froid des œufs hôtes

(a, b et c ont la même signification que la figure 3)

Il ressort des deux figures 3 et 4 que quelle que soit la souche, la fécondité totale par femelle tend à régresser avec la durée de stockage des œufs au froid. Cependant, la diminution de la fécondité ne devient notable que lorsque la durée de stockage au froid atteint 6 jours. Ceci est confirmé par l'analyse statistique qui a mis en évidence des différences significatives entre les fécondités des femelles élevées sur des œufs stockés 6 jours au froid et ce aussi bien chez la souche 2F que chez la souche 2.

Par ailleurs, pour la souche 2, des différences significatives sont aussi enregistrées entre les œufs stockés pendant 2 jours et 4 jours au froid (Figure 3). Cependant, entre souches, le test statistique ne révèle de différences significatives que pour la durée de stockage de 6 jours par rapport à celles de 2 et 4 jours. Il s'ensuit que les fécondités des 2 souches ne sont pas différentes dans le cas où elles sont élevées sur des œufs d'*Ephestia kuehniella* stockés de 2 à 4 jours au froid. Ces derniers donnent la meilleure fécondité et sont, par conséquent, de meilleure qualité.

Ces résultats vont dans le même sens que ceux qui sont rapportés par Benoit & Voegelé (1978) qui montrent que les œufs d'*E. kuehniella* de 1 à 4 jours, au maximum et ceux de 3 jours étant les mieux acceptés par l'oophage et qu'au-delà de 5 jours d'âge, il y a une exploitation différentielle et même un rejet des œufs hôtes.

4. CONCLUSION

L'étude au laboratoire de l'impact de trois facteurs (température d'élevage, doses de semoule et qualité des œufs pour l'ensemencement du milieu alimentaire) sur le rendement de l'élevage et les performances des papillons obtenus (taille des adultes, fécondité et longévité des femelles, qualité des œufs pondus...), a abouti à la collecte d'une série de données dont l'exploitation et l'application permettent désormais de rationaliser et d'optimiser la productivité de l'élevage de l'hôte de substitution et d'améliorer la qualité des œufs, critère essentiel pour l'obtention de parasitoïdes vigoureux et performants.

En ce qui concerne la température d'élevage, on a démontré que la conduite sous les températures alternées 20-12-20°C, bien qu'elle rallonge la durée du développement larvaire, d'environ 70 jours par rapport à celle qui est enregistrée à température continue de 20°C, permet d'obtenir des adultes performants (poids notamment) en cas d'emploi d'une dose suffisante d'aliment (400 à 500 g de semoule).

La dose de semoule et la qualité des œufs utilisée pour sa contamination paraissent agir d'une façon significative sur la fécondité des papillons qui en émergent.

Les adultes les plus vigoureux sont obtenus aux doses de 400 et 500 g de semouleensemencées par 45 mg d'œufs de bonne qualité, en particulier ceux des premières et deuxièmes 48 heures de ponte dans le cas d'élevage à températures alternées et uniquement des 1^{ères} 48 heures pour l'élevage à température continue de 20°C.

L'effet de la dose d'aliment tend à s'atténuer lorsqu'on utilise des œufs des 3^{èmes} 48 heures montrant par là l'importance de la qualité des œufs pour la contamination du milieu alimentaire.

L'étude du potentiel biotique de deux souches de trichogrammes élevées sur des œufs stockés durant 2, 4 et 6 jours au froid, a permis de mettre en relief l'importance de la durée de stockage des œufs hôtes sur la fécondité des Trichogrammes. Cet effet commence à s'apercevoir dès que la durée de stockage dépasse 2 jours, mais ne devient vraiment notable qu'au-delà de 4 jours et plus précisément lorsque les œufs sont stockés 6 jours.

En effet, on a pu montrer que la fécondité des souches de *T. oleae* varie entre les œufs hôtes stockés 2 et 4 jours, mais devient fortement réduite avec les œufs stockés 6 jours au froid.

À la lumière de ces résultats, on peut conclure qu'aussi bien pour le maintien des souches en élevage permanent que pour la production en masse du parasitoïde en vue de son emploi en plein champ, il est recommandé d'utiliser des œufs hôtes conservés durant 2 à 4 jours au maximum au froid.

5. REMERCIEMENTS

This study was conducted with financial support from the commission of the European communities within the specific programme «Confirming the international Role of the Community Research»; contrat ICA4-CT-2001-10004 (Sustainable control of lepidopterous pests in olive groves - integration of egg parasitoids and pheromones).

6. RÉFÉRENCES CITÉES

- Babi A. (1985) Étude de deux espèces de trichogrammes: *Trichogramma maidis* Pintureau & Voegelé et *T. Dendrolimi* Matsumura (Hym., Trichogrammatidae): Choix et essais de sélection de l'espèce la plus efficace pour lutter contre *Ostrinia nubilalis* Hubner (Lep., Pyralidae) ». Thèse de Doctorat en écologie Méditerranéenne, Faculté des Sciences et Techniques de Saint-Jérôme p.73.
- Benoit M. & Voegelé J. (1978) Choix de l'hôte et comportement trophique des larves de *Trichogramma evanescens* (Hym, Trichogrammatidae) en fonction du développement embryonnaire de *Ephestia kuehniella* et *Ostrinia nubilalis* (Lep, Pyralidae). *Entomophaga* 24 (2): 199- 207.
- Daumal J. & Pintureau B. (1985) Étude de la durée du développement chez *Ephestia kuehniella* Zeller (Lep. Pyralidae). *Acta OEcologica* 6 (20): 367-380.
- Daumal J., Voegelé J. & Brun P. (1975) Les Trichogrammes. II. Unité de production massive et quotidienne d'un hôte de substitution, *Ephestia kuehniella* Zell. (Lepidoptera, Pyralidae). *Ann. Zool. Ecol. An.* 7(1): 45-59.

- Jardak T. (1980) Études bioécologiques de *Prays oleae* BERN (*Lepidoptera, Hyponomeutidae*) et de ses parasites oophages du genre *Trichogramma* (*Hymenoptera, Trichogrammatidae*): Essais d'utilisation en lutte biologique ». Thèse de 3^{ème} cycle, Univ. Aix-Marseille, 160 p.
- Norris M.J. (1933) Contributions towards the study of insect fertility. II. Experiments on the factors influencing fertility in *Ephestia kuehniella* Z. (*Lepidoptera, Pyralidae*). *Proc. Zool. Soc. London* (4): 903-934.
- Payne N.M. (1934) The differential effect of environmental factors upon *Microbracon hebetor* SAY (*Hymenoptera, Braconidae*) and its host, *Ephestia kuehniella* Zell. (*Lepidoptera, Pyralidae*). *Ecol. Monogr.* 2 (4): 1-46.
- Pizol J. & Voegelé J. (1988) The diapause of *Trichogramma maidis* in relation to some characteristics of its alternative host *Ephestia kuehniella*. *Les Colloques de l'INRA* 48: 319-326.
- Voegelé J., Daumal J., Brun Ph. & Onillon J. (1974) Action du traitement au froid et aux ultraviolets de l'œuf d'*Ephestia kuehniella* (*Pyralidae*) sur le taux de multiplication de *Trichogramma evanescens* et *T. brasiliensis* (*Hymenoptera, Trichogrammatidae*). *Entomophaga* 19(3): 341-348.

Élevage en masse des *Trichogrammes* spp. Amélioration des conditions de production

Le présent travail s'est proposé d'une part, de déterminer les conditions optimales d'élevage de l'hôte de substitution *Ephestia kuehniella* utilisé pour la production en masse des parasitoïdes oophages du genre *Trichogramma* (température d'élevage, dose d'aliment et qualité des œufs ensemencés) et d'autre part d'évaluer l'impact des améliorations sur les potentialités biotiques de ces parasitoïdes. Ces travaux ont été réalisés à l'unité de recherche « protection des plantes cultivées et environnement » à l'Institut de l'Olivier à Sfax qui dispose d'un élevage permanent d'*Ephestia kuehniella* et de quelques souches de *Trichogrammes*. Les résultats révèlent les performances intéressantes de l'hôte lorsqu'il est élevé durant la phase pré-imaginale, sous des températures alternées de 20-12-20°C et à raison de 9 mg d'œufs hôtes par 100 g de semoule de blé dur. L'élevage de l'espèce parasitoïde *Trichogramma oleae* sur des œufs hôtes issus d'un élevage conduit sous des températures alternées et pondus durant les premières 48 heures, montre que la fécondité de cet oophage baisse chez les deux souches n° 2 et 2F de *Trichogramma oleae* avec la durée des œufs hôtes au froid. Une baisse significative de la fécondité s'observe ainsi chez les deux souches lorsqu'elles sont élevées sur des œufs stockés 6 jours au froid (3°C). La souche n°2 se montre, cependant, plus sensible aux conditions de stockage et voit sa fécondité diminuer significativement une fois mise en contact avec des œufs hôtes stockés 4 jours au froid. Cette étude a montré que l'amélioration des conditions d'élevage et le respect du délai de conservation des œufs d'*E. kuehniella* au froid ont un impact direct sur les performances des *Trichogrammes*.

Mots-clés: *Ephestia kuehniella* - *Trichogrammes* - Performances - Potentialités biotiques - Olivier

Mass rearing of *Trichogramma* sp. Improvements of rearing conditions

The aim of this work is on the one hand, to identify the best conditions of rearing the mediterranean flour moth *Ephestia kuehniella* (Development temperature, amount of flour and quality of eggs used to contaminate the flour) in order to massively produce *Trichogramma* sp. and on the other hand to evaluate the impact of improvements of the rearing conditions on *Trichogramma* potentialities. This work was undertaken in the Research unit of "plant and environment protection" of Sfax Olive Institute which disposes of host's permanent rearing of *E. Kuehniella* and some strains of *Trichogramma*. The results shows that performant hosts are obtained at alternating rearing temperature 20-12-20°C and using 9 mg of eggs laying the first four days per 100 g of flour. The rearing of the strain *Trichogramma oleae* the first 48 hours, obtained from alternating rearing temperature at three cold storage periods of 3°C (48, 96 and 144 hours) shows a decrease of the fecundity of the strain when the conservation period of eggs increases to 144 hours. The life and the rate of emergence decreases significantly for the strain reared on *E. kuehniella* eggs of 144 hours. This survey showed that the improvement of host rearing conditions and the respect of the cold weather storage of *E. kuehniella* eggs has a direct impact on *Trichogramma* performances. These strains will be used in field releases against Lepidopters of olive.

Keywords: *Ephestia kuehniella* - *Trichogramma* - Performances - Potentialities - Olive tree

Pig slurry as amendment of olive culture

Maria del Mar DELGADO, Rosario Miralles de IMPERIAL, José Valero MARTÍN,
Luisa BERINGOLA, Miguel Ángel PORCEL & Eulalia Maria BELTRÁN

Department Environment, INIA Ctra. Coruña Km 7.500 Madrid 28040 Spain
Corresponding author; e-mail: delgado@inia.es

1. INTRODUCTION

The olive, which originated in the Mediterranean basin, is one of the oldest agricultural tree crops, but the soil of the Mediterranean regions is impoverishing. The need of organic matter to maintain soil productivity and to fight erosion and desertization has led to the search for new material as a complement or a substitute of the traditional ones, such as harvest wastes, animal manures or peat. The hold breeding sector in our country estimates the annual production of pig slurry around 25 millions of metric tons. This huge development makes necessary study of the environmental impact of this compound. The pig slurry contains the fundamental nutrients plants which could incorporate to soil and use in agriculture, such us to olive grove soil. However, it shows some disadvantages: the difficult manage due to its volume (94% of water), contaminant effects due to its content in heavy metals and sodium (Diez *et al.*, 1999; Ham *et al.*, 1998). The recycling of pig slurry as a natural fertilizer is an important alternative in countries such as our (Smith, 1993; Chamber, 1993). Spain has a Mediterranean climatology an arid and semiarid character and soils with a low content in organic matter (Delgado *et al.*, 1999).

The purpose of present work was to study the effects of pig slurry on the chemical properties of soil and the morphologies variables: nursery tree height, trunk diameter and shoot length, by olive nursery tree grown in a greenhouse on pot experience.

2. MATERIALS AND METHODS

The study was conducted at the National Institute for Agricultural Research in Madrid. Olive nursery trees (cv. Cornicabra *Olea europea* L.) were grown in 12 kg pot. The treatments applied were as follow: Urea (46%) 100 kg N/ha, Pig slurry was applied at rates of 100 kg N/ha, 200 kg N/ha and 300 kg N/ha and Control without both urea fertilizer and pig slurry. The morphological variables studied were: nursery tree height, trunk diameter and shoot length, and the main agronomic parameters such us: pH, E.C., N, P, oxidable carbon and heavy metals were analyzed too. The study was conducted during 2002 to 2004. The morphology parameters: olive nursery the tree

height, trunk diameter (it was measured with slide gage) and shoot length were measured monthly and the chemical parameters: pH, E.C., N, P, organic matter and heavy metals were measured annually. Three replicates were realized for all treatments and for all the experience the moisture content was daily adjusted about 2/3 of field capacity.

For analyzing soil samples, they were air-dried, passed through a 2 mm sieve and stored at 4°C. The pH was obtained with a glass electrode, using a soil water suspension of 1:2.5 (w/v). Electric conductivity was determined in conductivimeter (soil/water ratio, 1/5.0) at 25°C, organic matter by Walkely Black method (APHA, AWWA, WPCF, 1992), Kjeldahl nitrogen by Kjeldahl method (Hesse, 1971). Available P (Olsen method), available K (flame photometry) and finally the total heavy metals Cu, Pb, Cr Zn, Ni and Cd concentrations were determined by atomic absorption spectroscopy (AAS) after mineralisation with HNO₃ + H₃PO₄ solution (Sims & Kline, 1991).

Table 1 shows the chemical composition of pig slurry and soil used in the trials (dry weight).

Table 1. Composition of pig slurry and the soil used in the trial

Characterics	Soil	Pig slurry
pH (H ₂ O)	8.30	6.70
E.C. (dS/m.)	0.20	15.23
Organic matter (%)	0.40	10.91
Kjeldahl Nitrogen (%)	0.04	2.80
Available Phosphorus -P- (mg/kg)	10.40	1.29
Available Potassium -K- (mg/kg)	180.00	0.55
Copper -Cu- (mg/kg)	4.08	0.62
Lead -Pb- (mg/kg)	4.28	-
Chromium -Cr- (mg/kg)	2.55	-
Zinc -Zn- (mg/kg)	18.58	1.95
Nickel -Ni- (mg/kg)	7.58	-
Cadmium -Cd- (mg/kg)	0.37	-

3. RESULTS AND DISCUSSION

In table 2 appears the results of chemical properties of soils obtained with this study. There were not significant differences among treatments for the electric conductivity and pH. For nitrogen, phosphorus, potassium and organic matter it can be seen that pig slurry application slightly increased the chemical parameters in soil. The accumulation of heavy metals concentration in soil are below Spanish and European legal limits (Miller, 1994).

Table 2. Chemical characteristics of the different treatments in soil (Year 2004)

Amended	Control	Mineral	Doses 1	Doses 2	Doses 3
pH (H ₂ O)	8.30	8.36	8.28	8.38	8.32
E.C. (dS/m.)	0.11	0.13	0.14	0.14	0.15
Organic matter (%)	0.62	0.72	0.70	0.74	0.94
Kjeldahl Nitrogen(%)	0.060	0.066	0.067	0.068	0.069
Available P (mg/kg)	10.80	10.50	18.50	19.50	21.00
Available K (mg/kg)	100.00	104.00	110.00	140.00	180.00
Copper -Cu- (mg/kg)	2.87	3.77	3.98	4.00	4.00
Lead -Pb- (mg/kg)	2.24	2.24	2.78	3.00	3.54
Chromium -Cr- (mg/kg)	1.27	1.85	1.85	2.00	2.41
Zinc -Zn- (mg/kg)	10.20	11.52	17.26	17.63	18.00
Nickel -Ni- (mg/kg)	3.77	4.35	4.35	4.40	4.52
Cadmium -Cd- (mg/kg)	0.20	0.20	0.20	0.22	0.30

Control: without fertilizer; Mineral: Urea 46% (100 kg N/ha); Doses 1: pig slurry (100 kg N/ha); Doses 2: pig slurry (200 kg N/ha); Doses 3: pig slurry (300 kgN/ha)

Figure 1 represents the percentage of nursery tree versus time. It can be observed that the percentage of nursery tree height was higher to the doses 2 (200 kg N/ha) of 2002 like in winter the same year. In Autumn of 2003 only there was grown in the control treatment so it is necessary to add pig slurry fertilizer to see differences between treatments (Villar *et al.*, 2004).

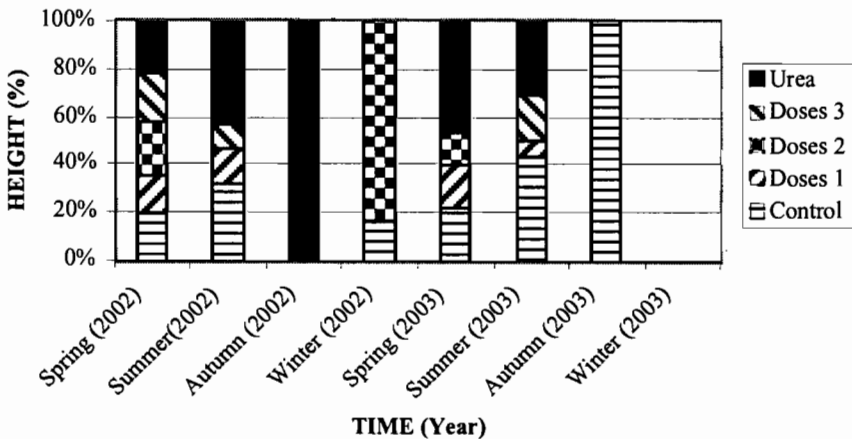


Figure 1. Olive nursery tree height (%) versus time (year) in different treatments

The trunk diameter studies (Figure 2) versus time showed than the effect of the pig slurry fertilizer began in Summer (2002) with the doses (300 kg N/ha) and it was finish with the doses 2 (200 kg N/ha) after one year (Summer 2003) (Mexal, 1990).

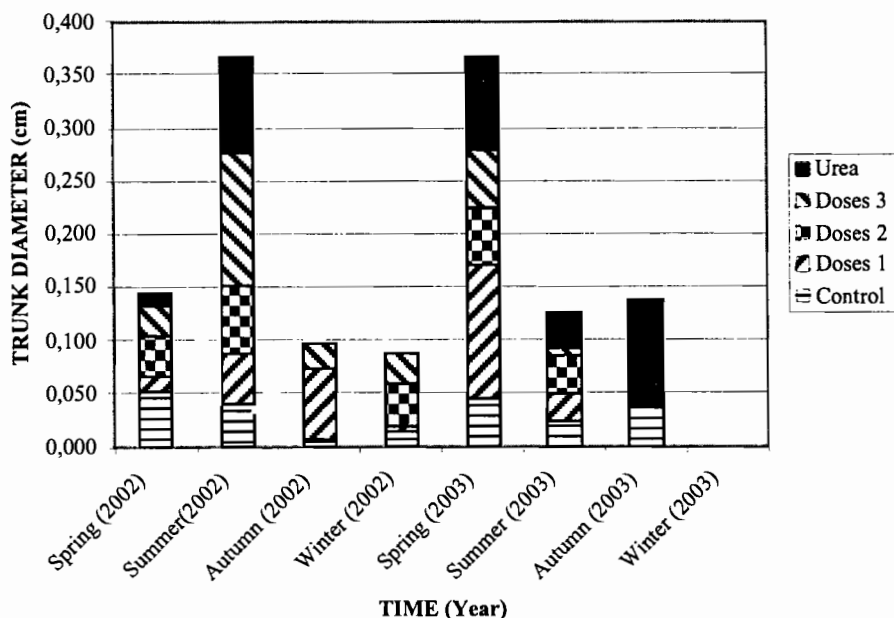


Figure 2. Olive nursery trunk diameter (cm) versus time (year) in different treatments

Finally, the results obtained for the olive nursery shoot length showed that only there were differences between treatments in the first year with high percentage for the doses 1 (100 kg N/ha (Figure 3).

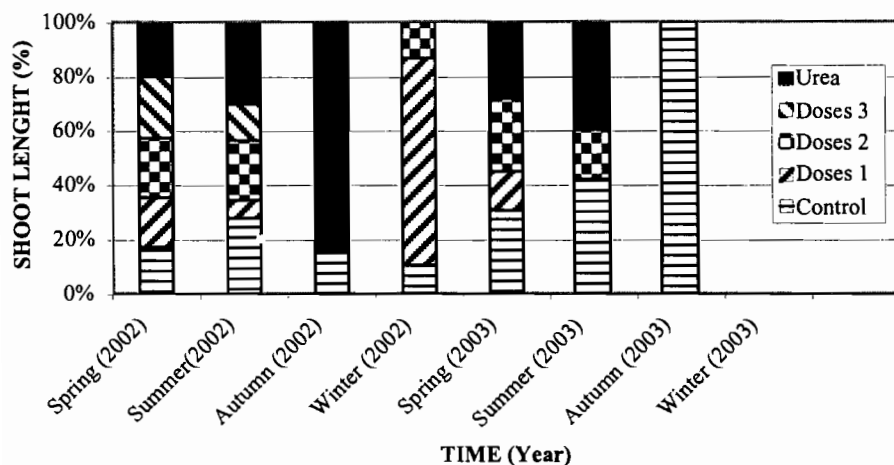


Figure 3. Olive nursery shoot length (cm) versus time (year) in different treatments

4. REFERENCES

- APHA-AWWA-WPCF (1992) Standard methods for the examination of water and wastewater. American Public Health Association, New York, 874 p.
- Chambers J (1993) Utilization of the nitrogen content of organic manure on farms. Problems and practical solution. *Soil, use and management*. 9:105-112.
- Delgado M, Porcel MA, Miralles de Imperial R, Beltrán M & Bigeriego M (1999a) Nitrogen mineralisation from residues organic. *International Journal of Environmental Pollution*. 1581: 19-25.
- Delgado M, Porcel MA, Miralles de Imperial R, Beltrán M & Bigeriego M (1999b) Depuración de purines de cerdo para su reutilización. *Revista Mundo Ganadero*. 117: 136-139.
- Delgado M, Porcel MA, Miralles de Imperial R, Beltrán M & Bigeriego M (1999c) Study of semi industrial plant for depuration and reutilization of pig slurry. *8ª Congreso del Mediterráneo de Ingeniería Química*. Barcelona, 10-12 Noviembre 1999, 239 p.
- Diez J, Tarquis A, Vallejo A, Cartagena M & Sánchez L (1999) Effect of application of pig slurry on soil pollution and nitrate lixiviation. *Soil and Environment: Water and plant quality* 4:856-858.
- Ham JM & Murphy JP (1998) Evaluation of lagoons for the containment of animal waste. Kansas Center for Agric, Resources and the Environmental Kansas State University, Manhattan, 152 p.
- Hesse PR (1971) Total nitrogen the Kjeldahl process. A textbook of soil chemical analysis. Murray, Great Britain, 520 p.
- Mexal JG & Landis TD (1990) Target seedling concepts: height and diameter. Target Seedling Symposium, USDA Forest Service, Roseburg Oregon, pp. 17-35.
- Miller BD, Timmer VR (1994) Steady-state nutrition of *Pinus resinosa* seeding: response to nutrient loadings, irrigation and hardening regimes. *Tree Physiol*. 14:1327-1338.
- Sims J.T., Kline, J.S. (1991). Chemical fractionation and plant uptake of heavy metals in soils amended with co- composted sewage sludge. *J. Environ.Qual.* 20: 387-395.
- Smith JL, Papendick RI, Bezdiecek DF, Lynch JM (1993) Soil organic matter dynamics and crop residue management, In: Soil Microbial Ecology, Soil Microbiological Ecology, 51,173-212
- Villar-Salvador, Planelles R., Enríquez Peñuelas R (2004) Nursery cultivation regimes, plant functional attributes and field performance relationships in the Mediterranean oak *Quercus ilex* L. *Forest Ecology and Management* 196:257-266.

Pig slurry as amendment of olive culture

Pig slurries improve physical, chemical and microbiological properties of soils particularly in agricultural soils affected by an intensive use, consequently with scarce organic matter content. The addition of these products to the soils favors these characteristics and improves crop production (due to their nutrients content) nevertheless; they should be incorporated with caution because of risk of pathogens in crops. This work is aimed to determine the dose of optimum application of pig slurry to the soil as a organic fertilizer minimizing its polluting effects. The study was conducted at the National Institute for Agricultural Research in Madrid. Olive nursery tree (cv. Cornicabra *Olea europea* L) were grown in 12 kg pot. The treatments applied were as follow: Urea (46%) 100 kg N/ha, Pig slurry was applied at rates of 100 kg N/ha, 200 kg N/ha and 300 kg N/ha and Control without both urea fertilizer and pig slurry. The morphologies variables studied were: nursery tree height, trunk diameter and shoot length, and the main agronomic parameters such us: pH, E.C., N, P, organic matter and the heavy metals were analyzed too. The study was conducted during 2002 to 2004 and it was measured monthly the nursery tree height, the trunk diameter and the shoot length and annually the agronomic parameters. The results show that the period of greater tree height from olive nursery tree was in spring in all treatments and the tree height was higher for urea. Also an increment can be seen with the doses 100 kg N/ha and 200 kg N/ha of pig slurry for the trunk diameter and the shoot length parameters respectively. Finally, the results obtained in this test, confirm the possibility to use pig slurry as fertilizer and conservation of olive soil with a light increment of agronomic parameter studied.

Keywords: Fertilization - Pig slurry - Olive nursery tree - Morphology parameters - Chemical parameters

Mycoflore naturelle des olives dans les Maâsra et pouvoir toxigène des souches d'*Aspergillus* sur céréales

Sevastianos ROUSSOS², Nabila ZAOUIA¹, Ghislane SALIH¹,
Abdelghafour TANTAOUI-ELARAKI¹, Khadija LAMRANI¹,
Mostafa CHEHEB¹, Hicham HASSOUNI¹, Frédéric VERHÉ²,
Isabelle GAIME-PERRAUD², Christopher AUGUR²
& Mustapha ISMAILI-ALAOUI¹

¹ IAV Hassan II, Laboratoire des Bioconversions, BP. 6202-Instituts, Madinate Al Irfane, 10101 Rabat, Maroc

² IRD, Biotrans R-185, IMEP, Boite 441; FST Saint Jérôme; Université Paul Cézanne; F-13397 - Marseille cedex 20, France

Auteur correspondant, courriel: s.roussos@univ-cezanne.fr

1. INTRODUCTION

La superficie oléicole mondiale est estimée à 8 600 000 hectares, dont 95% se situent dans le bassin méditerranéen. La production moyenne en olives est de 10 millions de tonnes par an dont 92% sont utilisés pour l'extraction d'huile, le reste étant consommé en tant qu'olives de table.

Au Maroc, le profil variétal de l'olivier est constitué essentiellement d'une « variété population » dénommée Picholine marocaine. C'est une variété à double fin (conserverie et extraction d'huile d'olive), adaptée aux conditions pédo-climatiques locales. La picholine constitue à elle seule 96% des plantations d'olivier. Le reste est représenté par des variétés introduites de différents pays (France, Italie, Espagne, Grèce, États-Unis).

L'olivier représente plus de 50% de la surface occupée par l'arboriculture au Maroc. Sa culture mobilise une activité agricole intense que l'on chiffre à plus de 11 millions de journées de travail par an (soit 55.000 emplois), sans oublier toute l'activité industrielle qu'elle génère en aval, à savoir 16.000 moulins traditionnels (Maâsra) qui subsistent encore, 260 unités modernes de trituration et une cinquantaine de conserveries d'olive. Cependant, le secteur de l'olivier au Maroc ne bénéficie pas de techniques culturales appropriées et le processus d'extraction d'huile est pour la plupart encore traditionnel (Rahmani, 1996). Les méthodes de récolte des olives sont elles aussi encore traditionnelles. La majorité des régions de production des olives utilisent, en effet, le gaulage. En outre, le stockage inadéquat des olives et leur séjour prolongé au niveau des unités de trituration traditionnelles portent atteinte à la qualité de l'huile d'olive (PNTTA, 2001). Ces conditions particulières de récolte et de stockage des olives laissent supposer que l'huile d'olive produite pourrait présenter un risque de contamination par les mycotoxines et que les grignons d'olive issus de telles olives pourraient présenter un danger pour le bétail du fait de la concentration préférentielle

des mycotoxines dans les tourteaux plutôt que dans l'huile de pression (Tantaoui-Elaraki *et al.*, 1983).

Des études antérieures ont montré la présence sur les olives de spores de moisissures réputées toxigènes notamment des *Aspergillus*. Certaines espèces appartenant à ce genre, en particulier *Aspergillus flavus* et *Aspergillus ochraceus* se sont montrées capables d'élaborer l'aflatoxine B1 et l'ochratoxine A (OTA) sur les olives. L'huile de pression issue de telles olives peut renfermer de faibles quantités de ces mycotoxines (Tantaoui-Elaraki *et al.*, 1983). En effet, la présence de l'aflatoxine a déjà été mise en évidence par Gracien & Arevalo (1980) dans des huiles d'olive provenant d'Espagne. Quant à l'OTA, elle a été trouvée par Le Tutour (1983) dans des huiles d'olive marocaines (Belaiche, 2001) et très récemment dans des huiles d'olive en Grèce (Papachristou & Markaki, 2004).

En ce qui concerne les olives de tables marocaines, plusieurs travaux (Tantaoui-El Araki & Letutour, 1985) ont montré que les olives noires « façon Grèce » correspondent à la catégorie d'olives qui présentent les plus grands risques de contamination par des moisissures et leurs mycotoxines, vu leur mode de conservation et leur procédé de préparation qui ne comportent aucun traitement thermique susceptible de détruire les moisissures (Tantaoui-Elaraki *et al.*, 1983).

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires sécrétés par des moisissures appartenant principalement aux genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium* (Le Bars & Le Bars, 2000). Elles peuvent être produites sur une large gamme de denrées alimentaires et sous des conditions très variées. En raison de la diversité de leurs effets toxiques et de leur bonne stabilité thermique, la présence de mycotoxines dans les aliments destinées à la consommation humaine ou animale est potentiellement dangereuse.

Les principales classes de mycotoxines considérées comme importantes du point de vue agroalimentaire et rencontrées partout dans le monde sur les matières premières végétales (céréales, oléagineux, pailles) sont les suivantes: Aflatoxines, Ochratoxine, Patuline, Fumonisine, Deoxynivalénol et Zéaralénone (Pittet, 1998). Toutes les mycotoxines sont dangereuses pour la santé humaine et animale et causent différentes maladies, dont certaines sont mortelles comme le cancer.

Ces éléments ont poussé l'équipe franco-marocaine à réaliser ce travail qui s'inscrit dans le cadre du projet PRAD (04/15) sous le thème: Biodiversité des moisissures dans les Maâsra au Maroc: amélioration des conditions d'hygiène pour une huile d'olive de qualité. Plus particulièrement, le travail qui sera exposé ici, porte sur:

- la distribution des moisissures mésophiles et thermophiles sur les olives et les grignons d'olives des Maâsra,
- l'étude du pouvoir toxigène des souches d'*Aspergillus* isolées en 2003 et 2004.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. Origine des échantillons

171 échantillons d'olives, de grignons d'olives et d'huile d'olives ont été analysés. Les 136 échantillons d'olives et de grignons d'olives ont été prélevés directement dans les Maâsra dans plusieurs régions marocaines pour l'isolement des souches de moisissures. Les 35 échantillons d'huile d'olives ont été utilisées uniquement pour la recherche de mycotoxines. Les Maâsra ont été choisies d'une manière aléatoire et les échantillons ont été prélevés au hasard (Tableau 1).

Tableau 1. Répartition des échantillons d'olives et de grignons d'olives collectés au cours des campagnes oléicoles de 2003 et 2004 en fonction de leur nature et de leur provenance

Provenance	Olives	Grignon d'olives	Total par région
Taounate	6	3	9
Méknès	7	5	12
Fès	3	3	6
Sidi Kacem	18	4	22
Sefrou	14	6	20
Khnifra	2	0	2
Rabat	7	0	7
Khémisset	9	4	13
Marrekech	17	1	18
Goulmima	5	0	5
Errachidia	12	10	22
Total	100	36	136

2.2. Milieu de culture pour l'isolement des souches

Le milieu Potato Dextrose Agar (PDA) de Sigma a été utilisé pour l'isolement des moisissures ainsi que pour leur repiquage, la purification et la conservation des souches (Botton *et al.*, 1990).

2.3. Milieux de culture pour l'identification des souches

Trois milieux de culture provenant de Sigma ont été utilisés: le milieu malt extract agar (MEA), le milieu de Czapek Dox Agar et le milieu PDA. Ces milieux ont été stérilisés à 120°C et répartis en boîtes de Pétri.

2.4. Technique d'inoculation et d'isolement des souches

La technique d'isolement par contact direct avec la gélose a été utilisée. À partir de chaque échantillon, une olive a été prélevée au hasard, puis à l'aide d'un scalpel six

fragments ont été séparés. Trois fragments ont été déposés à trois endroits différents à la surface d'une boîte de Pétri contenant 20 ml de milieu PDA puis incubés (Salih, 2004). Chaque échantillon a été analysé en duplicata.

2.5. Conditions d'incubation

Afin d'isoler le maximum de souches mésophiles et thermophiles ou thermotolérantes présentes dans les échantillons d'olives et de grignon d'olives, les boîtes de Pétri destinées à l'isolement des souches mésophiles ont été incubées à 25°C pendant 72 h et celles qui sont destinées à l'isolement des souches thermophiles et/ou thermotolérantes à 50°C pendant 48h (Cordova *et al.*, 2003).

2.6. Purification et conservation des souches

Le milieu utilisé pour la purification des souches est le PDA qui est un milieu non sélectif. Dans le cas d'une contamination bactérienne, un ou plusieurs repiquages sur PDA avec addition d'un antibiotique notamment le chloramphénicol (50-100 mg/l) permet, le plus souvent, une bonne purification de la souche (Botton *et al.*, 1990). Les souches obtenues en culture pure ont été conservées sur PDA et repiquées une fois par an.

2.7. Identification des souches

L'identification des moisissures fait appel aux caractères morphologiques (macroscopiques et microscopiques). Elle nécessite d'abord l'utilisation de trois milieux d'identification et ensuite le montage de préparations microscopiques des fragments de mycélium avec une coloration au Bleu Cotton du matériel à examiner. Pour chaque groupe de champignons, la stratégie d'identification a été la suivante:

- Pour les *Penicillium*, la description microscopique standard et l'identification font référence à Pitt (1979) et à Samson *et al.* (1996). Les techniques utilisées par ces auteurs consistent à inoculer les souches en trois points sur boîte de Pétri contenant soit le Czapek Dox Agar (CzA) ou le Malt Extract Agar (MEA) à 2%. Puis, les cultures sont incubées à une température de 25°C.
- Pour les *Aspergillus*, les clés d'identification utilisées sont celles qui ont été proposées par Rapper & Fennell (1977) et par Samson *et al.* (1996). La culture des *Aspergillus* a été réalisée sur des CzA à 25°C.
- Pour les *Rhizopus* classés dans l'ordre des Mucorales, ils se caractérisent par un mycélium non cloisonné ou cloisonné uniquement au niveau des appareils reproducteurs. Les spores asexuées sont endogènes (sporangiospores) et contenues dans un sac (sporocyste) porté par un sporangiophore. Les clefs de détermination du genre *Rhizopus* à partir des Mucorales suivent celle de Schipper (1978).

2.8. Cas des autres genres

Pour l'identification des autres genres, on a utilisé les différentes clefs citées auparavant. Pour les champignons thermophiles, on a adopté les clés d'identification de Cooney

& Emerson (1964) et de Domsch *et al.* (1980). Des souches de la collection LMI-IRD ont été utilisées comme souches de référence.

2.9. Pouvoir toxigène des souches isolées

Le pouvoir toxigène des souches d'*A. niger* et d'*A. flavus* isolées, pendant les campagnes oléicoles 2003 et 2004, a été mis en évidence grâce à des tests de production de l'OTA et d'Af par les moisissures cultivées sur des grains de céréales et des olives noires. Tout d'abord, des grains de céréales ou des olives noires ont été inoculées avec ces souches et avec des souches de référence. Ensuite, ces préparations ont été incubées à 25°C pendant 15 jours pour les céréales et pendant 6 mois pour les olives noires. L'extraction des mycotoxines a été réalisée en utilisant du méthanol. Pour la purification de ces molécules, des kits d'immunoaffinité Aflaprep ou Ochraprep ont été utilisés. L'analyse quantitative des mycotoxines purifiées a été faite par HPLC.

2.9.1. Culture de certaines souches sur des substrats amylicés (riz et blé)

Les deux types de céréales utilisés comme substrat sont:

- les grains de blé précuits (marque EBLY Casino) pour la production de l'ochratoxine A par les souches d'*A. niger*,
- le riz de Camargues (marque Perliz) comme substrat pour la production d'aflatoxines par les souches d'*A. flavus*.

2.9.2. Conditions de production de l'aflatoxine sur grains de riz

Dans une fiole de 250 ml, 21 ml d'eau distillée ont été additionnées à 25 g de riz (humidité finale 50%). L'ensemble a été stérilisé à 121°C pendant 20 minutes. Le riz a été ensuite ensemencé avec 2 ml d'une suspension de spores (2×10^8 spores/ml) de la souche à tester (Roussos, 1987). Les cultures ont été incubées à 25°C pendant 7 jours. Après incubation, les fioles ont été d'abord pasteurisées à 70°C pendant 24 heures (afin de détruire les spores des champignons) et ensuite séchées à 80°C pendant la même durée (Salih, 2004). Après pasteurisation et séchage, l'aflatoxine a été extraite et quantifiée selon la méthode décrite plus loin.

2.9.3. Conditions de production de l'ochratoxine A sur grains blé

Dans une fiole de 250 ml, 6 ml d'eau distillée ont été ajoutées à 10 g de grains de blé (Ebly). L'ensemble a été stérilisé à 121°C pendant 20 minutes. Le blé a été ensuite ensemencé avec 2 ml d'une suspension de spores (2×10^8 spores/ml) de la souche à tester préparée selon la méthode décrite auparavant. Les cultures ont été incubées à 25°C pendant 12 à 15 jours. Après cela, les fioles ont été pasteurisées puis séchées comme indiqué précédemment (Salih, 2004).

2.9.4. Extraction et purification des mycotoxines (Af et OTA)

À partir des cultures sur céréales 10 g du substrat (riz ou blé pasteurisé et séché) ont été finement broyés puis mélangés à grande vitesse pendant 2 minutes avec 40 ml

d'une solution (acétonotriple/eau, 60/40, v/v). Ensuite, le mélange a été centrifugé à 4000 rpm pendant 10 min. Le surnageant obtenu a été stocké à -20°C pour une durée de 24h (Leontopoulos *et al.*, 2003). À partir du surnageant clarifié, 4 ml ont été prélevés et dilués avec 44 ml d'une solution tampon PBS. L'extrait a été filtré à travers un filtre papier Whatman n°4 avant d'être passé à travers une colonne d'immunoaffinité (Papachristou & Markaki, 2004).

2.10. Préparation de la solution tampon Phosphate Buffered Saline (PBS)

La solution PBS est utilisée pendant l'étape d'extraction des mycotoxines (Daradimos *et al.*, 2000). Elle est préparée par dissolution dans un litre d'eau distillée des composés suivants: KCl 0,2g; KH₂PO₄ 0,2g; Na₂HPO₄ 1,16g; NaCl 8 g. Son pH est ajusté à 7,4, en utilisant, si nécessaire, une solution d'HCl (0.1M) ou de NaOH (0.1M).

2.11. Purification des mycotoxines sur colonne d'immunoaffinité

Les kits Ochraprep (spécifiques à l'ochratoxine A) et les kits Aflaprep (spécifiques aux aflatoxines B1, B2, G1 et G2) sont fournis par la société R-Biopharm. Chaque kit est composé de 50 colonnes d'immunoaffinité pour la réalisation de 50 tests. Ces colonnes contiennent des anticorps monoclonaux fixés par covalence à un support solide (gel), chaque type d'anticorps reconnaissant spécifiquement une des mycotoxines. L'extrait dilué est passé à travers la colonne (à un débit de 2-3 ml/min). La colonne est alors lavée avec 20 ml d'eau tamponnée (PBS) (à un débit de 5 ml/min) afin d'éliminer les composés non fixés sur la colonne. La dernière étape consiste à libérer la toxine par l'ajout de 2 ml de méthanol à un débit d'une goutte par seconde. Pour récupérer le maximum de molécules de mycotoxines fixées sur la colonne à l'aide d'une seringue en plastique, on inverse 3 fois le sens d'écoulement (Bachflaching) en aspirant l'éluant dans la colonne. L'éluat est récupéré dans un flacon pour l'analyse par HPLC.

2.11.1. Concentration de l'extrait

L'éluat récupéré précédemment est évaporé à sec, sous azote. Le résidu contenant l'Af est conservé à -20°C jusqu'à l'étape de la dérivation. De son côté, le résidu contenant l'OTA est resuspendu dans 200 µl de méthanol et conservé à -20°C jusqu'à son injection sur la colonne de l'HPLC.

2.12. Dérivation des aflatoxines

Pour détecter les aflatoxines B1 et G1 via l'analyse par HPLC, il fallait renforcer leur fluorescence en les transformant en leur dérivé fluorescent (Daradimos *et al.*, 2000). La méthode de dérivation des aflatoxines B1 et G1 choisie est celle utilisant l'acide trifluoro-acétique (T.F.A) qui les transforme en dérivés hémi-acétal B_{2a} et G_{2a} très fluorescents. Elle consiste à ajouter à l'extrait sec, 200 µl de T.F.A et 200 µl d'hexane.

Les flacons sont bouchés puis chauffés dans un bain-marie à 40°C pendant 10 minutes. L'extrait dérivé est évaporé à sec, sous azote, puis re-dissout dans 200 µl de méthanol (Daradimos *et al.*, 2000). 20 µl de cette solution ont été injectés sur la colonne d'HPLC.

La concentration de l'OTA ou de l'Af dans l'échantillon analysé est obtenue selon la formule:

$$(1) \quad \text{OTA ou Af (g/kg)} = \frac{(Q \cdot V_{\text{ext}} \cdot V_f) \cdot 1000}{(V_s \cdot V_i \cdot m)}$$

où:

Q: quantité (g) d'OTA ou d'Af estimée à partir de la courbe d'étalonnage.

V_f : volume de méthanol utilisé pour dissoudre l'extrait sec (200 µl).

V_i : volume de l'extrait final injecté (20 µl).

V_{ext} : volume de la solution utilisée pour l'extraction de l'échantillon (40 ml).

V_s : volume du surnageant utilisé après centrifugation pour la purification (1 ml).

m: masse de l'échantillon (10 g).

2.13. Analyse des mycotoxines par HPLC

2.13.1. Caractéristiques de l'HPLC

L'appareil HPLC utilisé pour la détection et le dosage des mycotoxines est une unité Waters équipée des accessoires suivants:

- une pompe Waters 600^E avec un débit maximal de 10ml/min;
- un injecteur Rheodyn. 7725i manuel avec un volume injecté de 20 µl;
- une colonne Waters de phase inverse type C_{18} d'une longueur de 150 mm et d'un diamètre de 4.6 mm;
- une phase mobile pour le dosage de l'OTA contenant un mélange acétonitrile/eau/acide acétique (50/50/2; v/v/v) et pour le dosage des aflatoxines le mélange eau/méthanol/acétonitrile (60/20/20; v/v/v);
- un détecteur ultra-visible du type Waters 490E (programmable Multiwavelength detector) avec un intervalle de détection et de sensibilité permettant la détection de composés qui absorbent entre 190 et 600 nm. La longueur d'onde utile pour la détection des Ochratoxines est à 335 nm et des Aflatoxines à 362 nm;
- un injecteur Waters 746 pour compléter la chaîne analytique.

Pour les deux types de mycotoxines, la constitution de la phase mobile et les longueurs d'ondes correspondant à leur détection font référence à Markaki *et al.* (2000) et Daradimos *et al.* (2000).

Pour établir la gamme étalon, des produits Sigma ont été utilisés pour la préparation des solutions standards de l'ochratoxine A et des aflatoxines.

En ce qui concerne l'injection des échantillons sur la colonne d'HPLC, 20 l des différents extraits (extrait des céréales, d'huile d'olives et des olives contaminées)

purifiés et concentrés ont été utilisés pour la détection et la quantification de l'ochratoxine A et des aflatoxines probablement présentes.

3. RÉSULTATS

3.1. Origine des échantillons

Durant les campagnes oléicoles 2003-2004 et 2004-2005 respectivement 64 et 107 soit, au total, 171 échantillons d'olives, de grignons d'olives et d'huile d'olives ont été prélevés directement à partir des Maâsra, petites unités de trituration d'olives, localisées dans plusieurs régions du Maroc. L'analyse mycologique de 136 échantillons nous a permis d'isoler 311 souches dont 193 souches mésophiles et 118 souches thermophiles et thermotolérantes (Tableau 2).

Tableau 2. Bilan comparé de l'origine des échantillons et de la distribution des moisissures pour les deux campagnes oléicoles de 2003 et de 2004 au Maroc

Échantillons et souches	2003/2004 Quantité	2004/2005 Quantité	Totaux sur deux ans
Échantillons olives	50	70	120
Échantillons huile	14	21	35
Échantillons grignons	0	16	16
Total des échantillons	64	87	171
Souches mésophiles	84	109	193
Souches thermophiles	38	80	118
Total des souches isolées	122	189	311

3.2. Répartition des souches de moisissures mésophiles dans les Maâsra

L'identification des souches mésophiles isolées au cours de deux campagnes oléicoles (2003-2004 et 2004-2005) a montré une dominance des genres *Penicillium* (28%), *Aspergillus* (26%) et *Geotrichum* (17%). Le reste concerne les genres suivants: *Mucor* (7%), *Rhizopus* (7%), *Trichoderma* (2%), *Alternaria* (1%) et *Humicola* (1%). Le tableau 3 présente la répartition des souches mésophiles selon leur genre.

3.3. Répartitions des souches thermophiles isolées dans les Maâsra

L'identification des souches thermophiles ou thermotolérantes a montré que la majorité des souches appartiennent aux espèces *Thermoascus aurantiacus* (28%), *Aspergillus fumigatus* (24%) et *Paecilomyces variotii* (21). Parmi les zygomycètes, les *Mucor pusillus* (14%) sont assez souvent rencontrés sur les olives (Tableau 4).

Tableau 3. Répartition des souches mésophiles isolées selon leur genre

Genres	2003-2004		2004-2005		TG*	RG*
	NS*	%	NS*	%		
<i>Penicillium</i>	26	31	28	32	54	28
<i>Aspergillus</i>	27	32	23	26	50	26
<i>Geotrichum</i>	10	12	22	25	32	17
<i>Mucor</i>	9	11	5	6	14	7
<i>Rhizopus</i>	6	7	7	8	13	7
<i>Trichoderma</i>	3	3	0	0	3	2
<i>Alternaria</i>	1	1	1	1	2	1
<i>Acremonium</i>	1	1	0	0	1	1
<i>Humicola</i>	0	0	1	1	1	1
<i>Ulocladium</i>	1	1	0	0	1	1

* NS: Nombre de souches; TG: Total général; RG: Répartition générale (%)

Tableau 4. Répartition des genres des moisissures thermophiles identifiées au sein de la mycoflore thermophile totale isolée en 2004-2005

Nom du genre	Nombre de souches isolées	Répartition au sein de la mycoflore thermophile (%)
<i>Thermoascus aurantiacus</i>	23	28%
<i>Aspergillus fumigatus</i>	19	24%
<i>Paecilomyces variotii</i>	17	21%
<i>Mucor pusillus</i>	11	14%
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	3	4%
<i>Humicola grisea</i>	3	4%
Autres genres	4	5%
Total	80	100%

3.4. Répartition des *Aspergillus* isolés à partir des échantillons d'olives et de grignons d'olives

Pour l'identification des espèces d'*Aspergillus* isolées à partir des Maâsra au Maroc, des souches d'*A. flavus*, d'*A. niger* et d'*A. fumigatus* de la collection de IAV/IRD ont été également utilisées comme souches de référence pour la confirmation. Le tableau 5 regroupe l'ensemble des souches appartenant à ces espèces. Les *Aspergillus niger* (51%) sont de loin les espèces les plus fréquemment rencontrées dans ces biotopes.

Tableau 5. Répartition des 65 souches d'*Aspergillus* isolées au cours des campagnes oléicoles de 2003/2004 et 2004/2005 au Maroc

Espèces	2003/2004		2004/2005		Total 2003 et 2004	
	Nombre	Distribution	Nombre	Distribution	Nombre	Distribution
<i>A. fumigatus</i>	5	19%	18	47%	23	35%
<i>A. flavus</i>	6	22%	3	8%	9	14%
<i>A. niger</i>	16	59%	17	45%	33	51%

3.5. Toxinogénèse des souches d'*Aspergillus* cultivées sur des céréales

Les travaux rapportant la contamination des huiles d'olive du commerce par les aflatoxines ou par l'ochratoxine A constituent une preuve indirecte que les moisissures correspondantes sont capables de se développer et de sécréter leurs toxines dans les olives. De plus, l'aptitude de ce substrat à favoriser la toxinogénèse a été vérifiée. En effet, Tantaoui-Elaraki *et al.* (1983) ont démontré que les olives noires entières, ou ayant subi des endommagements mécaniques superficiels, et ensemencées respectivement avec des conidiospores d'*A. flavus* et d'*A. ochraceus* étaient le siège d'une certaine sécrétion d'aflatoxine B1 ou d'ochratoxine A.

3.6. Production d'Aflatoxines par les souches d'*Aspergillus flavus* cultivées sur riz

L'ensemble des souches isolées d'*A. flavus* (9 souches) et d'*A. niger* (33 souches) provenant d'échantillons différents ont été étudiées pour mettre en évidence leur pouvoir à produire respectivement les aflatoxines et l'ochratoxine A sur milieux amylicés. Toutes les souches d'*A. flavus* sont productrices d'aflatoxine B1 à des quantités allant de 60 à 95 µg/kg de poids sec de riz (Tableau 6).

Tableau 6. Production d'Aflatoxines par les souches d'*Aspergillus flavus* cultivées sur riz à 25°C pendant 7 jours

Souches	Code Souche	Échantillon	Localité / (Maâsra)*	Origine	Afl* B1 sur riz
<i>A. flavus</i>	GS2	E6	Errachidia/B	Grignons	82
<i>A. flavus</i>	GS5	E5	Errachidia/B	Grignons	60
<i>A. flavus</i>	GS30	E3	Errachidia/B	Olives	0
<i>A. flavus</i>	GS36	E11	Errachidia/B	Grignons	48
<i>A. flavus</i>	GS38	E13	Errachidia/B	Grignons	92
<i>A. flavus</i>	GS 43	E7	Errachidia/B	Olives	0
<i>A. flavus</i>	ZNM1	EO-67	Goulmima/B	Olives	95
<i>A. flavus</i>	ZNM102	EO-65	Errachidia/B	Olives	60
<i>A. flavus</i>	ZNM108	EO-69	Goulmima/C	Olives	71
<i>A. flavus</i>	18903	MUCL	Mexique	Café	110
Témoin	-	-	-	-	0

* Nature des unités de trituration: A= Moderne; B:semi-moderne; C: Unité traditionnelle; D: olives provenant du marché; Afl B1: Aflatoxines B1 sur riz ((g/kg)

3.7. Production de l'ochratoxine A sur grains de blé

Afin de démontrer le pouvoir toxigène des *A. niger*, 27 souches de cette espèce isolées à partir de 25 échantillons d'olives et de grignons d'olives ont été cultivées sur grains de céréales, en milieu solide. Deux souches toxigènes de référence (*A. niger* MUCL 44639 et *A. ochraceus* MUCL 44640) ont été également testées pour valider la technique de recherche de toxigénèse. Un échantillon témoin non inoculé et exempt de toute trace d'OTA a été également testé (Tableau 7).

Parmi les souches d'*A. niger* testées sur grains de blé pour leur pouvoir toxigène, 20 souches se sont avérées plus ou moins productrices d'ochratoxine A sur milieu à base de blé. Les quantités produites varient de traces jusqu'à 360 µg/kg (Tableau 7). Ces teneurs ont dépassé parfois celles qui sont produites par les souches de référence (190 µg/kg pour MUCL 44639 et 250 µg/kg pour MUCL 44640) déposées dans des collections internationales pour leur pouvoir toxigène.

Ce travail confirme, par conséquent, que les souches d'*A. niger*, qui correspondent à la mycoflore mésophile dominante sur les olives et les grignons d'olives, sont capables de sécréter sur milieu favorable des quantités relativement élevées d'OTA. Signalons que les souches de l'espèce *A. niger* constituent la flore fongique mésophile dominante du genre *Aspergillus* (22.5%).

3.6. Toxinogénèse des souches d'*Aspergillus* cultivées sur des olives noires salées

Au cours d'une expérience préliminaire, la capacité des souches toxigènes à produire des mycotoxines sur les olives a été testée en réalisant une contamination artificielle d'olives noires préparées « Façon Grèce » avec un taux de sel de 25%. La contamination a été faite avec *A. flavus*, *A. niger* et *Geotrichum* sp. Le but de la contamination par *Geotrichum* sp était d'étudier l'effet de l'antagonisme. Au bout de 6 mois d'incubation de cette préparation à la température ambiante, il n'y a pas eu de prolifération des moisissures à la surface des olives, ce qui montre que l'effet antifongique du sel à une concentration de 25% s'est avéré efficace jusqu'à la fin du 4^{ème} mois de stockage. Pour les échantillons incubés à une température contrôlée de 25°C, le salage à 25% a été efficace pendant les 6 mois de stockage. La recherche des mycotoxines dans les olives salées et contaminées artificiellement après extraction au méthanol, purification par immunoaffinité et analyse des extraits par HPLC a montré l'absence de toute trace d'OTA et d'Aflatoxines.

3.7. Analyse de mycotoxines dans les échantillons d'huile d'olive

Les 35 échantillons d'huile d'olive provenant d'une Maâsra mobile (Ismaili-Alaoui *et al.*, 2004) ont été utilisés uniquement pour la recherche de mycotoxines. La recherche des Aflatoxines et de l'Ochratoxine a été réalisée à partir de 10 ml d'huile d'olive de chaque échantillon, suivant le même protocole expérimental décrit dans Matériel et Méthodes, selon la méthode de Papachristou & Markaki (2004). Aucun échantillon ne contenait d'Aflatoxines ou d'Ochratoxine.

Tableau 7. Origines des souches d'*Aspergillus niger* isolées au cours de la campagne oléicole 2004/2005 et leur production d'OTA dans les cultures sur grains de blé

Souches	Code Souche	Échantillon	Localité / (maâsra)*	Origine	OTA sur blé (g/kg)
<i>A. niger</i>	ZNM ₉	EO-6	Marrakech/B	Olives	170
<i>A. niger</i>	ZNM ₁₀	EG-3	Sidi Kacem/B	Grignons	31
<i>A. niger</i>	ZNM ₁₂	EO-13	Marrakech/B	Olives	200
<i>A. niger</i>	ZNM ₁₃	EO-10	Marrakech/B	Olives	140
<i>A. niger</i>	ZNM ₁₆	EO-12	Marrakech/B	Olives	220
<i>A. niger</i>	ZNM ₁₇	EO-11	Marrakech/B	Olives	0
<i>A. niger</i>	ZNM ₂₀	EO-3	Marrakech/B	Olives	0
<i>A. niger</i>	ZNM ₂₂	EO-11	Marrakech/B	Olives	171
<i>A. niger</i>	ZNM ₂₃	EG-5	Sidi Kacem/B	Grignons	0
<i>A. niger</i>	ZNM ₂₈	EG-9	Sefrou/B	Grignons	215
<i>A. niger</i>	ZNM ₂₉	EG-3	Sidi Kacem/B	Grignons	0
<i>A. niger</i>	ZNM ₃₂	EO-45	Sefrou/B	Olives	280
<i>A. niger</i>	ZNM ₄₇	EO-14	Marrakech/B	Olives	0
<i>A. niger</i>	ZNM ₅₇	Ech-42	Rabat/D	Olives	0
<i>A. niger</i>	ZNM ₈₃	EO-30	Sidi Kacem/B	Olives	155
<i>A. niger</i>	ZNM ₈₄	EO-32	Sidi Kacem/B	Olives	trace
<i>A. niger</i>	ZNM ₈₅	EG-13	Méknès/A	Grignons	126
<i>A. niger</i>	ZNM ₉₀	EO-39	SidiKacem/B	Olives	0
<i>A. niger</i>	ZNM ₉₁	EO-40	Sidi Kacem/B	Olives	195
<i>Aspergillus</i> sp	ZNM ₁₀₁	EO-38	Sidi Kacem/B	Olives	360
<i>A. niger</i>	GS33	E25	Fès/B	Grignons	158
<i>A. niger</i>	GS34	E1	Errachidia/B	Olives	210
<i>A. niger</i>	GS39	E5	Errachidia/B	Grignons	198
<i>A. niger</i>	GS74	E36	Méknès/C	Olives	113
<i>A. niger</i>	GS76	E46	Errachidia/E	Grignons	126
<i>A. niger</i>	GS92	E27	Fès/B	Grignons	276
<i>A. niger</i>	GS101	E42	Méknès/C	Olives	52
<i>A. niger</i>	44639	MUCL	Mexique	Café	190
<i>A. ochraceus</i>	44640	MUCL	Mexique	Café	250

* Nature des unités de trituration: A= Moderne; B:sémi-moderne; C: Unité traditionnelle; D: olives provenant du marché; E= Maâsra mobile.

4. DISCUSSION

Au Maroc les moulins de trituration d'olives s'appellent Maâsra. Il y en a plus de 30.000 Maâsra traditionnelles. Ces petites unités de trituration ont une capacité maximum de 700 kg d'olives/jour. À côté d'elles, il existe également de plus en plus d'unités modernes d'une capacité beaucoup plus grande. Cependant, le stockage des olives avant la trituration est une pratique courante, en particulier pour les petites unités et la durée de conservation est fonction de l'abondance de la récolte d'olives. Souvent l'addition de sel est pratiquée. Cependant, les olives stockées en tas peuvent se détériorer (Rahmani, 1996).

La plus grande partie des échantillons a été prélevée au niveau des Maâsra semi-modernes, ayant une capacité de trituration de plusieurs tonnes d'olives par jour. La collecte d'échantillons d'olives a été réalisée préférentiellement à partir des olives stockées plusieurs jours, devant la Maâsra. Les olives ou les grignons d'olives prélevées étaient déjà envahies par du mycélium. De ce fait, au moins une souche de moisissures a été isolée à partir du même échantillon d'olive avariée. Cependant, cette technique d'échantillonnage ne permet pas de faire une analyse quantitative. Par contre, elle contribue à étudier la distribution écologique des populations de moisissures dominantes sur les olives et les grignons d'olives. Pour les échantillons qui ont été prélevés en 2003 et en 2004 dans la même région, on retrouve une distribution similaire des principaux genres de moisissures.

La température d'incubation des cultures a été maintenue soit à 25°C pour isoler essentiellement des champignons filamenteux mésophiles, soit à 50°C pour isoler exclusivement les champignons filamenteux thermophiles ou thermotolérants. Parmi les champignons thermotolérants, les *A. fumigatus*, réputés toxigènes, représentent une population importante. Ces souches sont ubiquistes et ont été fréquemment isolées en 2003 et en 2004.

Parmi les *Aspergillus* mésophiles, les espèces suivantes sont des producteurs majeurs de mycotoxines: *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. ochraceus*, *A. clavus*, *A. versicolor*, *A. nidulans* (Le Bars & Le Bars 2000). Dans ce travail, les souches isolées appartiennent majoritairement à *A. niger*. Toutes ces souches isolées, lorsqu'elles sont cultivées sur des céréales, sont capables de produire des Ochratoxines. Certaines produisent même des quantités très élevées d'OTA (360 mg/kg). Ces résultats sont très originaux et, pour la première fois, concernent des souches d'*A. niger* isolées à partir d'olives. Par ailleurs l'utilisation de kits d'immunoaffinité (R-Ochraprep) ont permis, d'une part, de purifier les OTA et, d'autre part, de faciliter les analyses spécifiques pour confirmer que la plupart des souches d'*A. niger* isolées en 2003 et en 2004 sont toxigènes sur céréales. La méthode de purification des mycotoxines par immunoaffinité est très performante, simple et rapide par comparaison aux méthodes de purification traditionnelles. Par sa grande spécificité, elle a permis de mettre en évidence la production des ochratoxines par les souches d'*A. niger* cultivés sur céréales. Cependant, elle présente l'inconvénient d'être coûteuse pour la détection systématique des mycotoxines pour les analyses en série.

L'ochratoxine A est une mycotoxine produite par *Aspergillus ochraceus* et *Penicillium verrucosum*. L'OTA est néphrotoxique, elle serait le principal agent responsable de la Néphropathie Endémique des Balkans (BEN). Cette mycotoxine a été identifiée en Tunisie depuis 1983 et elle est systématiquement détectée dans diverses denrées alimentaires (Maaroufi, 1998). L'OTA a été détectée dans le sang des populations surtout rurales en Tunisie (néphropathie). L'ochratoxine A est fortement cancérigène (I.A.R.C., 1993).

Les aflatoxines sont essentiellement produites par quelques souches d'*Aspergillus flavus* et par d'autres souches d'*Aspergillus* comme *A. parasiticus*, et *A. nomius*. Il y a quatre sortes d'aflatoxines (B1, B2, G1 et G2) selon la fluorescence bleue ou verte en UV lorsqu'elles sont adsorbées sur des substrats solides. Dans les produits d'origine végétale, on rencontre essentiellement les aflatoxines B1 et G1 (Pittet, 1998). Les 7 souches d'*A. flavus* isolées sur olives et grignons d'olives sont productrices d'aflatoxines B1 sur riz. Ce résultat confirme les études précédentes obtenues sur olives (Tantaoui-Elaraki & Letutour, 1985; Belaiche, 2001).

Au cours de cette étude, le pouvoir toxigène des souches de *Penicillium* n'a pas été recherché. Cependant, parmi les *Penicillium*, les souches suivantes produisent des mycotoxines: *Penicillium cyclopium*, *P. verrucosum* ou *viridicatum*, *P. citrinum*, *P. expansum*, *P. granulatum* (Le Bars & Le Bars, 2000). Cette étude sera poursuivie, en particulier, pour la recherche de souches productrices de patuline, d'ochratoxine et de citrinine. Elle a permis de montrer l'absence de *Fusarium*, champignon qui contamine les produits végétaux et produit des fumonisines et la zéaralénone, deux mycotoxines, cancérigènes et génotoxiques (Riley *et al.*, 1998; Bacha *et al.*, 1998).

Par ailleurs, l'absence de mycotoxines dans les échantillons d'huile, provenant de la trituration des olives à l'aide de la Maâsra mobile, s'explique par le fait que les olives noires ont été traitées (lavées, triturées) immédiatement, juste après la récolte.

5. CONCLUSIONS

Dans cette étude, il y avait un triple objectif à atteindre. Tout d'abord connaître la nature de la mycoflore naturelle présente, dans les Maâsra, sur les olives et les grignons d'olive. Ensuite, mettre en évidence le pouvoir toxigène des souches sauvages isolées à partir de ces biotopes particuliers. Les résultats obtenus sur la diversité de moisissures nuisibles sur les olives contribuent à évaluer et à empêcher leur prolifération afin d'obtenir une huile d'olives saine et de qualité pour un développement durable du secteur oléicole au Maroc.

Ces résultats ont permis de mettre en évidence que la mycoflore mésophile dominante des olives et grignons d'olives provenant des Maâsra appartient aux genres *Aspergillus* et *Penicillium* qui renferment tous deux de nombreuses espèces toxigènes. La capacité des souches d'*A. niger* et d'*A. flavus* à produire respectivement de l'ochratoxine et de l'Aflatoxine sur céréales a été confirmée. Par contre, cette capacité ne semble pas pouvoir s'exprimer lorsque les mêmes souches sont cultivées sur les olives après salage à 25%. Le même biotope s'est également avéré riche en *Geotrichum*, *Mucor* et *Rhizopus*. Les espèces appartenant à ces genres ne semblent pas toxigènes, mais elles peuvent produire des enzymes comme les lipases et aussi causer une dégradation des olives et une altération de la qualité de l'huile d'olives, en particulier en augmentant son acidité. En ce qui concerne la diversité des souches thermophiles, celle-ci s'est limitée à 6 espèces appartenant chacune à un genre différent.

Au vu de ces résultats et afin d'améliorer sensiblement la qualité des olives et de l'huile d'olive, on recommande fortement le respect des 5 points suivants afin d'éviter les effets négatifs dus à une contamination par les moisissures:

1. Éviter les sources de contamination et les pratiques qui la favorisent comme la récolte par gaulage ou par ratissage à terre, les blessures, l'ensoleillement des olives, les modes de stockage en tas ou dans des sacs en plastique.
2. Écarter toutes les olives présentant un aspect moisi car elles contamineront très vite les autres.
3. Stocker les olives dans des caisses perforées, dans des locaux couverts, aérés, propres et désinfectés périodiquement.
4. Minimiser le temps de stockage autant que possible, moins de 48 heures, pour les olives destinées à la trituration.
5. Laver les olives avec de l'eau propre avant trituration.

Concernant les problèmes de la contamination des olives par des moisissures, on se propose de poursuivre les recherches sur la toxigenèse des souches de *Penicillium* qui se développent sur les olives plus fréquemment que les *Aspergillus*, et dont certaines espèces produisent l'ochratoxine A et les patulines.

De manière accessoire, ce travail a aussi permis de confirmer que la méthode de purification des mycotoxines par immunoaffinité est très performante, simple et rapide comparée aux méthodes traditionnelles. Son seul inconvénient étant d'être coûteuse.

6. REMERCIEMENTS

Projet financé par la coopération bilatérale Franco-Marocaine (Réf. PRAD 04/15) et par l'IRD-DSF (bourses de formation continue de KL et de MC). Les auteurs remercient Hervé Macarie pour la relecture attentive du manuscrit.

7. RÉFÉRENCES CITÉES

- Bacha H., Ghedira-Chekir L., Maaroufi K., Abid S., Zakhama A., Creppy E.E. (1998) Induction du système de réparation SOS de *E.coli* lysogène comme marqueur de la génotoxicité de la zéaralénone: Prévention par la vitamine E. *Méd. Vét.* 149 (6): 654.
- Belaiche T. (2001) Effet de la contamination par *A. flavus* et *A. ochraceus* sur la qualité des olives. *Industries alimentaires et agricoles* 118(12): 27-29.
- Botton B., Breton A., Fèvre M., Gauthier S. Guy Ph., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier JJ., Vayssier Y., Veau P. (1990) Les moisissures utiles et nuisibles: importance industrielle. Masson-Paris. 512 p.
- Cooney G.D, Emerson R.(1964) Thermophilic fungi. W.H. Freeman and Company, San Francisco pp.3-28.
- Cordova J., Roussos S., Baratti J., Nungaray J., Loera O. (2003) Identification of Mexican thermophilic and thermotolerant fungal isolates. *Micologia Aplicada Internacional* 15 (2): 37-44.

- Daradimos E, Markaki P & Koupparis M. (2000) Evaluation and validation of two fluorometric HPLC methods for the determination of aflatoxin B1 in olive oil. *Food additives and contaminants* 17(1): 65-73.
- Domsch K.H., Gams W., Anderson T-H. (1980) Compendium of soil fungi. Academic P., London, 859 tome 1, 405 Tome 2
- Fremy J.M & Dragacci S. (1999) Mycotoxines et produits laitiers. in A.P. Leszkowicz Les mycotoxines dans l'alimentation: évaluation et gestion du risque, Conseil supérieur d'hygiène publique de France, Section de l'alimentation et de la nutrition, Ed. TEC & DOC, 1999. p145.
- Gourama H, Le Tutour B, Tantaoui-Elaraki A. (1989) Effets of oleuropein, tyrosol and caffeic acid on the growth of mold isolated from olives. *Journal of food protection* 52: 264-266.
- I.A.R.C (1993) Ochratoxin A. Monograph on the evaluation of carcinogenic risks to humans (Lyon: Internat. Agency Research Cancer), pp. 489-521.
- Le Bars J. (1984) Développement des moisissures dans les denrées alimentaires et mycotoxinogénèse. In J.L. Multon. Les mycotoxines: connaissances actuelles et risques pour la santé publique dans la chaîne alimentaire. Ed. Apria. pp.3-18. 277p.
- Le Bars J., Le Bars P. (2000) Mycotoxigenesis in grains application to mycotoxic prevention in coffee. In T.Sera, C.R. Soccol, A. Pandey and S. Roussos (eds). *Coffee Biotechnology and Quality*. Kluwer, Dordrecht; 33: 355-368.
- Leontopoulos D, Siafaka A & Markaki P. (2003) Black olives as substrate for *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin B1 production. *Food Microbiol.* 20: 119-126.
- Leszkowicz A.P. (1999) Définition et origine des mycotoxines. Chap.1, Les mycotoxines dans l'alimentation: évaluation et gestion du risque. Conseil supérieur d'hygiène publique de France, Section de l'alimentation et de la nutrition, Ed. TEC & DOC, 1999. pp. 2-13. 145p.
- Maaroufi K., Abid S., Cherif A., Zakhama A., Achour A., Creppy E., Bacha H. (1998) Caryomégalie des cellules tubulaires rénales comme marqueur précoce de la néphrotoxicité induite par l'ochratoxine A chez le rat. *Rev. Méd. Vét.* 149 (6): 645.
- Nielsen K.F., Holm G., Utrup L.P, Nielsen P.A. (2004) Mould growth on building materials under low water activities: influence of humidity and temperature on fungal growth and secondary metabolism. *International Biodeterioration & biodegradation* 54: 325-336
- Papachristou A & Markaki P. (2004) Determination of ochratoxine A in virgin olives oils of Greek origin by immunoaffinity column clean-up and high-performance liquid chromatography. *Food Additives and Contaminants.* 21: 85-92
- Pitt J.I. (1979) The Genus *Penicillium* and its teleomorphic states: *Eupenicillium* and *Talaromyces*. Academic Press, London, 634 p.
- Pittet A. (1998) Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds- an updated review. *Rev. Méd. Vét.* 149 (6): 479-492.

- PNTTA (2001) Qualité des huiles d'olives au Maroc: enquête nationale et analyse au laboratoire. 2001. *Bulletin mensuel d'information et de liaison du PNTTA (programme national de transfert de technologie en agriculture)* n°79, avril 2001.
- PNTTA (2003) L'amandier, l'olivier, le figuier et le grenadier. 2003. *Bulletin mensuel d'information et de liaison du PNTTA (programme national de transfert de technologie en agriculture)* n°105, juin 2003.
- Rahmani M. (1996) Guide des bonnes pratiques de production de l'huile d'olive: unités traditionnelles et industrielles. Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Rabat; p. 36
- Rapper K.B., Fennell D.I. (1977) The Genus *Aspergillus*. Krieger Publishing company, New York, 686 p.
- Roussos S. (1987) Croissance de *Trichoderma harzianum* par fermentation en milieu solide: physiologie de sporulation et production de cellulases. Thèse de doctorat ès-sciences, Université de Provence, Marseille, IRD éditions TD Paris 193 p
- Salih (2004) Mycoflore des maâsra marocaines: Toxinogénèse des souches isolées d'*Aspergillus flavus* et d'*Aspergillus niger*, détection et analyse des mycotxines dans l'huile d'olive. Mémoire de troisième cycle. Filière des Industries Agricoles et Alimentaires. Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II. 153 p.
- Samson R.A., Hoekstra E.S., Frisvad J.C., Filtenborg O. (1996) Introduction to food-borne fungi. Centraalbureau voor schimmelcultures, Baarn, 322 p.
- Schipper M.A.A. (1978). The *Rhizopus stolonifer* group and *Rhizopus oryzae*. A revision of the genus *Rhizopus*. In Studies in Mycology N°25, Institute of the Royal Netherlands Academy of Sciences and Letters, CBS, Baarn.
- Tantaoui-Elaraki A & Le Tutour B. 1985. Contamination éventuelle des olives et dérivés par les mycotoxines: Le point. *Oléagineux* 40(8-9): 451-454.
- Tantaoui-Elaraki A, Le Tutour B & Aboussalim A. (1983) Conséquence de la contamination des olives par des *Aspergillus* toxigènes sur la qualité et la quantité de l'huile de pression. *Revue française des corps gras* 11(12) 473-476.
- Toussaint G., Lafaverge G. & Walker E.A. (1977) The use of high pressure liquid chromatography for determination of aflatoxin in olive oil. *Arch. Inst. Pasteur, Tunis* 3-4: 325-334.
- Wilson D.M & Math E.H. (1981) Growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* when in the presence of *Streptococcus lactis*. *Mycopathologia* 73: 49-56
- Zaouia N. (2005) Mycoflore naturelle des olives et comparaison du pouvoir toxigène des souches sur olives et céréales. Mémoire de troisième cycle. Filière des Industries Agricoles et Alimentaires. Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II. 161 p.

Mycoflore naturelle des olives dans les Maâsra et pouvoir toxigène des souches d'*Aspergillus* sur céréales

Durant les campagnes oléicoles 2003-2004 et 2004-2005, 171 échantillons d'olives, d'huile d'olive et de grignons d'olives ont été analysés pour la recherche de moisissures et des mycotoxines. 311 souches de moisissures ont été isolées en culture pure dont 193 souches mésophiles appartenant à 10 genres: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Geotrichum*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Trichoderma*, *Humicola*, *Alternaria*, *Acremonium*, *Ulocladium* et 118 souches thermophiles appartenant à 6 espèces: *Aspergillus fumigatus*, *Paecilomyces variotii*, *Mucor pusillus*, *Thermomyces lanuginosus*, *Humicola grisea* et *Thermoascus aurantiacus*. Aucune souche de *Fusarium* n'a, par contre, pu être isolée sur les échantillons analysés. Les *Penicillium* et les *Aspergillus* isolés représentent la majorité des souches (54%). Pour cette raison, notre étude de toxinogénèse a été orientée essentiellement sur la recherche des Aflatoxines (Af) et de l'Ochratoxine A (OTA), en laissant de côté la recherche des fumonisines et de la zéaralénone. L'ensemble des souches isolées d'*A. flavus* (9 souches) et d'*A. niger* (34 souches) ont été étudiés pour mettre en évidence leur pouvoir à produire respectivement les aflatoxines et l'ochratoxine A sur milieux amylicés. Toutes les souches d'*A. flavus* se sont avérées productrices d'aflatoxine B1 à des quantités allant de 60 à 95 µg/kg de poids sec de riz. Pour les souches d'*A. niger* 70% ont produit de l'ochratoxine A à des quantités allant de traces jusqu'à 360 µg/kg de poids sec de blé. Une étude préliminaire réalisée sur des olives noires à la grecque salées et contaminées artificiellement avec des spores d'*A. flavus* et de *Geotrichum* sp., a montré que les souches d'*A. flavus* et de *Geotrichum* sp. n'étaient pas capables de se développer sur ce substrat en présence de sel à 25%. De ce fait, il n'y a pas eu de mycotoxines sur des olives salées et contaminées artificiellement. Les analyses des 35 échantillons d'huile d'olive provenant de la Maâsra mobile ont montré qu'aucun échantillon ne contenait des Aflatoxines ou de l'Ochratoxine A.

Mots-clés: Mycoflore - Mésophile - Thermophile - Maâsra - Olives noires « Façon Grèce» - Contamination artificielle - Huile d'olive - Mycotoxines - Ochratoxine A - Aflatoxines - Pouvoir toxigène - Immuno-affinité - HPLC

Changes in phenolic content and antioxidant activity of Chemlali olive fruits during maturation

Mohamed BOUAZIZ¹, Hedy JEMAI¹ & Sami SAYADI^{1*}

¹ Laboratoire des Bio-procédés, Centre de Biotechnologie de Sfax, BP: K, 3038, Sfax, Tunisia

* Corresponding author, e-mail: sami.sayadi@cbs.rnrt.tn

1. INTRODUCTION

Olea europaea L. is a typical tree of the Mediterranean area where it is widely cultivated for oil production. Nowadays this region is the major international olive growing area, accounting for almost 98% of the world's olive tree plantation (Ryan & Robards, 1998). Tunisian olive plantation counts about 57 millions trees widespread on 12623 hectares. *Olea europaea* L. Chemlali variety is the more abundant olive variety which represents more than 60% of the total olive plantation in Tunisia (Khlif *et al.*, 2002). Olives are rarely consumed as natural fruit due to their extreme bitterness, but rather are consumed in either one of two forms; as oil or table olives.

Oleuropein is known to be the most prominent individual phenolic component of olive fruits and the responsible for their intense bitterness (Ryan *et al.*, 1999; Amiot *et al.*, 1986; Amiot *et al.*, 1989; Esti *et al.*, 1998). The concentration of oleuropein varied with olive varieties and declines with physiological development of fruit (Amiot *et al.*, 1986; Amiot *et al.*, 1989; Esti *et al.*, 1998; Bouaziz *et al.*, 2004). A relationship between oleuropein content in olive and other phenols such as certain flavonoids, demethyloleuropein and hydroxytyrosol has been revealed in many varieties (Amiot *et al.*, 1986).

The aim of this study is the identification and quantification of phenolic compounds in Chemlali olive cultivar, by using reverse-phase high performance liquid chromatography (HPLC) system. The evaluation of oleuropein, hydroxytyrosol, flavonoids and other phenolics at different stage of maturation was elaborated. In addition, we studied the antioxidant potential of olive extract during all stages of maturation.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Olive Extract Preparation

Chemlali olive variety was harvested from Sfax (Tunisia). The Olive samples were collected from the beginning of fruit development (01/07/2002) until the end of olive morphology (20/02/2003). Fruits (200 g) were selected randomly from around the

tree and then they were immediately transferred to the laboratory and freeze dried. After that, the olive was blended into a homogenous powder, which was stored for extraction. The extraction method adopted for phenolic compounds must be able to achieve the extraction of interest compounds and must avoid chemical modification. Olive (200 g) was blended and then was extracted twice with methanol and one time by a mixture of methanol-water 80/20 (v/v). Thus a multiple extraction procedure is essential for quantitative analysis of phenolic compounds.

2.2. High-performance liquid chromatography

Phenolic monomers and flavonoids identification were carried out by HPLC analysis. It was performed on a Shimadzu apparatus composed of a (LC-10ATvp) pump and a (SPD-10Avp) detector. The columns used to analyse monomeric phenols and flavonoids were respectively a C-18 (4.6 x 250 mm) Shim-pack VP - ODS and a C-8 (4.6 x 250 mm) Shim-pack CLC. The mobile phase used was 0.1% phosphoric acid in water (A) versus 70% acetonitrile in water (B) for a total running time of 50 min. All gradients used in this study provided adequate separation. C-18 column was more suitable for the resolution of the range of phenols and has been used for routine phenolic profiling at 280 nm. C-8 column provided adequate separation of flavonoids profiling, detected via UV monitoring at 335 nm. The identification and quantification of phenolic compounds in *Olea europaea* L. Chemlali olive variety was based on their spectra, on their retention time in comparison with phenolic standards analysed in the same condition and on the method of standard addition to the samples.

2.3. Total phenols measurement

The total phenols were determined by the colorimetric reaction with Folin-Ciocalteu reagent (Folin & Ciocalteu, 1927). An aliquot of the olive fruit aqueous methanol extract was mixed with (2 ml) Folin-Ciocalteu reagent (Prolabo). Sodium hydroxide solution (6% v/v) was added and the mixture was shaken. The blue colour formed was measured at 727 nm. The total phenols of aqueous methanol olive extracts, as determined by the Folin-Ciocalteu method was reported as pyrogallol equivalents by reference to a standard curve ($y = 0.0017 x$, $r^2 = 0.99$).

2.4. DPPH radical scavenging effect

The 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH radical) scavenging effect was evaluated according to the method employed by Bouaziz *et al.* (2004). Four milliliters of methanolic solution of different sample concentrations were added to a 10 mL DPPH methanol solution ($1.5 \cdot 10^{-4}$ M). After mixing the two solutions gently and leaving for 30 min at room temperature, the optical density was measured at 520 nm using a (Shimadzu UV-160 A) spectrophotometer. The antioxidant activity of each product and sample was expressed in terms of IC_{50} microgram per mL concentration required to inhibit 50% of DPPH radical formation and calculated from the log-dose inhibition curve.

3. RESULTS

3.1. Oleuropein and monomeric phenols

Fifteen phenolic compounds were identified in *Olea europea* L. Chemlali variety, these included classes of phenolic compounds such as hydroxybenzoic acids, hydroxycinnamic acids, flavonoids and phenolic alcohols. These phenolic compounds and their respective retention time (min) were as follow: hydroxytyrosol (11.2), tyrosol (17.6), *p*-hydroxybenzoic acid (19.9), vanillic acid (23.6), caffeic acid (25.8), coumaric acid (29.5), vanillin (34.2), ferulic acid (36.8), oleuropein (39.4), rutin (8.4), quercetin 3-arabino-glucoside (9.7), luteolin 7-O-glucoside (10.9), quercetin (18.3), luteolin (18.8), apigenin (22.3). External standard method was used to measure the concentrations as described by (Chamkha *et al.*, 2003). All calibration curves were linear over the concentration range tested with correlation coefficients > 0.96.

Figure 1 shows that high concentration of oleuropein was obtained during the green maturation sampling. It attained 6.5 g/kg (all data are reported on a fresh mass basis) for the sample harvested at the 30th august and was far in excess in comparison with the other phenolics. However the dominance of oleuropein was not sustained during the sampling period at various times. The content at initial harvest was 2.5 g/kg and then increased from the green to purple fruit, between the 2nd and 4th harvests. After this period, oleuropein concentrations decreased as the sampling period progressed and reached a minimum at the last stage of maturation (1.5 g/kg). The change in oleuropein content may be related to the increased activity of hydrolytic enzymes during maturation (Amiot *et al.*, 1989; Esti *et al.*, 1998). An inverse relationship between oleuropein content in olive fruit and hydroxytyrosol was observed from (20/10/2002) until the last sample. Indeed hydroxytyrosol concentration began at relatively low levels and increased as the sampling period progressed (Figure 1). Hydroxytyrosol is the principal product of oleuropein degradation during the maturation of fruit. Many chemical and enzymatic reactions cause the decrease of oleuropein concentration and the increase of hydroxytyrosol concentration (Ryan *et al.*, 2002). HPLC analyses showed that other phenolic compounds were present during the maturation stages of olive and their amounts are higher in black olives than in green ones. Tyrosol is the second abundant phenolic monomer compound, after hydroxytyrosol. The tyrosol concentration increased from 75 to 375 mg/kg during fruit maturation.

3.2. Flavonoids

Six flavonoids were identified, quantified and their quantities were reported as mg/kg fresh weight of olives. The flavonoids studied have been divided in two groups: flavones (luteolin 7-O-glucoside; luteolin and apigenin) and flavonols (rutin; quercetin 3-arabino-glucoside and quercetin). It appears that flavonoids glucosides were dominant and exhibited the most significant variation with physiological maturity. The main flavonoid compounds quantified in our study were luteolin 7-glucoside, rutin and quercetin 3-arabino-glucoside. The luteolin 7-O-glucoside amount was noticeably higher between the 4th and 6th harvests and the maximum concentration reached was at the 16th September with value of 70 mg/kg of fresh fruit. After this

period, its concentration decreased until the end of the sampling period. At the same time, luteolin concentrations started at very low levels and increased as the sampling period progressed. Apigenin remains substantially unchanged and quite low throughout all stages of maturation.

Profiles of the three flavonols identified in olive during maturation were dominated by quercetin 3-arabino glycoside. The last flavonol reached its maximum level at the 10th harvest and then decreased during the last stage of maturation. Rutin concentration increase slowly until the 11th harvest (80 mg/kg) and it decreased in the end of the growing period of the fruit. Quercetin concentrations were noticeably lower and showed very little change during the maturation. This may be related to *Olea europaea* L. fruit which appears to accumulate only glycosylated derivatives because they are probably less toxic than aglycones (Amiot *et al.*, 1989).

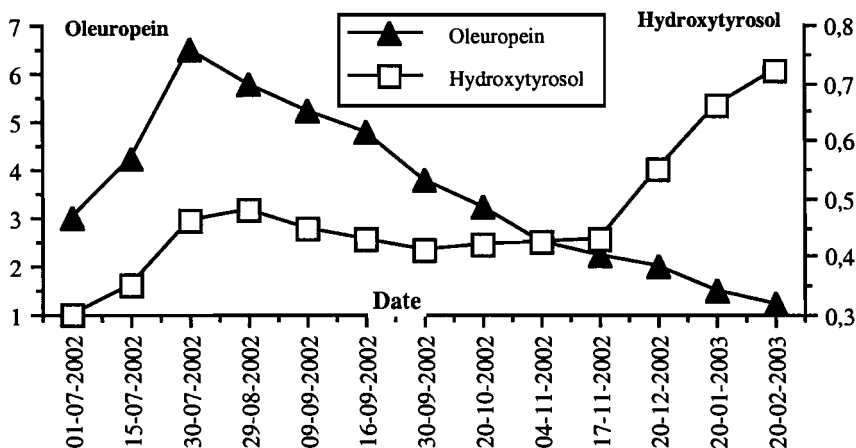


Figure 1. Oleuropein (g/kg of olive) and Hydroxytyrosol (g/kg of olive) levels during the maturation of olive variety

3.3. Total phenols determination

The total phenols concentration of olive extracts varied from 6 to 16 g/kg of equivalent pyrogallol during maturation of variety. The highest amounts of the total phenols were present in black olives (from the harvest of 20/10/02 to 20/02/03).

3.4. Antioxidant potential of crude extracts during maturation

The DPPH radical scavenging effect for all the methanol extracts is shown in figure 2. All extracts exhibited antioxidant activity which showed correlation between total phenol content and DPPH radical-scavenging activity over all stages of maturation. The lower IC₅₀ values (1.4 µg/ml) which indicated higher antioxidant potential were observed for the last harvested samples (Black olive extract). This is probably due to the significant inhibition of the radical formed by a high concentration of *O*-diphenol such as hydroxytyrosol and luteolin. The antioxidant activity and the level of total phenols in the extracts suggest that radical scavenging effect in the extract was

attributable to hydroxylated phenolic compounds; in particular the number of hydroxyl substituents in the aromatic ring and the nature of the substituents at the *para* or *ortho* position (Chimi *et al.*, 1991).

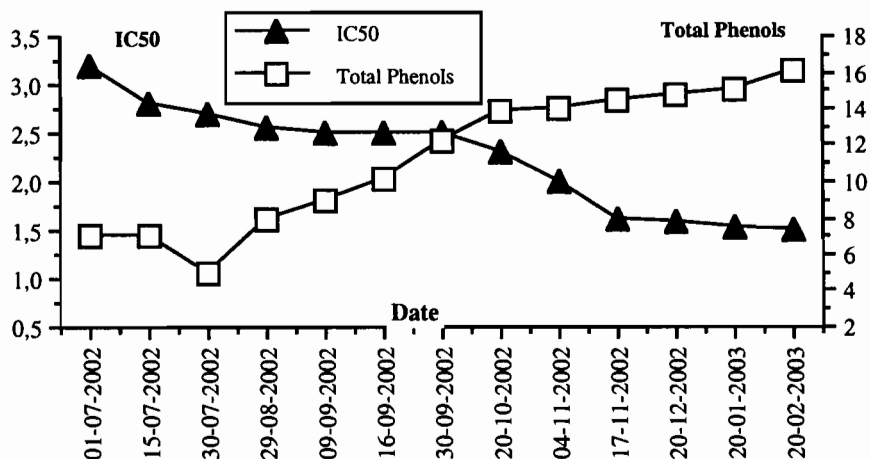


Figure 2. Correlation between total phenols concentrations (g/kg of olive) and DPPH radical scavenging effect (IC_{50}) of the extracts during maturation of fruits

4. ACKNOWLEDGEMENT

Thanks to the financial support provided by EC contract: ICA3-CT2002-10033“ and Contrats Programmes Secrétariat d’État à la Recherche Scientifique et à la Technologie, Tunisie”. The technical assistance of H. Aouissaoui is also gratefully acknowledged.

5. REFERENCES

- Amiot MJ, Fleuriet A & Macheix JJ (1986) Importance and evolution of phenolic compounds in olive during growth and maturation. *J. Agric. Food Chem.* 34: 823- 826.
- Amiot MJ, Fleuriet A & Macheix JJ (1989) Accumulation of oleuropein derivative during olive maturation. *Phytochemistry.* 28: 67-69.
- Bouaziz M, Chamkha M & Sayadi S (2004) Comparative study on phenolic content and antioxidant activity during maturation of the olive cultivar Chemlali from Tunisia. *J. Agric. Food Chem.* 5: 5476-5481.
- Chamkha M, Cathahla B, Cheynier V & Douillard R (2003) Phenolic composition of champagnes from chardonnay and pinot noir vintages. *J. Agric. Food Chem.* 57: 3179-3184.
- Chimi H, Cillard J, Cillard P & Rahmani M. (1991) Peroxyl and hydroxyl radical scavenging activity of some natural phenolic antioxidants. *J. Am. oil Chem. Soc.* 68: 307-312.
- Esti M, Cinquanta L & La Notle E (1998) Phenolic compounds in different olive varieties. *J. Agric. Food Chem.* 46: 32-35.
- Folin O & Ciocalteau U (1927) On tyrosine and tryptophan determinations protein. *J. Biol. Chem* 73: 627-650.
- Khlif M, Ayadi M, Grati-Kammoun N, Arous MN, Rekik H, Hamdi MT & Rekik-Fakhfakh B (2002) Identifying of Chemlali olive variety in its traditional area. *Acta Hort. (ISHS)* 586: 117-120.

- Ryan D & Robards K (1998) Phenolic compounds in olive. *Analyst*. 123: 31R-44R.
- Ryan D, Antolovich M, Prenzler P, Robards K & Lavee S (2002) Biotransformations of phenolic compounds in *Olea europaea* L. *Sci. Hortic.*,92: 147-176.
- Ryan D, Robards K & Lavee S (1999) Changes in phenolic content of olive during maturation. *Int. J. Sci. Food Tech.* 34: 265-274.

Changes in phenolic content and antioxidant activity of Chemlali olive fruits during maturation

For the first time the identification and quantification of phenolic compounds of the *Olea europaea* L. Chemlali olive cultivar, was carried out to examine their profile during maturation. The phenolic composition was studied by using a reverse-phase high performance liquid chromatography during all steps of fruit development. Oleuropein is the abundant phenolic compound in Chemlali olive and its concentration increased during maturation. An inverse relationship between oleuropein content in olive fruit and hydroxytyrosol was observed. Weak changes in the amounts of the other phenolic monomers and flavonoids were also observed. The total phenolic content widely varied from 6 to 16 g/kg expressed as pyrogallol equivalents. The high level was found at the last maturation period. Antioxidant capacity of olive extracts was evaluated by measuring the radical scavenging effect on 1,1 diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH). The IC₅₀ values of the olive extract ranged from 3.2 to 1.5 µg/ml. There was correlation between antioxidant activity and total phenolic content of samples. The antioxidant activity increased with maturation, and can be attributed to the increased level of the total phenols with fruit development.

Keywords: Olive - Phenolic compounds - Maturation - Antioxidant

Étude comparative du contenu phénolique et de l'activité antioxydante durant la maturation des olives de la variété Chemlali

L'identification et la quantification de la composition phénolique des olives de la variété Chemlali d'*Olea europaea* L. ont été réalisées au cours de la maturation. L'oleuropéine est le composé le plus dominant dans les olives. Cet ester ou oleoside 11-méthylester et le 3,4 dihydroxyphényléthanol (hydroxytyrosol) confèrent une saveur amère à l'olive. Les analyses chromatographiques par HPLC montrent une diminution significative de la concentration en oleuropéine au cours de la maturation des olives en faveur d'une augmentation de la concentration en hydroxytyrosol. Le dosage par la méthode de Folin montre une augmentation des phénols totaux au cours de la maturation des olives. Leur concentration varie de 6 à 16 g/kg en équivalent pyrogallol. La détermination de l'activité antioxydante des extraits, au cours de la maturation d'olive, par la méthode DPPH montre une augmentation associée à celle de la concentration en phénols totaux.

Mots-clés: Olive - Composés phénoliques - Maturation - Activité antioxydante

Stabilité oxydative (photooxydation) de l'huile d'olive vierge. Influence du degré de maturité des olives

Mohammed RAHMANI ¹ & Idrissia JANATI IDRISSE ¹

¹ Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, BP 6202-Instituts, Madinate Al Irfane 10101 Rabat, Maroc

Auteur correspondant, courriel: m.rahmani@iav.ac.ma

1. INTRODUCTION

L'huile d'olive vierge est l'huile provenant du fruit de l'olivier cultivé (*Olea europaea* L.) uniquement par des procédés mécaniques, ou d'autres procédés physiques, dans des conditions, thermiques notamment, qui n'entraînent pas l'altération de l'huile, et n'ayant subi aucun traitement autre que le lavage, la décantation, la centrifugation et la filtration. Aucun additif n'est autorisé dans l'huile d'olive vierge (COI, 2003).

L'huile d'olive vierge est consommée sans raffinage et, de ce fait, garde toute sa composition naturelle. Elle est réputée pour sa saveur caractéristique et son profil d'acides gras représenté essentiellement par l'acide oléique. Elle a montré des vertus thérapeutiques importantes, notamment contre l'athérosclérose, ce qui la distingue des autres huiles végétales alimentaires. De par ses vertus thérapeutiques, l'huile d'olive vierge a connu un regain d'intérêt ces dernières années. Pour consolider l'image de marque supérieure acquise par l'huile d'olive vierge, la préservation de sa qualité est une condition essentielle.

La qualité commerciale de l'huile d'olive vierge est définie, à l'échelon international, par la norme du Conseil Oléicole International (COI, 2003) et par celle du Codex Alimentarius (1981). Ces normes distinguent entre quatre différents types de qualité de l'huile d'olive vierge: « extra », « vierge », « vierge courante » et « vierge lampante ». L'huile appartenant à ce dernier type de qualité est impropre à la consommation en l'état. Son intégration dans le circuit des huiles alimentaires est conditionnée par son raffinage. Ces divers types de qualité sont définis en fonction de critères physico-chimiques (l'acidité libre, l'indice de peroxyde, l'absorbance dans l'UV) et de critères organoleptiques.

À l'instar des autres huiles végétales alimentaires, l'huile d'olive vierge peut être altérée par différents mécanismes: lipolyse enzymatique, autoxydation et photooxydation. Cette dernière réaction est particulièrement importante. Elle est catalysée en présence de lumière par les pigments chlorophylliens qui attribuent à cette huile sa coloration verdâtre caractéristique.

En présence de lumière, l'huile d'olive vierge est la moins stable de toutes les huiles alimentaires et ce, malgré son faible degré d'insaturation. Au-delà d'un indice de peroxyde supérieur à 20 meq O/ kg, cette huile devient non apte à la consommation en l'état. Aussi, la lutte contre la photooxydation revêt un grand intérêt pour l'huile d'olive vierge. L'utilisation d'un emballage opaque pour le conditionnement de l'huile et le choix de la date de récolte des olives en vue d'optimiser la composition en agents antioxydants naturels (β -carotène, tocophérols et polyphénols) et de réduire le degré d'insaturation de l'huile et sa teneur en pigments chlorophylliens sont deux alternatives possibles.

Le présent article est une mise au point sur l'effet du degré de maturité des olives (cv. Picholine marocaine) sur la composition en acides gras et en antioxydants naturels des huiles qui en sont extraites. L'impact de cette composition sur la stabilité à la photooxydation des huiles d'olive vierges est également discuté.

2. PHOTOOXYDATION DES HUILES D'OLIVES VIERGES: MÉCANISME ET FACTEURS D'INFLUENCE

Les pigments chlorophylliens (^1chl) dans les huiles végétales sont dotés d'un pouvoir photosensibilisateur se traduisant par la production de l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$). Cette action prooxydante des pigments verts est, dans l'huile d'olive vierge exposée à la lumière, fonction directe de leur concentration et de leur type: phéophytine b > phéophytine a > chlorophylle b > chlorophylle a (Interesse *et al.*, 1971; Rahmani, 1987).

L'oxygène singulet ainsi produit réagit directement par simple addition sur chaque carbone de la double liaison de l'acide gras insaturé (LH) de l'huile (réaction dite « ène ») pour donner des hydroperoxydes (LOOH) (Figure 1).

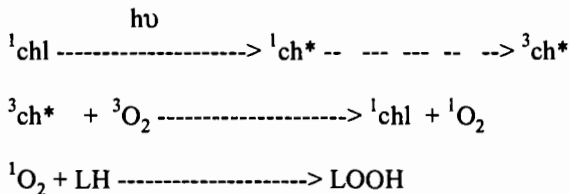


Figure 1. Mécanisme de photooxydation sensibilisée des lipides insaturés

La réaction de photooxydation est très rapide. L'oxygène singulet est environ 1500 fois plus réactif envers l'acide linoléique que l'oxygène à l'état fondamental (Rawls & Van Santen, 1970). À la différence des réactions radicalaires d'autoxydation qui ne produisent que des isomères hydroperoxydes conjugués, la photooxydation induite par les pigments chlorophylliens produit aussi bien des isomères hydroperoxydes conjugués que des isomères hydroperoxydes non conjugués. Pour une huile alimentaire à faible teneur en acide linoléique, ce qui est le cas de l'huile d'olive vierge, la présence d'une quantité substantielle de l'isomère 12-hydroperoxyde est une indication de photooxydation sensibilisée.

2.1. Influence du degré d'insaturation de l'huile

Les acides gras composant l'huile d'olive vierge sont les acides arachidique ($C_{20}:0$), gadoléique ($C_{20}:1$), oléique ($C_{18}:1$), linoléique ($C_{18}:2$), linoléinique ($C_{18}:3$), stéarique ($C_{18}:0$), palmitoléique ($C_{16}:1$) et palmitique ($C_{16}:0$).

L'acide oléique est le principal acide gras, ce qui confère à l'huile d'olive vierge son caractère monoinsaturé la plaçant en une position intermédiaire entre les graisses animales et les huiles végétales polyinsaturées. Selon Ait Yacine *et al.* (2002), l'huile d'olive vierge issue des fruits de la variété « Picholine marocaine » montre une composition différente en acides gras, selon le degré de maturité de ces derniers (Tableau 1).

Il ressort du tableau 1 que l'acide oléique est l'acide gras prédominant tout au long de la maturation des fruits. Sa teneur augmente dans un premier temps pour se stabiliser à environ 73%, puis diminue légèrement par la suite. Les acides stéarique et linoléique montrent des teneurs croissantes en fonction de la maturation des fruits, à l'inverse des acides palmitique, palmitoléique et linoléinique. Les teneurs des acides arachidique et gadoléique restent constants tout au long de la période de maturation des fruits.

Tableau 1. Composition (%) en acides gras d'huiles d'olive vierges en fonction du degré de maturité des fruits (cv. Picholine marocaine, campagne 1998/99)
D'après Ait Yacine *et al.*, (2002)

Date de récolte	Acides gras							
	$C_{16}:0$	$C_{16}:1$	$C_{18}:0$	$C_{18}:1$	$C_{18}:2$	$C_{18}:3$	$C_{20}:0$	$C_{20}:1$
30/08	16,8	0,9	1,9	65,4	7,0	1,7	0,4	0,4
30/09	14,1	0,8	2,3	72,1	10,1	1,2	0,3	0,4
30/10	10,2	0,7	2,4	73,8	12,2	0,9	0,2	0,5
30/11	11,9	0,8	2,8	74,0	13,6	0,9	0,3	0,4
30/12	9,4	0,6	3,0	72,0	14,0	0,8	0,3	0,4
30/01	8,6	0,5	3,3	69,9	17,2	0,9	0,3	0,4

Étant donné que la vitesse de photooxydation augmente en fonction du degré d'insaturation, la récolte des olives doit intervenir au moment où la teneur en acide oléique est maximale. Dans le cas des données rapportées dans le tableau 1, la date optimale de récolte doit intervenir au courant du mois de novembre.

2.2. Rôle des composés phénoliques

La teneur des composés phénoliques totaux, exprimée en acide caféique, varie de 50 à 500 ppm (Vazquez Roncero, 1978). Les composés phénoliques majoritaires dans les huiles d'olive vierges sont le tyrosol et l'hydroxytyrosol, suivis de traces d'acides cinnamiques substitués dont l'acide caféique, l'oleuropéine aglycone et l'oleuropéine.

Janati Idrissi (1998) a montré que les composés phénoliques naturels jouent un rôle antioxydant en désactivant l'oxygène singulet. Les constantes de vitesse de désactivation des composés phénoliques sont corrélées avec leurs pouvoirs antioxydants. Les ortho-diphénols (hydroxytyrosol et acide caféique) ont montré une activité antioxydante plus élevée que celle des monophénols (tyrosol et acide syringique). Toutefois, les activités antioxydantes des polyphénols en photooxydation sont plus faibles que celles qui sont montrées en autoxydation (Tableau 2). Ce résultat peut être expliqué par la plus grande vitesse de dégradation des composés phénoliques en cours de photooxydation.

Tableau 2. Facteurs de protection FP_{20}^* des composés phénoliques utilisés à une concentration de 0,01% (m/m) dans l'huile d'olive décolorée

Composé phénolique	FP_{20}^*	
	Autoxydation**	Photooxydation sensibilisée par la chlorophylle a***
- Hydroxytyrosol	6,9	2,3
- Acide caféique	5,6	1,6
- Tyrosol	1,0	1,2
- Acide syringique	—	1,1

(*) Facteur de protection $FP_{20} = T_{20}/T_{20}^0$, T_{20} et T_{20}^0 sont les temps nécessaires pour que l'indice de peroxyde atteigne la valeur 20 meq O/kg. Pour le témoin: $T_{20}^0 = 497$ heures (autooxydation) et $T_{20}^0 = 70$ heures (photooxydation).

(**) D'après Chimi *et al.* (1988).

(***) D'après Janati Idrissi (1998).

La teneur des composés phénoliques totaux est maximale au stade semi-noir des fruits qui correspond par ailleurs à la phase d'hydrolyse de l'oleuropéine, libérant l'hydroxytyrosol dans l'huile (Rahmani, 1987). Ainsi, le choix du stade optimal de récolte coïncidant avec la teneur la plus élevée en polyphénols totaux et en hydroxytyrosol est une solution efficace pour lutter contre la réaction altérative de photooxydation.

2.3. Influence des tocophérols et du β -carotène

La teneur en tocophérols totaux des huiles d'olive vierges varie de 5 à 300 mg/kg, selon l'acidité de ces dernières. La composition qualitative des tocophérols totaux montre une prédominance de l'isomère alpha (90-100%). L'addition de l' α -tocophérol à des concentrations de 50, 100 et 150 mg/kg d'huile n'a pas réduit de façon significative la vitesse de photooxydation induite par les pigments chlorophylliens de l'huile d'olive décolorée (Kiritsakis & Dugan, 1985). Des résultats similaires ont été rapportés par Rahmani (1987).

Les concentrations du β -carotène dans l'huile d'olive vierge varient entre 0,33 et 4,2 mg/kg selon la variété, le degré de maturité, la méthode de cueillette des olives, le système technologique utilisé pour l'extraction de l'huile, l'âge de l'huile ainsi que d'autres facteurs (Fedeli, 1977; Kiritsakis & Dugan, 1985).

Le β -carotène est bien connu comme un désactivant de l'oxygène singulet (Kiritsakis & Dugan, 1985; Rahmani, 1987) et, de ce fait, compte parmi les inhibiteurs les plus efficaces de la photooxydation des huiles alimentaires. L'effet inhibiteur du β -carotène a été montré pour une concentration de 4 ppm dans l'huile d'olive décolorée (Kiritsakis & Dugan, 1985) et augmente avec la concentration de ce pigment (Fakourelis *et al.*, 1987). Cet effet inhibiteur est également dépendant de la concentration des pigments chlorophylliens dans l'huile. Pour un même rapport de concentrations phéophytine / β -carotène, une meilleure protection de l'huile d'olive est obtenue avec les plus faibles concentrations de phéophytine a (Rahmani & Saad, 1989). Toutefois, l'activité antioxydante du β -carotène est réduite par sa sensibilité à l'autoxydation. L' α -tocophérol protège le β -carotène contre l'autoxydation, ce qui lui restaure toutes ses propriétés d'agent désactivateur de l'oxygène singulet.

3. DÉTERMINATION DE LA DATE OPTIMALE DE RÉCOLTE DES OLIVES (CV. PICHOLINE MAROCAINE)

Comme mentionné auparavant, les différents composés mineurs affectant la vitesse de photooxydation de l'huile d'olive vierge sont sous étroite influence du degré de maturité des fruits. Ce dernier affecte également la qualité organoleptique de l'huile. L'influence du degré de maturité peut être résumée comme suit:

- Au stade vert, les olives donnent une huile peu aromatisée, très riche en pigments chlorophylliens et donc très instable en présence de lumière. Le rendement d'extraction de l'huile est également faible à un tel stade de maturité.
- À un stade avancé de maturité (stade noir), le rendement d'extraction de l'huile est élevé. Toutefois, l'huile obtenue est peu aromatisée, un peu plus acide suite à l'activation de la lipase endogène et pauvre en composés phénoliques. Une récolte plus tardive peut également augmenter les risques de dommages sur les fruits (ravageurs, mauvaises conditions climatiques, ...), ce qui se traduit par l'apparition de défauts organoleptiques et une peroxydation plus élevée.

Plusieurs méthodes visant à déterminer l'époque optimale de récolte ont été décrites dans la littérature (Solinas & Marsilio, 1987; Maestro Duran, 1990; Fiorino & Nizzi Grifi, 1991; Mariani *et al.*, 1991; Rahmani *et al.*, 1997).

La mise en œuvre des polyphénols totaux comme indicateur de la date optimale de récolte est une méthode fiable, qui présente les avantages suivants:

- La teneur optimale des composés phénoliques assure une bonne stabilité de l'huile. Une concentration de polyphénols totaux supérieure à 200 $\mu\text{g/g}$, exprimée en acide caféique, est considérée comme un minimum pour obtenir une huile d'olive vierge de bonne qualité (Vazquez Roncero, 1978).
- Les composés responsables de l'arôme de l'huile ont le même profil de variation, en fonction de la maturation des fruits, que les composés phénoliques.
- Les composés phénoliques sont des antioxydants naturels. Un regain d'intérêt pour ces composés a été observé ces dernières années, en relation avec les processus de vieillissement et d'athérosclérose.

3.1. Procédure expérimentale

L'échantillonnage a été effectué à la station expérimentale de Ménara de l'Institut National de Recherche Agronomique (INRA) de Marrakech. Les échantillons d'olives ont été collectés sur des arbres autoenracinés, âgés de dix ans, du cultivar « Picholine marocaine », en culture irriguée et en disposition de plantation 10 m x 10 m. Cinq arbres ont été sélectionnés au cours de la campagne 1994/95, en fonction du développement de leur frondaison et du poids des fruits. Les olives ont été récoltées le 26 octobre 1994 (olives vertes), le 22 novembre 1994 (olives tournantes) et le 27 janvier 1995 (olives noires).

L'indice de maturité des fruits a été déterminé suivant la méthode développée par la Station d'Oléiculture de Jaén (Espagne) et décrite par Walali Loudiyi *et al.* (1984). La teneur en huile a été mesurée à l'aide d'un extracteur Soxhlet. Les composés phénoliques ont été extraits à partir de la pâte fraîche selon la méthode de Fantozzi & Montedero (1978). La spectrophotométrie a été exprimée en acide caféique d'après la méthode de Vazquez Roncero *et al.* (1973). Les caractéristiques carpométriques des fruits (poids de 100 fruits, poids de 100 noyaux, poids de la pulpe de 100 fruits et le rapport pulpe/noyau) et leur humidité ont été également déterminées en fonction de l'avancement du processus de maturation.

3.2. Évolution des caractéristiques carpométriques

Les caractéristiques carpométriques des fruits, en fonction de leur degré de maturité, sont indiquées dans le tableau 3.

Tableau 3. Évolution des caractéristiques carpométriques des fruits cv. « Picholine marocaine » en fonction du degré de maturité (*)

Date de récolte	Poids de 100 fruits (g)	Poids de 100 noyaux (g)	Poids de la pulpe de 100 fruits (g)	Rapport pulpe/noyau
26/10/1994	319,49	61,67	257,82	4,18
22/11/1994	350,26	62,22	288,03	4,63
27/01/1995	368,06	62,39	305,17	4,90

(*) Les valeurs indiquées sont la moyenne de 2 déterminations.

Le poids du noyau est resté constant ce qui indique qu'il a atteint son plein développement en début de récolte. Le rapport pulpe/noyau a montré une croissance régulière au fur et à mesure de la progression du processus de maturation. Toutefois, ce rapport demeure inférieur à 5,0 qui est le minimum exigé pour les fruits destinés à une élaboration en olives de table. Ce minimum n'est pas exigé pour les olives destinées à la production d'huile.

3.3. Évolution de l'humidité, des teneurs en huile et en polyphénols totaux

Les concentrations d'eau, d'huile et de polyphénols totaux sont indiquées dans le tableau 4.

Tableau 4. Contenu en eau, humidité, huile et polyphénols totaux dans les fruits en fonction du degré de maturité (*)

Date de récolte	Poids de 100 fruits (g)	Quantité d'eau (g) dans 100 fruits	Humidité (%)	Contenu en huile (%)	Quantité d'huile (g) dans 100 fruits	Polyphénols totaux (**) (µg/g)
26/10/1994	319,49	182,23	57,04	13,19	13,19	139,7
22/11/1994	350,26	193,20	55,16	55,16	18,70	148,1
27/01/1995	368,06	204,19	55,48	55,48	18,86	140,5

(*) Les valeurs indiquées sont la moyenne de 2 déterminations.

(**) en mg d'acide caféique/100g de pulpe fraîche.

La teneur en eau dans les fruits augmente régulièrement avec l'avancement du degré de maturité et explique l'augmentation de leur taille. L'accumulation d'huile a été rapide au cours de la première phase (entre le 26 octobre et le 22 novembre 1994) et plus lente par la suite. Les concentrations de polyphénols totaux dans les olives ont augmenté jusqu'à un maximum de 148,1 mg/100 g de pulpe fraîche puis ont diminué au cours de la seconde phase. Cette diminution des concentrations de polyphénols totaux a correspondu au changement de couleur des fruits, du vert au violacé.

La première période de récolte ne peut pas être considérée comme étant la période optimale vu les faibles teneurs des fruits en huile et en polyphénols totaux. La deuxième période pourrait être considérée comme optimale pour la récolte en raison du contenu relativement élevé en huile et en polyphénols.

4. CONCLUSION

L'huile d'olive vierge, consommée sans raffinage préalable, garde toute sa composition chimique naturelle. Malgré son profil de composition spécifique en acides gras, caractérisée par une richesse en acide oléique, cette huile est très instable en présence de lumière, à cause de sa teneur exceptionnellement élevée en pigments chlorophylliens (chlorophylles et phéophytines). Ces derniers sont de puissants sensibilisateurs, qui initient la photooxydation de l'huile en produisant de l'oxygène singulet.

La photooxydation de l'huile d'olive vierge, sensibilisée par les pigments chlorophylliens, produit des hydroperoxydes et peut conduire à une altération de ses propriétés organoleptiques. Pour minimiser l'effet de cette réaction altérative, seules deux alternatives sont possibles: l'utilisation d'un emballage opaque et/ou la détermination de la date optimale de récolte pour minimiser le degré d'insaturation de l'huile et sa teneur en pigments chlorophylliens, d'une part, et optimiser sa composition en composés antioxydants naturels (β -carotène, tocophérols et composés phénoliques), d'autre part. La teneur en composés phénoliques de l'huile est un critère fiable pour la détermination de la date optimale de récolte des olives.

5. RÉFÉRENCES CITÉES

- Ait Yacine Z., Serhrouchni M., Hilali S. (2002) Changes in the fatty acid composition of olive oil at different stages of olive maturity: case of the Tadla region of Morocco. *Olivae* 94: 51-53.
- Chimi H., Sadik A., Le Toutour B., Rahmani M. (1988) Contribution à l'étude comparative des pouvoirs antioxydants dans l'huile d'olive du tyrosol, de l'hydroxytyrosol, de l'acide caféique, de l'oleuropéine et du BHT. *Rev. Fse. Corps Gras* 35 (8/9): 339-344.
- Codex Alimentarius (1989) Norme Codex pour les huiles d'olive vierges et raffinées et pour l'huile de grignons d'olive raffinée. Codex Stan 33-1981 (Rev. 1-1989).
- Conseil Oléicole International (2003) Norme commerciale applicable aux huiles d'olive et aux huiles de grignons d'olive. COI/T.15/NC n°3/25 Juin 2003.
- Fakourelis N., Lee E.C., Min D.B. (1987) Effects of chlorophyll and β -carotene on the oxidation stability of olive oils. *J. Food Sci.* 52: 234-235.
- Fantozzi P., Montedero G. (1978) Dosage des composés phénoliques dans les drupes d'olives récoltées à différents stades de la maturation. *Ind. Alim. Agr.* 95: 1335-1339.
- Fedeli E. (1977) Lipids of olives. *Prog. Chem. Fats Other Lipids* 15: 57-74.
- Fiorino P., Nizzi Grifi F. (1991) Maturation des olives et variation de certains composants de l'huile. *Olivae* 35: 25-33.
- Interesse F.S., Ruggiero P., Vitagliano M. (1971) L'autossidazione dell'olio di oliva influenza dei pigmenti chlorofillici. *Industria Agraria* 9: 318-324.
- Janati Idrissi I. (1998) Contribution à l'étude du pouvoir antioxydant (photooxydation) des composés phénoliques de l'huile d'olive vierge. Thèse DES (Agrochimie), Université Ibn Tofail, Faculté des Sciences - Kénitra, 1998, N° Ordre 60.
- Kiritsakis A.K., Dugan L.R. (1985) Studies in photooxidation of olive oil. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 62: 892-896.
- Maestro Duran R. (1990) Relationship between the composition and ripening of the olive and quality of the oil. *Acta Hort.* 286: 441-451.
- Mariani C., Fedeli E., Grøb K., Artho A. (1991) Variations in the free and esterified minor components of oils from olives in connection with maturation and storage. *Riv. Ital. Sostanze Grasse* 68: 179-186.
- Rahmani M. (1987) Studies of factors affecting olive oil quality with special reference to Morocco. Thèse Ph. D., Université de Minnesota, USA.
- Rahmani M., Saad L. (1989) Photooxydation des huiles d'olive: Influence de la composition chimique. *Rev. Fse Corps Gras* 36 (9/10): 355-360.
- Rahmani M., Lamrini M., Saari Csallany A. (1997) Mise au point d'une méthode simple pour déterminer l'époque optimale de récolte des olives. *Olivae* 69: 48-51.
- Rawls J.R., Van Santen P.J. (1970) A possible role for singlet oxygen in the initiation of fatty acid autoxidation. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 47: 121-125.
- Solinas M., Marsilio V. (1987) Evoluzione di alcuni componenti dell'aroma degli oli vergini di oliva in relazione al grado di maturazione delle olive. *Riv. Ital. Sostanze Grasse* 64: 475-480.
- Vazquez Roncero A. (1978) Les polyphénols de l'huile d'olive et leur influence sur les caractéristiques de l'huile. *Rev. Fse. Corps Gras* 25 (1): 21-26.
- Vazquez Roncero A.C., Janer del Valle C., Janer del Valle M.L. (1973) Determinación de los polifenoles totales del aceite de oliva. *Grasas y Aceites* 24: 350-357.
- Walali Loudiyi D.M., Chmitah M., Loussert R., Mahhou A., Boulouha B. (1984) Caractères morphologiques et physiologiques de clones d'olivier Picholine marocaine. *Olivae* 3: 26-31.

Optical inspection for quality separation of olive fruit

Serafim EFSTRATIADIS¹, Apostolos KIRITSAKIS², Aristotelis BIZOPOULOS¹,
Fotis STERGIOPOULOS¹, Demetrios BECHTSIS¹, Vasilios KILINTZIS¹,
Antonis ANTONIADIS¹, Kostas KIRITSAKIS² & Kostas KOKONAS²

¹ Dept. of Electronics, School of Applied Technology

² Dept. of Food Technology, School of Food Technology and Nutrition, Technological Institute of Thessaloniki, 54101 Thessaloniki, Greece

Corresponding author, e-mail: kiritsak@food.teithe.gr

1. INTRODUCTION

One of the great problems in the process of olive oil production and the selection of table olives is the sustained high quality of the incoming olive fruit which may have been subjected to defects (e.g. from falling, manipulation, transportation, etc.), as well as, attack of insects (e.g. *Bactrocera oleae*) or diseases (Newenschuander & Michelakis, 1978; Kiritsakis, 1998; Pencue Fierro & Leon-Tellez, 2004).

This work is part of a joint research project that is aimed to the design and implementation of an automated method for quality separation of the olive fruit, that cannot otherwise be evaluated (electrically or chemically), using sophisticated digital image processing techniques. More specifically, the method is expected to identify defects on the surface of the olive fruit following the washing stage of the fruit. It will be a part of the process line of table olives and oil production processing unit. This automated classification of the fruit according to its quality is very important for the efficient production of extra virgin olive oil. Furthermore, the method can be used to automatically identify alien objects such as branches, small stones, iron particles, etc. which may be necessary to be separated from the olive fruit, since they could alter the quality of the olive oil. Such a method could be used in conjunction with the HACCP system in an olive production unit.

In the following, we present the modeling approach used, the optical inspection method and the preliminary obtained results.

2. THE PROPOSED METHOD

Figure 1 outlines a typical olive oil production process with the proposed optical inspection as an intermediate stage.

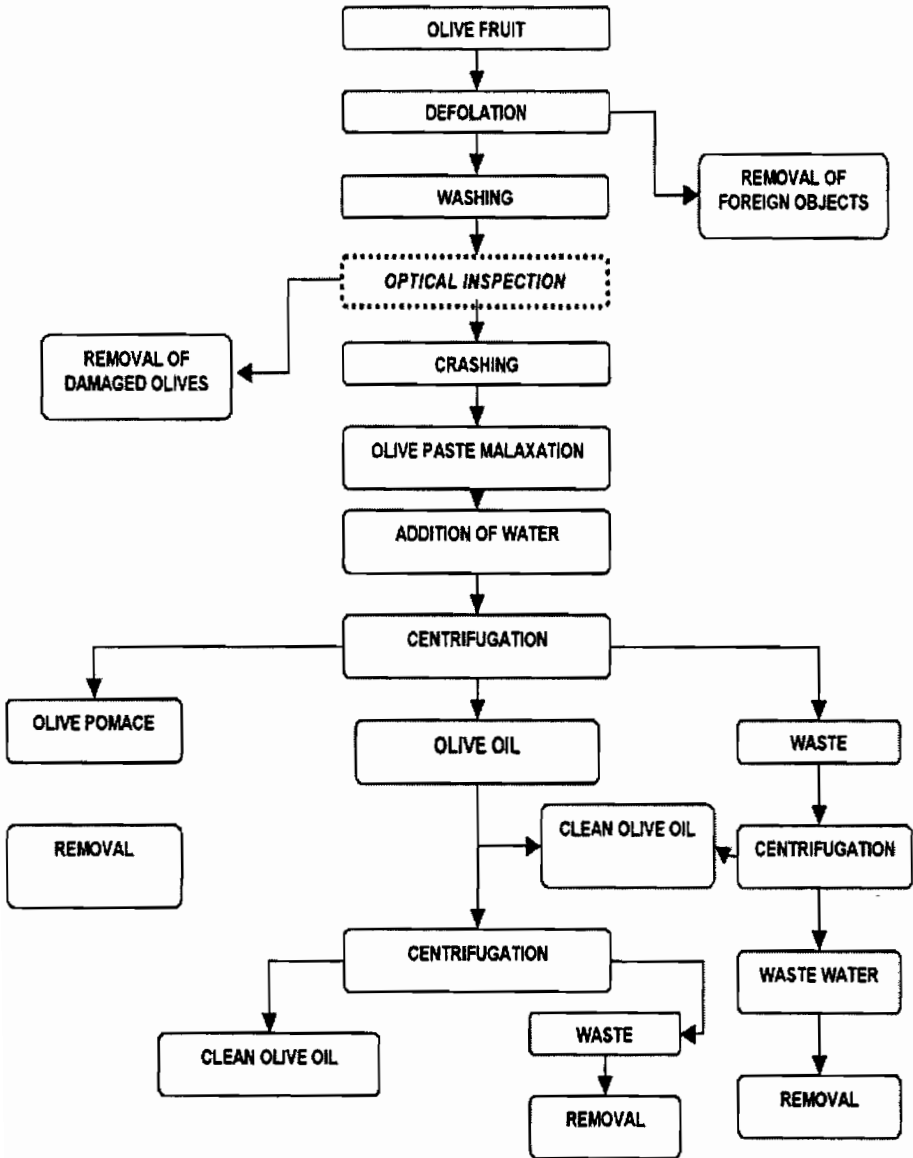


Figure 1. The process of olive oil production including the proposed optical method

The hardware implementing the optical inspection method consists of a digital color CCD camera connected to a computer system. Following the washing stage (Figure 2) a set of light sources over a sequential alignment of the olive fruit in parallel channels provides to the computer system frames of the revolving olives. A schematic diagram of the optical inspection system is shown in Figure 3.



Figure 2. The washing stage in the olive oil production process

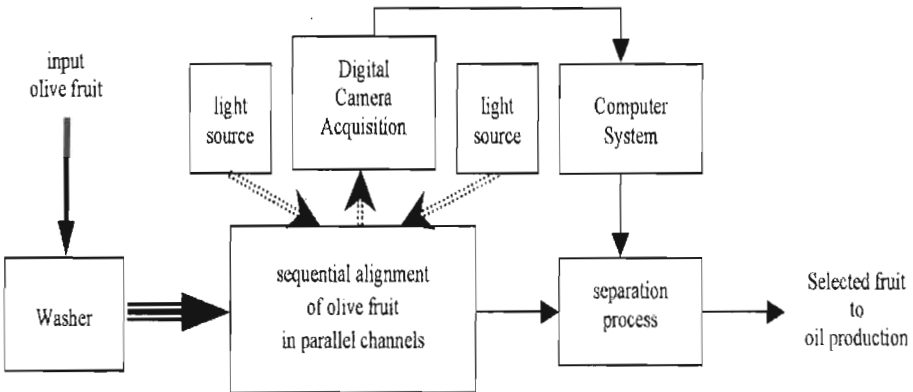


Figure 3. Schematic diagram of the optical inspection system

Based on these images, the software carries an inspection of the specific fruit and its assessment, and takes a decision on whether to discard or accept according to the given specifications. Thus, the damaged or unsuitable olives may be excluded from participating in the next stage of the olive production process, which is the crushing (Figure 4) following by mixing in a malaxator.



Figure 4. Oil stone for crushing olive fruit

By modeling the image characteristics of healthy and defective olives, a hybrid detection method, a feature extraction and a classification method are combined to give an efficient solution for the quality assurance of the olives based on the visual inspection of their surface (Petushi *et al*, 2001; 2002).

More specifically, our approach is based on the manipulation of the raw input images into a database of image related feature vectors. Using this database, vector classification is carried out. The total process consists of the following stages (Figure 5).

- Stage 1: Pre-processing.
- Stage 2: Segmentation.
- Stage 3: Features extraction.
- Stage 4: Classification.
- Stage 5: Post-processing.

Initially, the image is pre-processed to reduce its complexity as follows.

- The olive image is partitioned in regions of interest based on their intensity variance.
- The Regions of Interest (ROIs) are enhanced (e.g. scaling).

Segmentation is applied to each ROI, so that each segment contains only one candidate error object. Next, feature extraction is used providing information about the candidate error segmented-objects by considering the following:

- Statistical features, such as, average gray level, standard deviation, intensity difference between candidate error pixels and the neighborhood surrounding pixels.
- Geometric features, such as, dimensions, area, orientation and position.
- Combined features, such as, risk factor, height/width ratio, area/bounding box ratio.

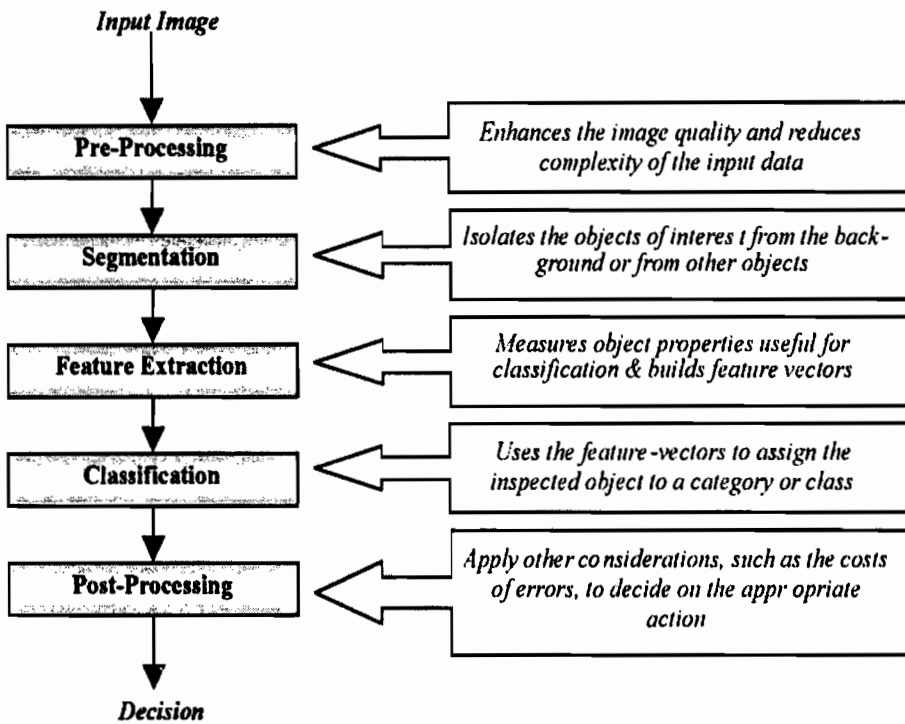


Figure 5. Processing stages of the optical inspection method

Finally, classification and interpretation (as post-processing) is applied in order to determine the system output based on the extracted features (e.g. passed or rejected olive fruit) using a binary tree classifier and considering the cost of errors.

The innovation of the proposed method focuses on the improvement of the pre-processing and segmentation stages in combination with the classification theory (Duda *et al.*, 2001). The feature extraction stage allows the connection of image processing methods with the statistical methods in order to produce an efficient solution to the problem.

Initially, the center olive is detected using thresholding of the original image and considering the effective view of the camera. Then, the image is cropped by keeping the center olive which is further processed. Next, the ROI partition approach is applied producing $n+1$ ROIs, that is, n spatial (e.g. defined pads) plus one corresponding to the remaining object. The break-down of the image into ROIs is achieved using template masks based on the construct/pattern of the inspected olive and intensity variations. The operator defines the number of ROIs in advance according to the typical patterns of the olive types (considering shape, size, color, etc.) and the olive defects in question. Each of these images undergoes a dynamic scaling process for contrast enhancement.

Following the pre-processing stage, the segmentation stage produces the binary candidate error images. The idea of combining the thresholding approach with a local morphological filtering method resulted in a quite effective hybrid algorithm (Petushi *et al.*, 2001; 2002). Each ROI is processed in parallel by the Otsu global thresholding method (Otsu, 1979) and a set of morphological gray-level local operators. In order to improve the detection results, an effective and computationally efficient local thresholding method was used based on two related morphological operators (Figure 6). The two resulting (output) images are input to a pixel-by-pixel logical OR function to produce the final binary candidate error images.

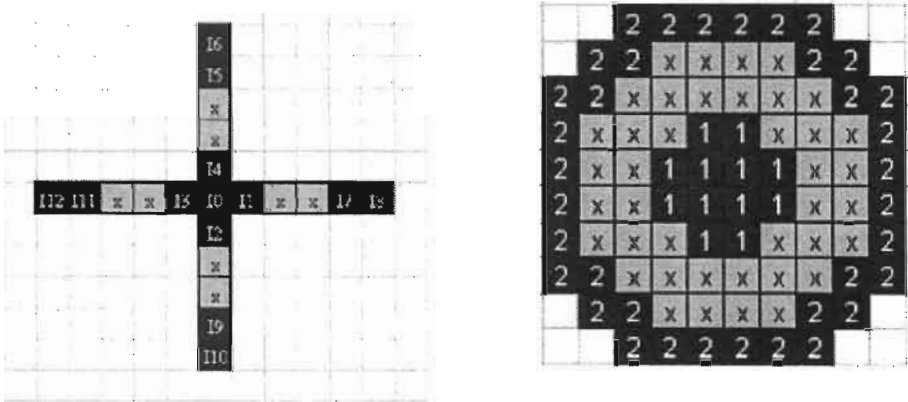


Figure 6. The morphological operators used for image segmentation

Then, the feature extraction follows, by using the *chain-code* extracted from the contours of the segmented objects, in order to label and take certain geometric and statistical measurements, thus creating in this way a representative feature vector for each candidate error. Also, in this stage, an operator pre-defined risk mask is used to assign a risk factor to each candidate error (van der Heijden, 1994). Since a feature data set is available for the inspection of the olive fruit, classification methods are considered in the decision making. Having a data set of 775 available feature vectors, our data set is split randomly in three parts: a training set (325 feature vectors), an evaluation set (155 feature vectors) and a testing set (295 feature vectors). Using these sets, we experiment with different known classification methods in order to find a method that fits best to the problem and the data set. Based on the time performance, overall error percentage and implementation and interpretation complexity, we concluded that a binary tree is the best method for the specific problem.

In Figure 7, three different cases of optical inspection and corresponding processing stages are depicted. Case (a) is a healthy olive and cases (b) and (c) correspond to damaged olives. The original images (i) are processed to produce the dominant contours over the entire object (ii). Then, the ROI is determined by considering the smoothed exterior contour (iii) by constraining (ii) according to a predetermined olive profile. Stages (ii) and (iii) combined with the proposed segmentation scheme produce the error image areas (iv). Based on these results the representative feature vectors are

determined. As expected, the optical inspection results in the three cases match the condition of the olive.

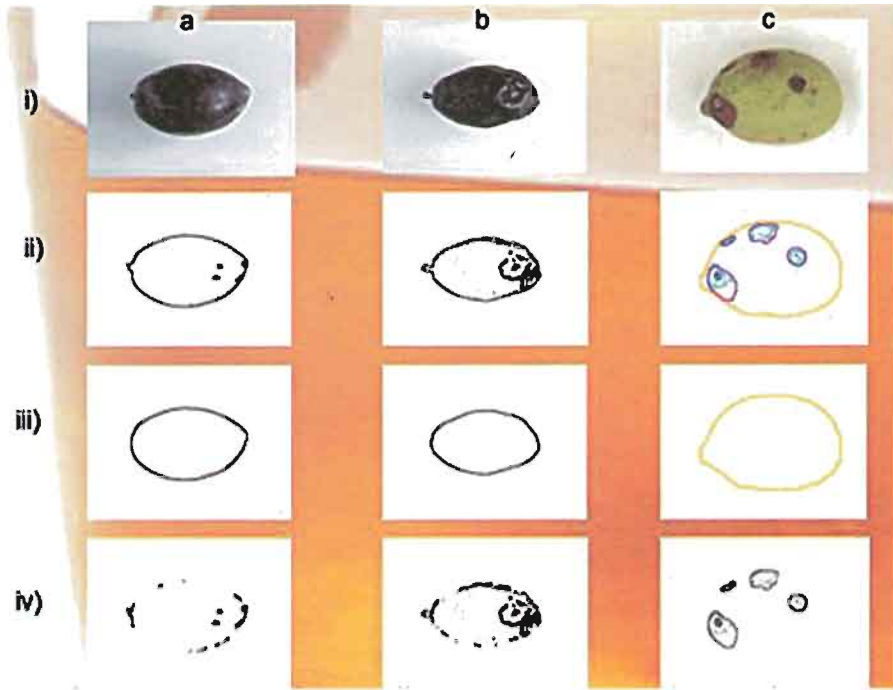


Figure 7. Optical inspection of three different cases: healthy (a) and defective olives (b,c). Original images (i), dominant contours (ii), smoothed exterior contour (iii), error image areas (iv)

Table I shows the time performance and overall error percentage of different pre-trained classification methods, during the testing on 295 new feature vectors. When compared to other methods, the binary tree shows the best overall performance. The time performance has of course relative value since it depends on the computing system and software used. Clearly, the overall misclassification for the above testing set is quite promising considering the relative simplicity of the approach. It is also noted that, by increasing the size of the vectors for a more detailed analysis we expect to achieve significantly lower detection and classification errors.

Table 1. Time performance (sec) and overall error (%) when testing the available 295 feature vectors

Classification Method	Time (sec)	Overall Error (%)
Gaussian Linear Discriminant	0.17	18.5
Gaussian Mixture	0.28	19.3
Nearest Cluster	0.15	23.8
K-Nearest Neighbour (KNN)	0.91	5.4
Condensed KNN	0.23	4.2
Binary Tree	0.15	2.7

3. CONCLUSIONS

A novel optical olive fruit inspection method was presented to be part of an improved system for automated quality selection of the harvested olive fruit. We adopted hybrid image processing and classification techniques using modeling of the olive and possible defections characteristics. Preliminary results in applying the method to the detection and characterization of *Bactrocera oleae* infected olives are quite promising. They demonstrate a good level of accuracy in identifying specific optical defects on the surface of the olive fruit and detection of possible candidate errors is relatively ensured. With appropriate tuning of the thresholding parameters the method may be applied with selectable accuracy. The method is currently being applied in an experimental olive production unit and is easily implementable as a hardware module to be used in an industrial environment. Future work is directed towards determining the relative importance of the various features for more accurate classification boundaries for different types of olives and defects in order to improve and expand the current knowledge-based decision making process.

4. ACKNOWLEDGMENTS

This research is supported 25% from the Greek Ministry of Education and 75% from the European Union.

5. REFERENCES

- Duda R.O., Hart P.E. & Stork D.G. (2001) Pattern Classification. Second Edition.
 Kiritsakis A. (1998) Olive Oil, from the Tree to the Table. 2nd Ed. Food & Nutrition Press
 Newenschuander P. & Michelakis S. (1978) The infestation of *Dacus Oleae*, harvesting time and its influence on yield and quality of olive oil in Crete. *Aeit. Ang. Entom.* 86:420
 Otsu N. (1979) "A Threshold Selection Method from Gray-Level Histograms. *IEEE Trans. on Systems, Man and Cybernetics SMC* 9 (1): 62-66
 Pencue Fierro L. & Leon-Tellez J. (2004) Digital image analysis in the design and implementation of a visual inspection system for fruit grading. Grupo de Optica y Laser, Departamento de Fisica, Universidad del Cauca, Popayan, Colombia
 Petushi S.P., Efstratiadis S.N. & Wetzels R. (2001) Visual Inspection of Semiconductor Crystals. in *Proceedings of the 4th International Conference on Technology and Automation*, pp. 411-415, Thessaloniki, Greece, October 2002.
 Petushi S.P., Efstratiadis S.N. & Wetzels R. (2002) Visual Inspection of Semiconductor Crystals using A Hybrid Detection Method and A Binary Tree Classifier in *Proceedings of the 4th International Workshop on Systems, Signals and Image Processing*, pp. 305-311, Manchester, UK, November 2002.
 van der Heijden F. (1994) Image Based Measurement Systems.

Optical inspection for quality separation of olive fruit

An optical inspection method for the automated quality selection of the harvested olive fruit is proposed. It is designed to improve the quality of the produced table olives and virgin olive oil in an olive production unit. The method is an additional stage in the existing processing procedure in order to introduce objective quality standards for rejecting bad or unsuitable olives. Specifically, the method will accomplish an effective separation of healthy and defective olive fruit and also any foreign materials, based on digital image processing of the olive fruit. The modeling of the olive defection caused by insects and fungi is used to classify the olives based on predetermined features, such as, statistical or geometric features during the image processing stage. The preliminary results on the application of the proposed method to various types of defected and healthy olive fruit are presented.

Élaboration des olives vertes de table. Contrôle de la fermentation et amélioration du rendement

Abdeslam ASEHRAOU ^{1*}, Dulce BRITO ², Mohamed FAID ³,
Manuella OLIVEIRA ² & Cidalia PERES ²

¹ Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université Mohamed I^{er}, BP: 524, Oujda, Maroc

² Instituto Nacional de Investigação Agrária e das Pescas (INIAP), Apt. 127, 2780 Oeiras, Portugal. E-mail: cperes@itqb.unl.pt

³ Département de Microbiologie Alimentaire et Biotechnologie, Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, BP 6202, Madinate Al Irfane, 10101 Rabat, Maroc

* Auteur correspondant, e-mail: asehraou@sciences.univ-oujda.ac.ma

1. INTRODUCTION

La fermentation lactique naturelle des olives est un processus très lent. Elle aboutit généralement à de grandes pertes à cause d'altérations, dont les principales sont les ramollissements, les fermentations mal-odorantes et les détériorations gazeuses dites «poches de gaz» (Fernandez-Diez *et al.*, 1985). Un bon contrôle du pH et du taux de sel, qui sont les pratiques les plus largement utilisées dans l'industrie des olives de table, permettent de réduire l'incidence des ramollissements et des fermentations mal-odorantes. Cependant, les «poches de gaz» échappent à ce contrôle.

L'altération dite «poches de gaz» se manifeste par des poches ou des fissures dans la pulpe des fruits. Elle peut être causée par tous les micro-organismes producteurs de gaz à savoir les bactéries à Gram négatif, les levures fermentaires et les bactéries lactiques hétérofermentaires (Fernandez-Diez *et al.* 1985). Dans le cas d'une bonne fermentation, accompagnée d'une grande acidification du milieu, les bactéries à Gram négatif et les bactéries lactiques hétérofermentaires ne tolérant pas les fortes acidités sont éliminées durant les deux premières semaines de fermentation. Seules les levures et les bactéries lactiques, tolérant les fortes acidités, restent en interaction jusqu'à la fin de la fermentation. Les levures, qui échappent à ce contrôle de pH et de salinité largement pratiqué dans l'industrie de conservation des olives, sont responsables de l'attaque des olives par les poches de gaz (Asehrou *et al.*, 2000).

Le contrôle de la fermentation par l'utilisation de levains composés de *Lactobacillus plantarum* a permis d'améliorer considérablement la vitesse du processus de fermentation, sans affecter le niveau de la population de levures dans le milieu (Etechells *et al.*, 1966, Montano *et al.*, 1993, Asehrou *et al.*, 1993). L'utilisation d'antifongiques, en particulier les sorbates, a montré une grande efficacité dans la réduction de cette population de levures (Marsilio & Cichelli, 1992).

L'objectif de ce travail est la mise au point d'un procédé de fermentation contrôlée des olives qui permet la production rapide des olives, la réduction du taux d'altération (détériorations gazeuses) et la réduction des rejets de sel dans l'environnement, sans nécessiter de traitement thermique (pasteurisation) des olives.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. Préparation des olives

Des olives vertes de la variété Picholine marocaine ont été désamérisées à 2% de NaOH pendant 7 heures, jusqu'aux 2/3. Les olives ont ensuite subi deux lavages successifs de trois heures et 12 heures, et saumurés à 5% de NaCl à raison de 600 g d'olives dans 500 ml de saumure.

Les levains ont été préparés à partir d'une souche I159 de *L. plantarum*, qui a été isolée à partir des olives vertes en fermentation naturelle. La souche a été cultivée, deux fois successives, sur MRS bouillon contenant 5% de NaCl, avant de l'inoculer dans les olives. Ces dernières ont été traitées comme suit:

- Essai 1 (E1): Témoin (fermentation naturelle).
- Essai 2 (E2): acidifié à pH 4.
- Essai 3 (E2): acidifié à pH 4 et inoculé par *L. plantarum* (I 159).
- Essai 4 (E4): acidifié à pH 4 et inoculé par *L. plantarum* (I 159) et additionné de sorbate de potassium à 0,05% de saumure.

Les différents essais, répétés 2 fois, ont été incubés à 30°C. Les prélèvements ont été réalisés chaque semaine au niveau de la saumure pour subir les analyses physico-chimiques et microbiologiques.

2.2. Analyses physico-chimiques

Le pH a été mesuré à l'aide d'un pH-mètre type Orion Research. Les sucres réducteurs ont été dosés suivant la méthode de Park et Johnson (1949).

2.3. Analyses microbiologiques

Les dilutions décimales des prélèvements de saumure ont été réalisées dans l'eau physiologique stérile, avant d'ensemencer, en profondeur, les différents groupes microbiens dans leurs milieux de cultures correspondants. La flore mésophile aérobie totale (FMAT) a été dénombrée sur milieu Trypticase-Soja-Agar (TSA). Les coliformes ont été dénombrés sur le milieu Gélose au Désoxycholate. Les bactéries lactiques ont été dénombrées sur milieu De Man Rogosa et Sharpe (MRS) additionné de cycloheximide (à 0,02%). Les levures et les moisissures ont été dénombrées sur milieu Potato-Dextrose-Agar (PDA) acidifié à pH 3,5 par l'acide lactique. Les boîtes ensemencées ont été incubées à 30°C pendant 2 jours pour les coliformes et pendant 3 à 4 jours pour les autres groupes microbiens.

2.4. Évaluation du taux d'altération

Après fermentation, tous les fruits de chaque essai ont été triés pour évaluer les taux d'altération dans les olives. La principale altération apparue dans les fruits est celle dite «poches de gaz». Les piqûres lactiques sont présentes, mais à un faible niveau, d'autant plus qu'elles n'affectent pas beaucoup la qualité des olives.

3. RÉSULTATS ET DISCUSSION

L'évolution du pH des différents essais est reportée sur la figure 1. Le pH de l'essai témoin (E1), dont la saumure n'a pas été acidifiée, a montré une chute rapide de 6,61 jusqu'à 4,25 à la fin de la fermentation (42^{ème} jour). Alors que pour les autres essais (E2, E3 et E4), qui ont été acidifiés à pH 4, les pH ont montré une légère neutralisation au début (durant les 7 premiers jours) de la fermentation jusqu'à pH 5,29-5,42, pour diminuer ensuite et tendent à se stabiliser aux environs de pH 5. Ces niveaux de pH obtenus, témoignant du bon déroulement du processus de fermentation, sont voisins de ceux qui sont trouvés avec la variété Manzanilla en fermentation contrôlée par *L. plantarum* (Montano *et al.* 1993). La neutralisation des saumures acidifiées obtenue au départ peut être due au reste de soude dans les olives.

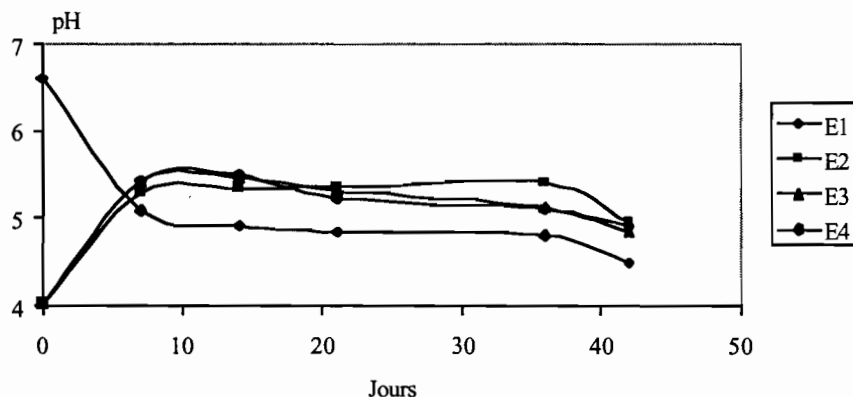


Figure 1. Évolution du pH au cours de la fermentation contrôlée des olives vertes (E1: témoin, E2: pH 4, E3: pH 4 + *L. plantarum* et E4: *L. plantarum* + sorbate)

Les sucres réducteurs ont montré, au début de la fermentation, une augmentation progressive dans les saumures des 4 essais. Ils ont chuté remarquablement à la suite de leur dégradation par les micro-organismes (Figure 2). La comparaison des 4 essais montre que les faibles teneurs en sucres rencontrées au niveau de l'essai témoin (E1) peuvent être dues à leur dégradation intense par les micro-organismes. Ces derniers n'ont pas été stressés par l'acidification dans cet essai.

Au niveau des essais E1, E2 et E3, les coliformes fluctuent entre 10^3 et 10^4 ufc/ml durant toute la durée de la fermentation (Figure 3).

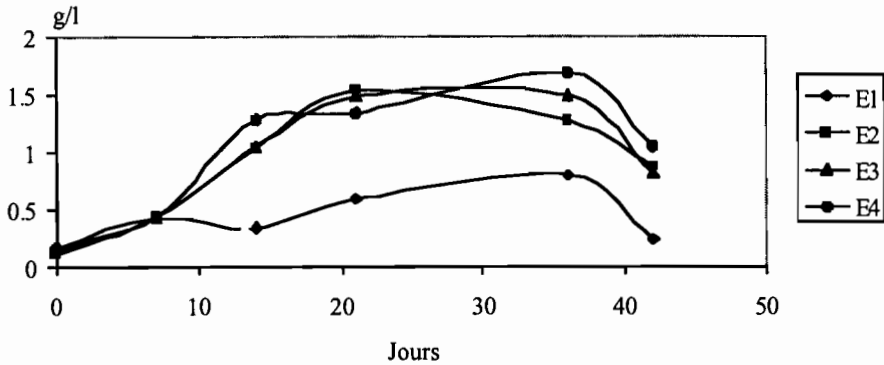


Figure 2. Variations des sucres au cours de la fermentation contrôlée des olives vertes (E1: témoin, E2: pH 4, E3: pH 4 + *L. plantarum* et E4: *L. plantarum* + sorbate)

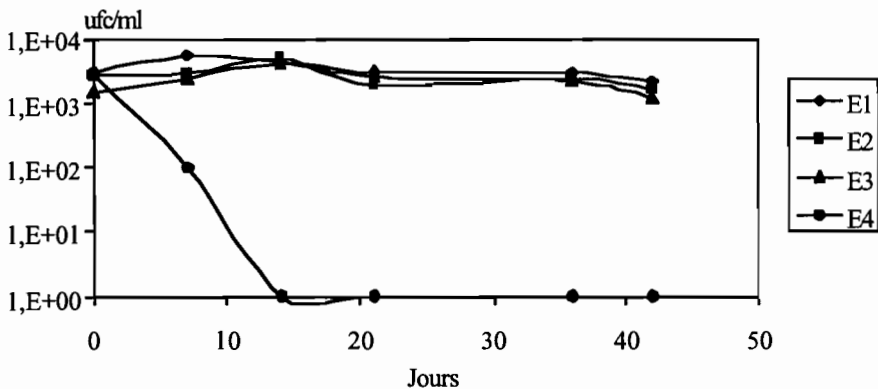


Figure 3. Variations des coliformes au cours de la fermentation contrôlée des olives vertes (E1: témoin, E2: pH 4, E3: pH 4 + *L. plantarum* and E4: *L. plantarum* + sorbate)

Par contre, au niveau de l'essai E4, on assiste à une diminution remarquable de ces bactéries pour disparaître au bout de la 3^{ème} semaine. Cette chute pourrait être due, en partie, au sorbate, connu pour son effet inhibiteur sur des bactéries à Gram négatif, surtout en association avec les levains lactiques (Kim & Hearnberger, 1994).

Au niveau des essais ensemencés par *L. plantarum* (I159) (E3 et E4), on constate une diminution de la population lactique à cause du stress. Après, on remarque une augmentation pouvant atteindre environ 10^6 ufc/ml (Figure 4). La comparaison des deux essais (E3 et E4) montre que la concentration du sorbate de potassium utilisée semble ne pas avoir d'effet inhibiteur sur *L. plantarum* (I159). Cependant, la faible croissance de la population lactique obtenue peut être due aux conditions acides du milieu. En fait, les bactéries lactiques ne sont pas acidophiles, mais elles supportent les fortes acidités.

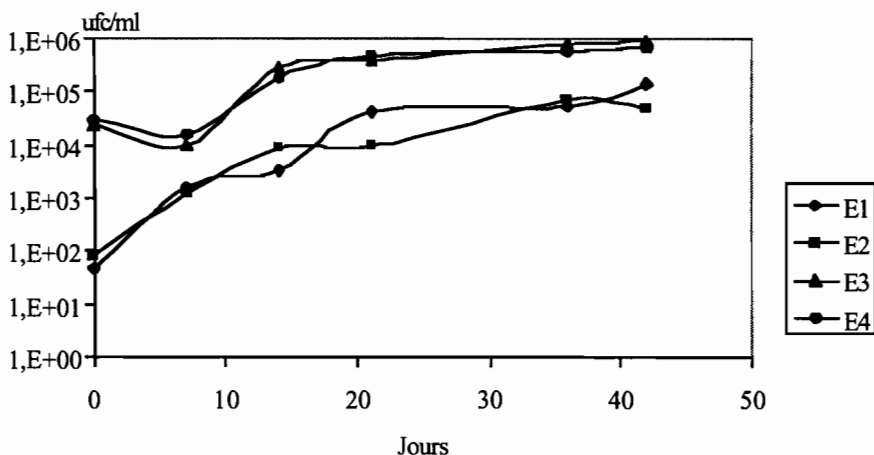


Figure 4. Variations des bactéries lactiques au cours de la fermentation contrôlée des olives vertes (E1: témoin, E2: pH 4, E3: pH 4 + *L. plantarum* et E4: *L. plantarum* + sorbate)

Au niveau des essais E1, E2 et E3, la population de levures et de moisissures a montré une augmentation d'environ 10^3 ufc/ml jusqu'aux environs de 10^6-10^7 ufc/ml (Figure 5), alors qu'au niveau de l'essai (E4), contenant du sorbate, les levures et les moisissures ont chuté de 3.10^3 ufc/ml pour disparaître au bout de 36 jours de fermentation.

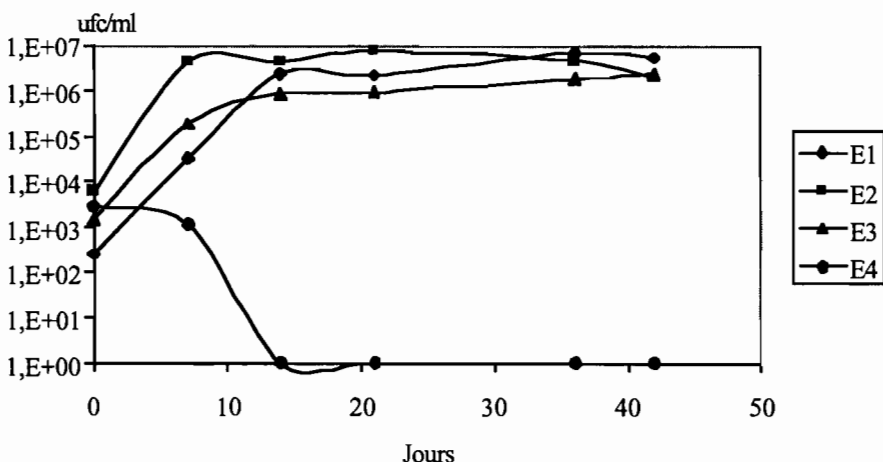


Figure 5. Variations des levures et des moisissures au cours de la fermentation contrôlée des olives vertes (E1: Témoin, E2: pH 4, E3: pH 4 + *L. plantarum* et E4: *L. plantarum* + sorbate)

Après 42 jours de fermentation les deux principales altérations rencontrées dans les olives sont les «poches de gaz» et les «piqûres lactiques» (Tableau 1). Cette dernière altération, qui se manifeste par des points blancs dus aux colonies de bactéries lactiques qui se développent dans les stomates des fruits, est faiblement présente dans les fruits, d'autant plus qu'elle n'affecte pas beaucoup la qualité des olives.

Tableau 1. Évaluation du taux d'altération dans les olives fermentées (E1: témoin, E2: pH4, E3: pH 4 + *L. plantarum* I159, E4: pH 4 + *L. plantarum* I159 + sorbate de potassium à 0,05% de saumure)

Essai	«Poches de gaz» (%)	«Piqûres lactiques» (%)
E1	65,17	11,2
E2	22,8	8,4
E3	15,88	16,8
E4	3,68	17,1

Cependant, l'altération dite «poches de gaz» est beaucoup plus dominante. En plus, elle affecte énormément la texture du fruit. En effet, l'essai témoin (E1) ayant subi la fermentation naturelle a montré le taux le plus élevé, qui est de l'ordre de 65,17%. Ce taux pourrait être dû aux gaz produits par les coliformes, les bactéries lactiques hétérofermentaires et les levures fermentaires. Au niveau de l'essai E2 où l'importance des coliformes a été réduite par acidification à pH 4, le taux des poches de gaz est fortement réduit jusqu'à 22,8%. Quand l'acidification est renforcée par l'inoculation par *L. plantarum* (E3), ce taux des poches de gaz est réduit légèrement jusqu'à 15,88%. Le renforcement de ces deux paramètres (acidification et inoculation) par l'ajout du sorbate (E4) réduit considérablement le taux des poches de gaz à 3,68%. Ce taux pourrait être dû aux levures fermentaires et aux coliformes avant leur inhibition, ainsi qu'aux bactéries lactiques hétérofermentaires. Comme il peut être dû au métabolisme du fruit lui-même (Duran Quintana *et al.* 1979).

L'acidification inhibant les coliformes et certaines bactéries lactiques hétérofermentaires a permis de réduire considérablement le taux des «poches de gaz» dans les olives. Les bactéries lactiques, inhibant en partie la fermentation alcoolique des levures (Leroi & Pidoux, 1993), permettent de réduire davantage le taux des «poches de gaz» dans les olives. L'addition du sorbate de potassium renforce l'effet des deux premiers facteurs. Elle permet d'inhiber les levures fermentaires qui tolèrent les fortes salinités et les faibles pH.

Ainsi, ce procédé de fermentation contrôlée des olives par acidification à pH 4, inoculation par *L. plantarum* I159 et addition du sorbate de potassium (0,05%), permettant une fermentation rapide des olives avec une réduction importante du taux d'altération dans les fruits, présente des avantages pour:

- L'industriel, par la réduction de la durée du processus et le taux des déchets dus aux altérations.
- Le consommateur, par la réduction du taux de sel dans les olives.
- L'environnement, par la réduction des déchets rejetés dans la nature.

4. RÉFÉRENCES CITÉES

- Asehraou A., Faid M. & Akhartouf R. (1993) Pure culture fermentation of green olives by lactobacilli strains. *Microbiologie Aliments Nutrition* 11: 221-228.
- Asehraou A., Peres C., Brito D., Faid M. & Serhrouchni M. (2000) Characterization of yeast strains isolated from bloaters of fermented green table olives during storage. *Grasas y Aceites* 51(4): 225-229.
- Duran Quintana M.C., Gonzalez Cancho F. & Garrido Fernandez A. (1979) Aceitunas negras al natural en salmuera. IX. Ensayos de producción de «alabrado» por inoculación de diversos microorganismos aislados de salmuera de fermentación. *Grasas y Aceites* 30(6): 361-367.
- Etchells J.L., Borg A.F., Kittel I.D., Bell T.A. & Fleming H.P. (1966) Pure culture fermentation of green olives. *Appl. Microbiol.* 14 (6): 1027-1041.
- Fernandez Diez M.J., Castro Ramos R., Garrido Fernandez A., Heredia Moreno A., Minguéz Mosquera M.I., Rejano Navarro L., Duran Quintana M.C., Gonzalez Cancho F. Castro Gomez Millan A., Garcia Garcia P. & Sanchez Oldan F. (1985) Biotecnología de la aceituna de mesa. Ed Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, 475 p.
- Kim C.R. & Hearnberger J.O. (1994) Gram negative bacteria inhibition by lactic acid culture and food preservatives on catfish fillets during refrigerated storage. *J. Food Sci.* 59(3): 513-516.
- Leroi F. & Pidoux M. (1993) Characterization of interactions between *Lactobacillus hilgardii* and *Saccharomyces florentinus* isolated from sugary kefir grains. *J. Appl. Bacteriol.* 74: 54-60.
- Marsilio V. & Cichelli A. (1992) Influencia del sorbato potásico y del benzoato sódico sobre la estabilidad de las aceituna de mesa en salmuera. *Grasas y aceites* 43(2): 66-74.
- Montano A., Sanchez Gomez A.H. & Castro Gomez Millan A. (1993) Controlled fermentation of Spanish-type green olives. *J. Food Sci.* 58(4): 842-852.
- Park J.T. & Johnson M.S. (1949) A submicrodetermination of glucose. *J. Biol. Chem.* 181: 149-151.

Élaboration des olives vertes de table. Contrôle de la fermentation et amélioration du rendement

Des olives vertes de la variété Picholine marocaine ont été désamérisées, lavées et saumurées à 5% de NaCl. Leur fermentation par ajustement du pH à 4, inoculation par *L. plantarum* (I159) et addition du sorbate de potassium (0,05% de saumure) a permis de réduire considérablement la durée de la fermentation et le taux d'altération, surtout les détériorations gazeuses, dans les olives, sans affecter les caractéristiques organoleptiques du produit fini.

Moroccan green olives. Controlled fermentation and improvement of the yield

Some Moroccan green olives were alkali-treated and brined at 5% NaCl. The controlled fermentation was carried out by pH adjustment to 4 units, *L. plantarum* (I159) inoculation and potassium sorbate addition (0.05% brine). The results showed a quick development of the lactic fermentation process with a high reduction of level of the «bloater spoilage» in the olive, without affecting the organoleptic characteristics of the final product.

Caractérisation et prétraitement des margines par la chaux

Fadila BOUKHOUBZA ¹, Asmaa JAIL ², Lahcen HASSANI ² &
Ahmed NEJMEDDINE ¹

¹ Laboratoire d'Écotoxicologie, Département de Biologie, Faculté des Sciences Semlalia, Université Cadi Ayyad, BP. 2390, Marrakech, Maroc

² Laboratoire de Microbiologie, Département de Biologie, Faculté des Sciences Semlalia, Université Cadi Ayyad, BP. 2390, Marrakech, Maroc

Auteur correspondant ¹, courriel: Nejmeddine@ucam.ac.ma

Auteur correspondant ², courriel: F.boukhoubza@ucam.ac.ma

1. INTRODUCTION

L'olivier constitue la principale espèce fruitière plantée au Maroc, soit plus de 57% de la superficie arboricole totale. Pour l'année 2003-2004, jugée comme exceptionnelle, le ministère de l'Agriculture a estimé la production d'olives à 1 million de tonnes et celle d'huile d'olives à 100 000 tonnes.

La trituration des olives produites se fait principalement dans des unités traditionnelles dont le nombre dépasse actuellement les 16 000 unités. Le reste est traité dans des unités modernes et semi-modernes qui sont au nombre de 287 selon les dernières données du ministère de l'Eau et de l'Environnement (2003). L'ensemble de ces unités rejette un effluent liquide connu sous le nom de margines. La production annuelle moyenne de ces effluents, estimée à partir de la production d'olives, est de 246 000 m³ (d'après le secrétariat d'État de l'Eau et de l'Environnement, 2003). Ces effluents sont riches en matières organiques (80 à 200 g/l de DCO) (Balice & Cera, 1984) et, en particulier, en polyphénols qui les rendent phytotoxiques et antibactériens (Wang *et al.*, 1967; Paredes *et al.*, 1986; Saez *et al.*, 1992; Ben Sassi *et al.*, 2006).

La région de Marrakech (Tensift - Haouz) est bien connue par ses vastes oliveraies. La quantité d'olives produite, estimée à 61 000 tonnes, est destinée, en grande partie, à l'extraction de l'huile d'olive. Les margines résultantes sont souvent rejetées anarchiquement dans les rivières, épandues sur les sols agricoles (Sierra *et al.*, 2001; Zenjari & Nejmeddine, 2001), évacuées dans le réseau d'assainissement ou stockées dans des cuvettes exposant ainsi les systèmes eau - sol - plante à une pollution inéluctable. Par conséquent, la pollution causée par le rejet de ces effluents complique davantage l'état environnemental des milieux récepteurs, d'où la nécessité de traiter ces effluents afin d'atténuer leur pouvoir polluant.

L'objectif du présent travail est d'évaluer la pollution générée par ce type d'effluents en comparant la qualité physico-chimique des margines issues de quatre unités de trituration d'olives dans les régions de Marrakech, de présenter un essai de prétraitement de ces margines et de démontrer son effet sur leur composition physico-chimique.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les échantillons de margines étudiées ont été prélevés dans quatre huileries localisées dans la ville de Marrakech et ses régions:

- H₁ et H₂: deux huileries semi-modernes.
- H₃ et H₄: deux huileries modernes.

La qualité physico-chimique des margines avant et après traitement a été déterminée selon des protocoles expérimentaux normalisés (Tableau 1).

Tableau 1. Protocoles expérimentaux utilisés pour la caractérisation physico-chimique des margines issues des huileries H₁, H₂, H₃ et H₄

Paramètres	Méthodes
pH	Norme AFNOR NF T 90-008
Conductivité électrique (CE)	Norme AFNOR NF T 90-031
Chlorures (Cl ⁻)	AFNOR (T90- 014)
Demande Chimique en Oxygène (DCO)	AFNOR (T90-101)
Carbone Organique (CO)	Méthode de ANNE (Aubert, 1978)
Orthophosphates (PO ₄ ³⁻)	AFNOR (T90-023)
Azote Kjeldal (NTK)	AFNOR (T90-110)
Calcium (Ca ²⁺), sodium (Na ⁺), potassium (K ⁺)	Spectrophotométrie d'émission en flamme (type PFP7).
Phénols totaux	Macheix <i>et al.</i> (1990)

Le test de prétraitement des margines a été réalisé selon le protocole décrit par Esra *et al.* (2001) avec une modification qui consiste en une dilution des margines avant l'addition de Ca(OH)₂ à 2%. Le mélange subit par la suite une agitation pendant 12 h.

3. RÉSULTATS ET DISCUSSION

3.1. Qualité physico-chimique des différentes margines étudiées

Le tableau 2 regroupe les teneurs en éléments physico-chimiques retrouvées dans les margines des quatre huileries étudiées.

Les margines des huileries semi-modernes H₁ et H₂ sont plus chargées en matières organiques (exprimées en terme de DCO) par rapport à celles qui sont issues des huileries fonctionnant avec des centrifugeuses. Leur degré de minéralisation exprimé en conductivité électrique est également très élevé. Il s'élève à 87,3 mS.cm⁻¹ dans les margines de l'unité H₂. Cela s'explique par les grandes quantités de sel (NaCl) qu'on ajoute pour conserver les olives pendant la durée de leur stockage.

La teneur en composés phénoliques des margines est de l'ordre de 10,3 g.l⁻¹ dans l'huilerie H₁ et de l'ordre de 12,5 g.l⁻¹ dans H₂. Cependant, les margines produites par les huileries modernes H₃ et H₄ contiennent des teneurs moins élevées (2,75 g.l⁻¹ et

1,95 g.l⁻¹). Cela est dû au fait qu'au cours de la trituration, les unités traditionnelles et semi-modernes utilisent moins d'eau, ce qui concentre le maximum des composés phénoliques provenant de la pulpe des olives.

Les margines issues des unités H₃ et H₄ sont moins chargées en polluants organiques et minéraux. Ces unités étant modernes consomment généralement d'énormes volumes d'eau afin de faciliter le fonctionnement des machines de trituration. Par conséquent, cette eau ajoutée dilue de façon notable les margines rejetées par la suite.

Tableau 2. Caractérisation physico-chimique des margines issues des huileries H₁, H₂, H₃ et H₄

Paramètres	H ₁	H ₂	H ₃	H ₄
CE (mS.cm ⁻¹)	25,7	87,3	11	9,3
pH	4,68	4,77	5,07	5,01
MES (g.l ⁻¹)	13,89	15,7	2,94	7,13
DCO (g d'O ₂ .l ⁻¹)	252,5	225	135	115
CO (%)	55,35	42,03	32,8	23,58
PO ₄ ³⁻ (mg.l ⁻¹)	359	181	45,98	32,3
NTK (g.l ⁻¹)	2,24	2,52	1,82	1,96
Ca ²⁺ (g.l ⁻¹)	0,69	13,48	1,18	0,87
K ⁺ (g.l ⁻¹)	7,36	10,28	3,55	3,68
Na ⁺ (g.l ⁻¹)	5,58	6,67	5,9	0,2
Cl ⁻ (g.l ⁻¹)	106,5	142	88,75	92,3
Phénols totaux (g.l ⁻¹)	10,3	12,5	2,75	1,95

3.2. Prétraitement des margines par la chaux

Les figures 1, 2, 3 et 4 présentent l'évolution des différents paramètres physico-chimiques étudiés dans les margines des quatre huileries avant et après traitement par la chaux.

La différence du pH, notée entre les margines brutes et traitées, est due principalement à l'effet basique de la chaux lors du prétraitement. En effet, après l'ajout de la chaux une augmentation significative est enregistrée, dépassant généralement 8. On observe également des abattements en matières organiques et minérales dépassant les 50%. Dans les margines de l'unité industrielle H₁, les composés phénoliques ont été réduits de 90% suite au traitement à la chaux concentrée à 2%.

En fait, la chaux est un fort coagulant qui favorise également le phénomène de précipitation des composés organiques, minéraux et phénoliques présents dans les margines. Ainsi, les principaux facteurs responsables de la réduction de la charge polluante des margines sont dus à la dilution de ces dernières à 50% par l'ajout de chaux (20 g.l⁻¹).

4. CONCLUSION

À l'issue du présent travail relatif à l'étude qualitative des margines et à l'effet de la chaux sur leur composition physico-chimique, on peut noter que:

- Les margines sont des effluents, à pH acide, fortement concentrés en matières organiques, en éléments minéraux et en polyphénols.
- Les margines des huileries semi-modernes sont les plus polluantes bien que leur volume demeure toujours plus faible que celui qui est rejeté par les unités modernes. Les effluents de ces dernières sont relativement dilués par rapport aux précédents. Cependant, ils gardent un pouvoir polluant très important qui risque de se répandre partout dans les milieux environnants.
- L'analyse des margines traitées par la chaux montre que ce prétraitement réduit de manière notable tous leurs paramètres de pollution existants.

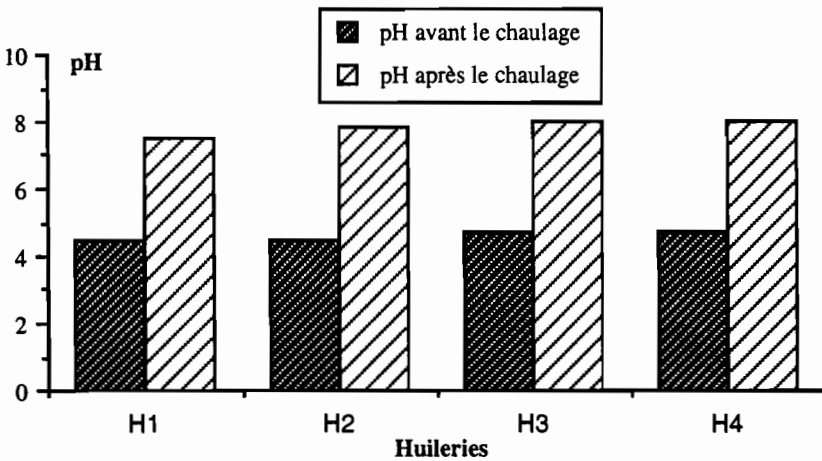


Figure 1. Évolution du pH avant et après chaulage des margines de quatre huileries

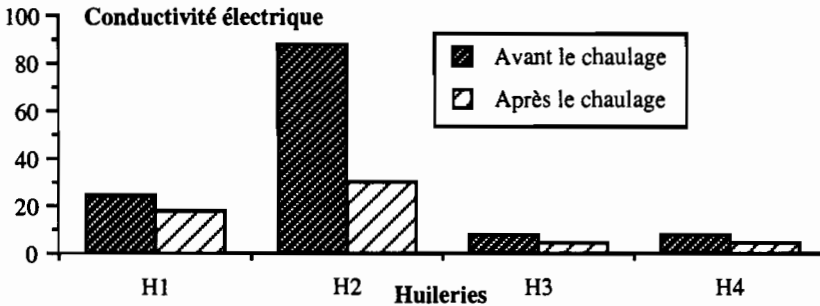


Figure 2. Évolution de la conductivité électrique (mS/cm) avant et après chaulage des margines de quatre huileries

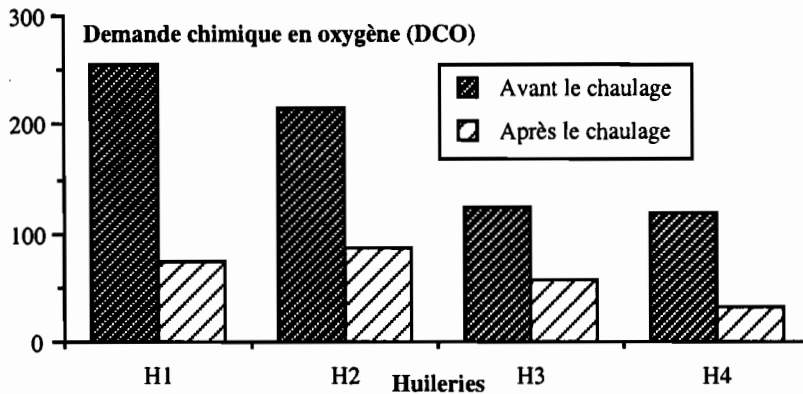


Figure 3. Évolution de la demande chimique en oxygène (g O₂/l) avant et après chaulage des margines de quatre huileries

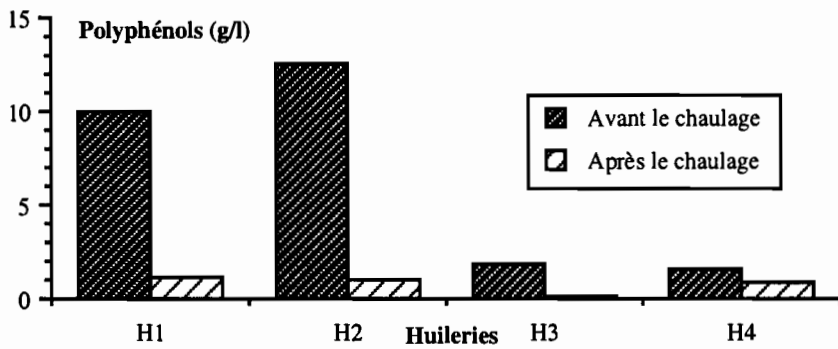


Figure 4. Évolution de la teneur en polyphénols avant et après chaulage des margines de quatre huileries

En perspective, on envisage un traitement complémentaire des margines ayant subi le chaulage afin de les rendre valorisables et de pouvoir les recycler.

5. RÉFÉRENCES CITÉES

AFNOR (1983) Association française de Normalisation.

Aubert G. (1978) Méthodes d'analyse des sols, C.R.D.P, Marseille

Balice V. & Cera O. (1984) Acidic phenolic fraction of the olive vegetation water determined by a gas chromatographic method. *Grasas Aceites* 35:178-180.

- Ben Sassi A., Baolarbah A., Jaouad, Walker G. & Boussaid A. (2006) A comparison of Olive oil Mill Wastewaters (OWM) from three different processes in Morocco. *Science direct, Process biochemistry* 41(1): 74-78.
- Esra S. Aktas, Sedat Imre & Lale Ersoy (2001) Characterization and lime treatment of olive mill wastewater. *Wat. Res.* 35 : 2336-2340.
- Macheix J.J., Fleuriet A. & Billot J. (1990) Fruit phenolics. CRC Press Inc, Boca Ralton Florida, 378 p.
- Paredes M.J., Monteoliva-Sanchez M., Moreno E., Perez J., Ramos-Cormenzana A. & Martinez J. (1986) Effect of wastewaters from olive oil extraction plants on the bacterial population of soil. *Chemosphere* 15: 655-659.
- Rapport d'activité (2003-2004) secrétariat d'État de l'Eau et de l'Environnement, Rabat, Maroc
- Saez L., Perez J. & Martinez J. (1992) Low molecular weight phenolic attenuation during simulated treatment of wastewaters from olive oil mills in evaporation ponds. *Water Res.* 26(9):1261-1266.
- Sierra J., Marti E., Montserrat G., Cruanas R. & Garau M.A. (2001) Characterisation and evolution of a soil affected by olive oil mill wastewater disposal. *Science of Total Envir.* 279: 207-214.
- Wang T.S.C., Yang T.K. & Chuang T.T. (1967) Soil phenolic acids as plant growth inhibitors. *Soil Sci.* 103(4): 239-246.
- Zenjari B. & Nejmeddine A. (2001) Impact of spreading olive mill wastewater on soil characteristics: laboratory experiments. *Agronomie* 21: 749-755.

Caractérisation et prétraitement des margines par la chaux

Au Maroc, la trituration des olives se fait principalement dans des unités semi-modernes et traditionnelles (80%), éparpillées en milieu rural. Le reste est traité dans des unités modernes bien équipées. L'ensemble de ces unités produit un déchet liquide connu sous le nom de margines. D'après l'Association Marocaine pour la Protection de l'Environnement (1999), le volume de ces effluents peut atteindre jusqu'à 640 000 m³ par an. Étant riches en matières organiques et en polyphénols, la toxicité de ces margines rend la possibilité de leur élimination de plus en plus difficile face aux exigences environnementales. Ainsi, leur traitement avant rejet devient une nécessité impérative pour diminuer l'intensité de la pollution qui peut se diffuser à la suite de leur rejet dans la nature. L'objectif de ce travail est, d'une part, de présenter l'ampleur de la pollution causée par ces effluents tout en comparant les qualités des margines issues de deux types d'huileries dans la ville de Marrakech et ses régions (huileries semi-modernes et modernes) et, d'autre part, de présenter un essai de prétraitement des margines issues de ces unités et de démontrer son effet sur leur composition physico-chimique. Le prétraitement consiste à ajouter du Ca(OH)₂ à 20 g/l aux margines diluées auparavant à 50%. Le mélange subit par la suite une agitation pendant 12 h. L'analyse des éléments physico-chimiques des margines traitées ont montré dans les quatre huileries, une réduction notable de la matière organique et minérale qui dépasse généralement les 50%. Les composés phénoliques de l'huilerie H₁ ont été réduits de 90%.

Mots-clés: Huileries - Margines - Prétraitement - Chaux et précipitation

Traçabilité et labellisation des produits de terroirs. Cas des huiles d'olives

My Mustapha ISMAILI-ALAOUI¹, Najib AKESBI¹,
Sevastianos ROUSSOS³ & Ali HEDDOUN²

¹ IAV Hassan II BP 6202, Rabat, Maroc

² SACMI quartier Industriel Mohamadia, Maroc

³ IRD Marseille, France

Auteur correspondant, courriel: m.ismaili@iav.ac.ma

1. INTRODUCTION

La traçabilité et la labellisation des produits des terroirs du monde rural passe par le transfert des innovations technologiques et biotechnologiques auprès des petits agriculteurs. Ces derniers possèdent un savoir-faire adapté aux réalités socio-économiques de leurs terroirs. Pour plusieurs producteurs, la traçabilité est devenue un concept clé pour le développement et l'intégration des productions dans les circuits commerciaux spécialisés. En effet, la standardisation des moyens de production a conduit à une agriculture mondialisée agressive. Ainsi, les productions labellisées, utilisant l'agriculture Bio avec une traçabilité, constituent une alternative valable pour le retour au label du naturel. La renommée des produits de l'olivier, aux vertus nutritionnelles et aux propriétés physico-chimiques confirmées, a franchi les frontières des terroirs classiques pour aller conquérir de nouveaux marchés (Ismaili Alaoui & Dogse, 2005; Ismaili Alaoui, 2006). Les terroirs traditionnels de l'olivier sont invités à installer des Appellations d'Origine Garanties (AOG) et Contrôlées (AOC) pour répondre aux nouvelles exigences de qualité des circuits commerciaux spécialisés. Les productions certifiées et labellisées, associées au savoir-faire, constituent une alternative valable pour le retour aux sources du label du naturel. L'ascension du commerce équitable devrait permettre aux petits agriculteurs des terroirs spécialisés d'intégrer les circuits commerciaux spécialisés (Dufлот, 1997).

Dans de nombreux cas, la traçabilité et la labellisation sont devenues une nécessité. En effet, même quand la réglementation impose uniquement l'identification du produit, le fabricant a la responsabilité de la conformité du produit mis à la disposition du consommateur (Figure 1) (Codex Alimentarius, 1999).

Dans le cas des productions oléicoles au niveau du milieu rural marocain, on peut parler de traçabilité concertée liée à la propriété ou à l'unité de transformation, mais sans détail sur la traçabilité au sens strict du terme avec tout ce que cela engendre comme avantage.

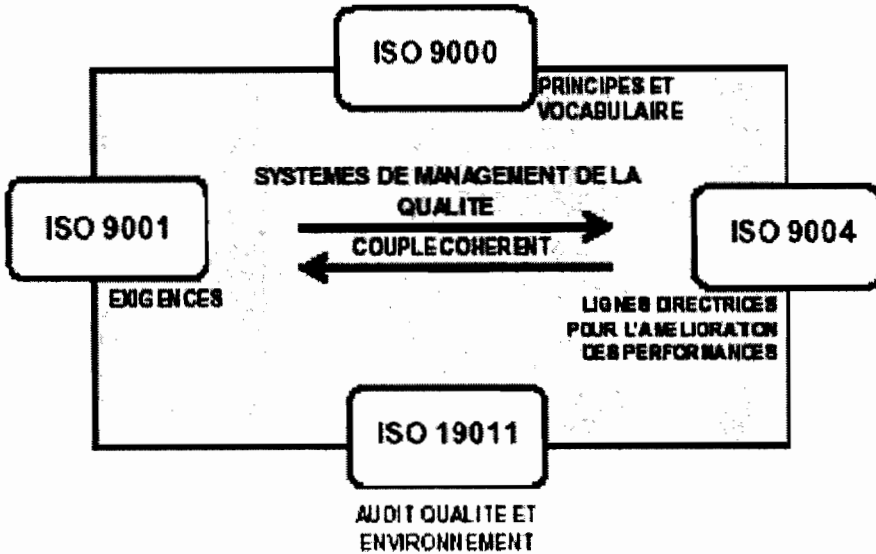


Figure 1. Famille des normes de certification ISO et méthodologie de la traçabilité globale ISO 9001:2000

2. IMPORTANCE DE LA FILIÈRE OLÉICOLE

Avec une superficie de l'ordre de 600.000 ha, l'olivier représente la principale espèce fruitière au Maroc. Elle représente plus de 50% des espèces fruitières cultivées. Ce patrimoine, qui a pratiquement quadruplé depuis ces quatre dernières décennies (128.000 ha en 1960/61 à 600 000 ha en 2004/05), est présent à travers l'ensemble du territoire national en raison de son adaptation à tous les étages bioclimatiques, allant des zones de montagnes aux zones arides et sahariennes. Il assure, de ce fait, des fonctions multiples de sécurité alimentaire, de lutte contre l'érosion, de valorisation des terres agricoles et de fixation des populations dans les zones marginales (MADRPM/DERD, 1998).

Le secteur oléicole marocain joue un rôle socio-économique important. Il procure environ 15 millions de journées de travail par an soit 60.000 emplois permanents, sans oublier toute l'activité industrielle qu'elle génère en aval, à savoir celle de quelques 16.000 moulins traditionnels (Maâsra) qui subsistent encore, de 302 unités de trituration industrielles et d'une cinquantaine de conserveries d'olive.

3. TRAÇABILITÉ ET LABELLISATION

3.1. Historique

Née dans le milieu des années 80, la traçabilité répondait alors à un simple souci logistique: elle garantissait un contrôle des flux de marchandises au sein d'une chaîne de partenaires. Avec le temps, de nouvelles technologies ont été instaurées et les systèmes de traçabilité et d'identification sont devenus plus précis et sophistiqués.

Aujourd'hui, en particulier après l'entrée en vigueur du règlement CE 178/2002 imposant l'instauration d'un système de traçabilité, celle-ci concerne tous les secteurs d'activités. Elle s'avère indispensable pour des raisons autres que purement logistiques: relation de confiance envers le consommateur, contraintes réglementaires et légales, normalisation, rappel de produits défectueux, ...

3.2. Avantage et intérêt de la mise en place d'un label d'origine et de traçabilité

Plusieurs sociétés, avant même que rien ne les y contraignait, ont pris le parti de se doter de systèmes complets de traçabilité. C'est dire l'importance, autant pour les intervenants de l'industrie que pour les gouvernements, de concevoir des systèmes de traçabilité simples, mais efficaces.

Dans un contexte mondial axé sur la sécurité alimentaire, mais aussi face à un consommateur qui devient de plus en plus exigeant, et face à un label du naturel, la traçabilité ne doit pas être conçue seulement comme un moyen de justification, mais comme un outil de gestion et de développement des économies de qualité.

Consommer un produit de terroir, c'est s'identifier à la culture de son producteur et s'y imprégner. C'est le cas des huiles d'olives du bassin Méditerranéen. La traçabilité est définie comme étant "la capacité à retracer, à travers toutes les étapes de la production, de la transformation et de la distribution, le cheminement des denrées alimentaires, des aliments pour animaux, des animaux producteurs de denrées alimentaires et de toute autre substance destinée à être incorporée dans des denrées alimentaires".

Le concept de traçabilité a donc acquis, ces derniers temps, une importance significative, principalement sur les marchés internationaux de produits agricoles. Le Maroc, fortement présent sur ces marchés comme pays exportateur, est tenu d'accélérer le processus d'implantation du système de traçabilité dans ses filières à vocation exportatrice pour répondre, principalement, à la réglementation de l'Union Européenne, notamment au niveau de la filière oléicole.

L'application des technologies mobiles associées au concept de la traçabilité devrait aider les oléiculteurs dans les milieux enclavés d'intégrer leurs productions dans les circuits commerciaux spécialisés avec des propriétés à la fois organoleptiques et de santé distinctives très spécifique (Figure 2).

La traçabilité et la certification dans ces milieux constituent, pour le consommateur d'aujourd'hui, une image de l'artisanat ou du naturel. Elles représentent des signes de fraîcheur pour les cultures spécifiques des terroirs. La certification est souvent établie pour confirmer l'engagement du producteur ou de l'entreprise dans une démarche qualité. Elle reste un outil indispensable, car c'est la preuve délivrée par un organisme tierce partie qu'une entreprise est en démarche qualité et utilise des méthodes de travail conformes à un référentiel (par exemple la norme ISO 9001). Le certificat fait savoir aux clients qu'ils peuvent avoir confiance: l'entreprise a mis en place une organisation capable de remplir ses devoirs envers eux.

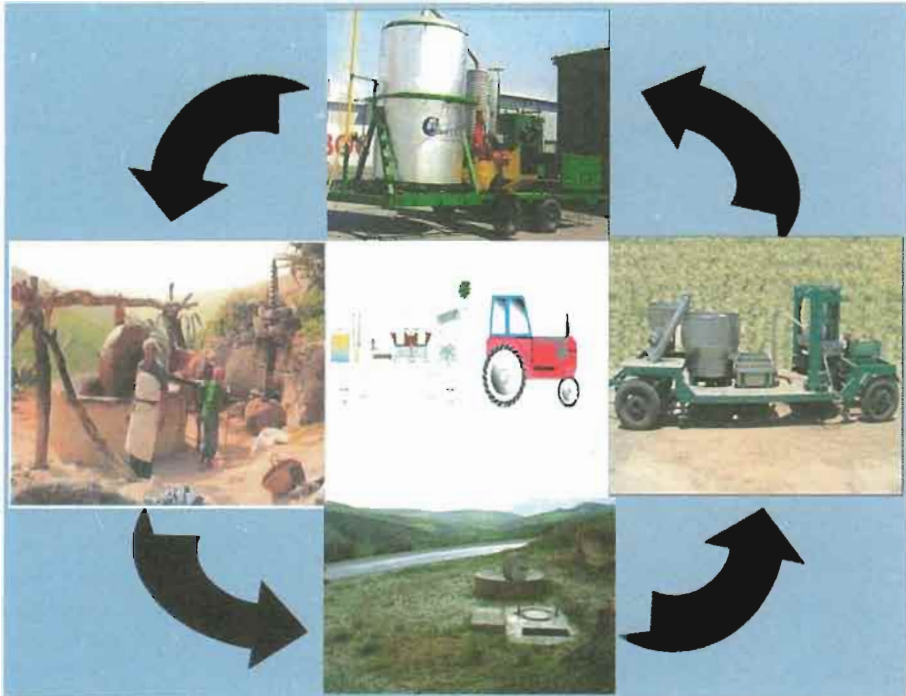


Figure 2. Développement des technologies mobiles au niveau du terroir marocain

La certification concertée des milieux conservateurs, comme c'est le cas des différents terroirs au Maroc où le mohtassib, nommé par l'État ou par les professionnels, demeure le seul responsable de la certification. La confiance des populations fait foi. Le mohtassib est une personnalité élue par la profession d'une filière spécifique et détient le droit et le pouvoir d'authentifier l'origine et la qualité des produits et des services de sa profession. Dans le cas où il y a nécessité de prendre des mesures comme les pénalités, celles-ci peuvent aller jusqu'à l'exclusion de la profession voire de la tribu.

Ce mode de gestion de la qualité ne peut être appliqué pour toute les filière de production ou de services. En fait, les produits des terroirs font partie des produits des industries agricoles et alimentaires. Ces derniers sont régis par des définitions du *Codex alimentarius*. Le respect de la qualité ne peut être acquis que par la connaissance des règles de bonnes pratiques de production et de fabrication. Toutes les technologies quelles qu'elles soient ne peuvent améliorer la qualité des produits. Elles peuvent seulement la sauvegarder d'où la nécessité de la mise en place d'un guide de bonnes pratiques de fabrication. Le mohtassib, dans ce cas, ne peut garantir que l'honnêteté des producteurs, mais pas les procédures normatives. En fait, la confiance est bonne, mais le contrôle c'est mieux. D'où la nécessité de la mise en place de système de traçabilité et de labellisation pour le développement de l'économie de qualité des produits de terroirs, notamment au niveau de la filière oléicole. La traçabilité s'est désormais confirmée comme l'une des caractéristiques explicites de la qualité des produits alimentaires.

3.3. Types de traçabilité

Diverses typologies, essentiellement sémantiques, ont été mises au point pour préciser le concept de la traçabilité. Chacune des différentes «catégories» définies implique des exigences très différentes les unes des autres.

La traçabilité administrative gère des informations historiques des événements du processus. Cela peut concerner les commandes, les livraisons, les factures, ..., d'un processus de distribution. Les bénéfiques seront l'information du client, le traitement éventuel des litiges et réclamations, l'anticipation des retards, ...

La traçabilité production concerne le déplacement de produits (production à stockage à client) ou d'équipements (machines ou matériels informatiques). Les bénéfiques seront la prévention ou la résolution des litiges liés au transport.

Dans la traçabilité matière, il s'agit, à partir des informations descriptives, de l'historique permettant la reconnaissance qualitative des marchandises fabriquées et/ou manipulées, à travers la notion de lots ou de n° de série. L'objectif est principalement le diagnostic ou la prévention des incidents «qualité». Ce sont des aspects de contrôle qui peuvent être imposés par la réglementation ou le respect des procédés techniques au sein de processus industriels.

Dans la traçabilité événementielle, des informations sont liées à des événements et des décisions liées à ces événements.

Une autre classification distingue entre les notions de traçabilité ascendante et descendante (Figure 3). La première permet de faire le relevé de toutes les étapes, retraçant l'historique à partir du lot d'un produit fini jusqu'à son origine alors que la deuxième est celle qui doit trouver la destinée industrielle ou commerciale d'un lot de produits jusqu'à son stockage au point de vente (Lagrange & Trognon, 1995).

Les termes de traçabilité amont ou aval correspondent au point de vue d'un acteur dans la filière. La traçabilité amont d'une entreprise désigne donc les procédures et outils mis en place pour retrouver ce qui est advenu sur le produit avant qu'elle en soit responsable alors que celle dite aval)concerne ce qui est advenu après le transfert vers des tiers.

Pour sa part, la traçabilité interne désigne la traçabilité des interventions dans l'entreprise. Elle est indépendante des partenaires commerciaux. Une traçabilité complète ne peut être que la juxtaposition de toutes ces formes de traçabilité (CNA, 2001).

L'aspect historique ancestral des produits et savoir-faire des réserves de la biosphère constituent un plus par rapport aux cultures et aux industries agressives. L'encadrement légal et réglementaire de la traçabilité n'est pas nouveau. Les pouvoirs publics de nombreux pays ont progressivement élaboré des fondements légaux et réglementaires de la traçabilité, « implicitement » ou « explicitement » et ce, depuis de nombreuses années (CNA, 2001).

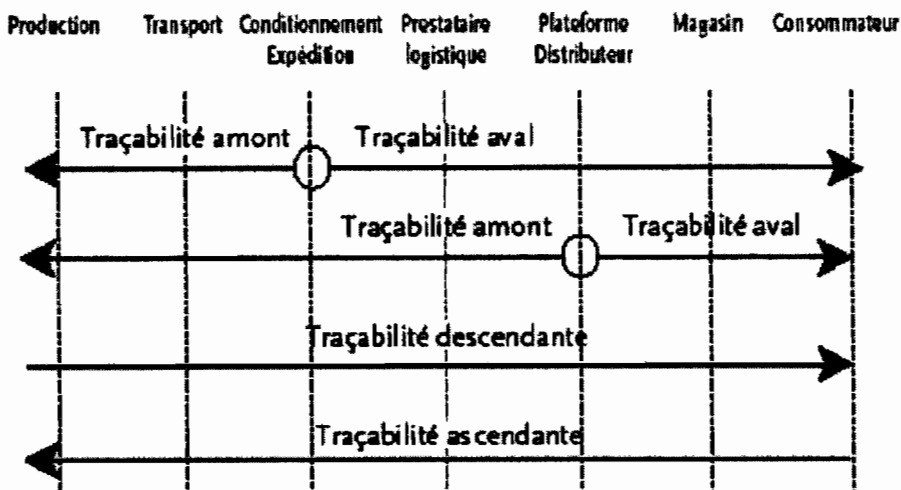


Figure 3. Différents types de traçabilité

3. ASPECTS RÉGLEMENTAIRES

Depuis le 1^{er} janvier 2005, la mise en place de la traçabilité est devenue obligatoire, au sein de l'UE, conformément au règlement (CE) N° 178/2002. Dans son article 18, le règlement précité stipule que :

- « La traçabilité est établie à toutes les étapes de la production, de la transformation et de la distribution ».
- « Les exploitants du secteur alimentaire doivent être en mesure d'identifier toute personne leur ayant fourni une denrée alimentaire ou toute substance destinée à être incorporée ou susceptible d'être incorporée dans des denrées alimentaires ».
- « Les exploitants du secteur alimentaire disposent de systèmes et de procédures permettant d'identifier les entreprises auxquelles leurs produits ont été fournis ».
- « Les denrées alimentaires qui sont mises sur le marché dans la Communauté Européenne ou susceptibles de l'être sont étiquetées ou identifiées de façon adéquate pour faciliter leur traçabilité, à l'aide des documents ou informations pertinents conformément aux prescriptions applicables prévues par des dispositions plus spécifiques » (CE, 2002).

Désormais, la traçabilité n'est plus seulement visée par le droit communautaire. S'agissant cette fois du droit marocain, des textes législatifs actuellement en préparation comportent certaines dispositions relatives à la traçabilité.

Ainsi, le Projet de loi relative à la qualité et à la sécurité des aliments :

- Instaure l'obligation générale de sécurité et de loyauté des transactions.
- Responsabilise les professionnels à travers la mise en place de systèmes d'autocontrôle au niveau de la production.
- Prévoit les conditions d'homologation, d'agrément et d'autorisation pour la mise sur le marché des aliments et produits agricoles nouveaux.

Ce projet de loi prévoit quelques éléments de la traçabilité à travers :

- La mise en place d'un système d'autocontrôle basé sur l'identification des dangers et leur maîtrise qui intègre la traçabilité par un système d'enregistrement.
- Le numéro d'homologation, d'agrément ou d'autorisation des produits.
- Un étiquetage spécifique pour les aliments nouveaux.

Aussi, le projet de loi n°04-01 édictant des mesures relatives à l'inspection sanitaire et qualitative des animaux vivants et des denrées végétales ou d'origine animale comporte les éléments suivants. Le dit projet :

- Définit la traçabilité.
- Institue la traçabilité des animaux destinés à l'abattage (vérification de l'identification de l'animal sur la base du document d'accompagnement, marquage par un n° d'ordre de l'abattoir).
- Institue la traçabilité des denrées animales et d'origine animale conditionnées par l'apposition d'une marque de salubrité indiquant le numéro d'agrément sanitaire vétérinaire.
- Responsabilise les opérateurs à travers :
 - * la mise en place de systèmes d'autocontrôle;
 - * l'établissement d'un procédé de traçabilité;
 - * la tenue de registre et de documents justificatifs.

Le projet de loi relative à la création de l'Agence de Contrôle de la Qualité et de la Sécurité des Aliments (ACQSA) stipule ce qui suit en ce qui concerne la traçabilité : « L'agence est compétente pour l'élaboration de systèmes d'identification et de traçabilité des aliments durant toute la chaîne de fabrication et le cycle de vie du produit ainsi que le contrôle de leur application par les professionnels selon des dispositions réglementaires » (Hilali, 2005).

Ci-dessous un exemple de schéma général d'obtention une AOC en France:

- Accordée par les pouvoirs publics pour des produits existant déjà depuis longtemps en quantité importante.
- Contrôlée par les pouvoirs publics à travers l'INAO.
- Une marque collective qui appartient à l'ensemble des producteurs et des transformateurs de la zone de production et qui ne peut être vendue. C'est donc un outil de développement pour la région.
- Elle doit intégrer une filière toute entière (nécessité d'une entente parfaite entre les différents protagonistes, même vision et même souci de rigueur, nécessité d'adaptation de l'outil industriel en rapport avec les produits).
- Le cahier des charges doit être très détaillé pour souligner la typicité; de ce fait il est très contraignant.
- La traçabilité est un élément capital pour suivre les étapes et maîtriser les risques, mais aussi pour éviter les fraudes et empêcher les fabrications de produits non conformes.
- La durée moyenne pour obtenir une AOC (AOP) est de 6 à 7 ans, les AOC les plus rapides s'obtiennent en 4 ans.

Une AOC nécessite un savoir-faire et un certain niveau de conscience.

4. AVANTAGES DE LA TRAÇABILITÉ

L'analyse des différents maillons de production de la filière oléicole nationale montre que la traçabilité reste une notion pour plusieurs unités et non une réalité au niveau des différentes pratiques.

La traçabilité présente plusieurs avantages en tant que:

- Outil de communication pour répondre aux attentes du consommateur.
- Argument commercial auprès des clients.
- Outil pour la gestion.
- Outil pour retrouver l'origine: la traçabilité montante.
- Outil pour retrouver la destination: la traçabilité descendante.
- Outil pour retrouver rapidement la cause d'un dysfonctionnement.

Au niveau de la filière oléicole, la traçabilité permet de:

- Répondre aux exigences nationales et internationales.
- Accéder aux circuits commerciaux spécialisés.
- Sauvegarder le savoir des oléiculteurs du milieu rural.
- Adapter les nouvelles technologies aux réalités socio-économiques du milieu rural.
- Asseoir une politique de labellisation des productions des terroirs oléicoles (AOG/AOC).
- Résoudre le problème du manque d'infrastructures dans le milieu rural.
- Améliorer l'état hygiénique des produits des terroirs enclavés.
- Aligner les huiles d'olive marocaine sur le standard international.
- Éliminer les huiles d'olive acides.
- Préparer des huiles d'olive extra-vierges et répondre aux objectifs du Plan National Oléicole.
- Optimiser la période de récolte.

4.1. Définition de la certification

La certification est définie par un grand nombre de consommateurs comme étant l'authentification de la qualité d'un produit ou d'un service. Dans les milieux enclavés (Figure 4), les produits s'identifient à leur milieu et à leur producteur: on reconnaît facilement les origines des produits, voire des individus qui les ont préparé.

Dans le milieu rural, la certification va au-delà de l'authentification pour devenir une recommandation. On distingue des certifications par profession, produits voire par individu.

La certification et la traçabilité dans le milieu oasien sont devenues des synonymes de qualité. La traçabilité et la certification dans ces milieux constituent, pour le consommateur d'aujourd'hui, une image de l'artisanat ou du naturel.



Figure 4. Exemple de terroir conservateur au niveau de la zone de Biosphère des Oasis du sud du Maroc

5. APPLICATION DES TECHNOLOGIES MOBILES POUR LA CERTIFICATION DES PRODUITS DE TERROIRS

Le monde rural marocain, conservateur par nature, a développé plusieurs techniques mobiles de service adaptées à la réalité socio-économique des populations. Ainsi, on rencontre des unités de pompage mobiles, des unités de broyage et de formulation d'aliment mobiles. Pour le développement des technologies adaptées aux terroirs, la proximité, la mobilité, la traçabilité et la qualité sont les idées maîtresses de ce genre d'activités (Figures 5 & 6).

La traçabilité et la labellisation dans le milieu conservateur passe par le transfert et l'adaptation des réglementations, des innovations technologiques pour rencontrer les standards de qualité à l'échelle nationale et internationale. Pour permettre une mise à niveau du maillon de la transformation des olives, on avait jugé nécessaire d'introduire les bonnes pratiques de fabrication et de préservation de l'environnement à travers la mise en place d'une technologie mobile qui permet d'annuler toutes les contraintes liées aux transport, stockage et aux mauvaises conditions de trituration.

Cette technologie est venue pour contribuer à la réalisation des objectifs arrêtés par le Plan National Oléicole afin d'augmenter l'efficacité de la filière et appuyer son intégration dans les circuits de commerce spécialisés des huiles d'olive de qualité. Elle vise la mise en place d'une technologie oléicole nationale pour l'amélioration des techniques d'extraction des huiles d'olive.

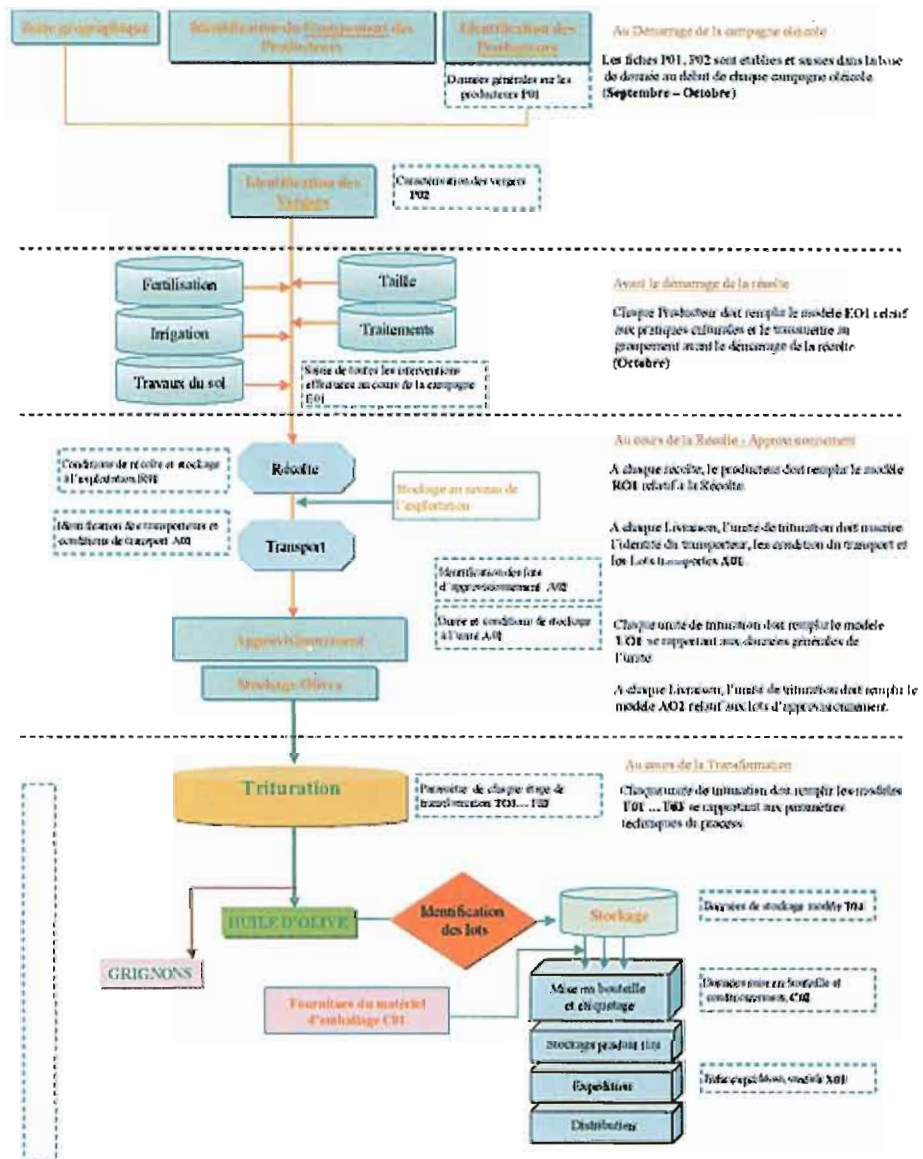


Figure 5. Diagramme de mise en œuvre du schéma de traçabilité dans la filière Huile d'olive

Source: Sarsri (2005)



Figure 6. Mise en place des technologies mobiles dans le milieu oasien

L'extraction instantanée des huiles d'olive sur les lieux de production avec l'unité mobile permet d'obtenir des huiles d'olive extra-vierges avec leurs arômes naturels (appellations terroirs AOC et AOG) et permet de leurs éviter tous les effets négatifs liés aux problèmes des unités traditionnelles.

Conçue entièrement au Maroc, cette technologie a pour but d'appuyer et de consolider le plan national oléicole dans le développement de la filière oléicole. La mobilité, la proximité, la productivité et la traçabilité constituent les atouts majeurs de cette nouvelle technologie (Figure 6). Cette technologie s'adapte à tous les systèmes de certification nationaux et internationaux. Elle permet donc la mise en place:

- des systèmes de bonnes pratiques de transformation;
- d'un système de qualité;
- d'un système de traçabilité;
- d'un système de gestion de l'environnement.

L'introduction de ces pratiques permet d'améliorer la compétitivité du produit marocain en:

- Introduisant la culture de la gestion de la qualité et de l'environnement chez les producteurs et les transformateurs.
- Se conformant aux exigences des marchés en matière de traçabilité et de la qualité.
- Renforçant l'intégration de la filière en établissant les canaux de communication entre industriels et producteurs par le biais de systèmes de la certification et de la labellisation.

L'accompagnement technologique des oléiculteurs avec des systèmes mobiles écologiques certifiés et adaptés à la réalité géographique, économique, sociale et culturelle devrait conduire à la mise en place d'un modèle original de certification des produits agricoles en vue de désenclaver et faire connaître les propriétés nutritionnelles des produits de ces zones.

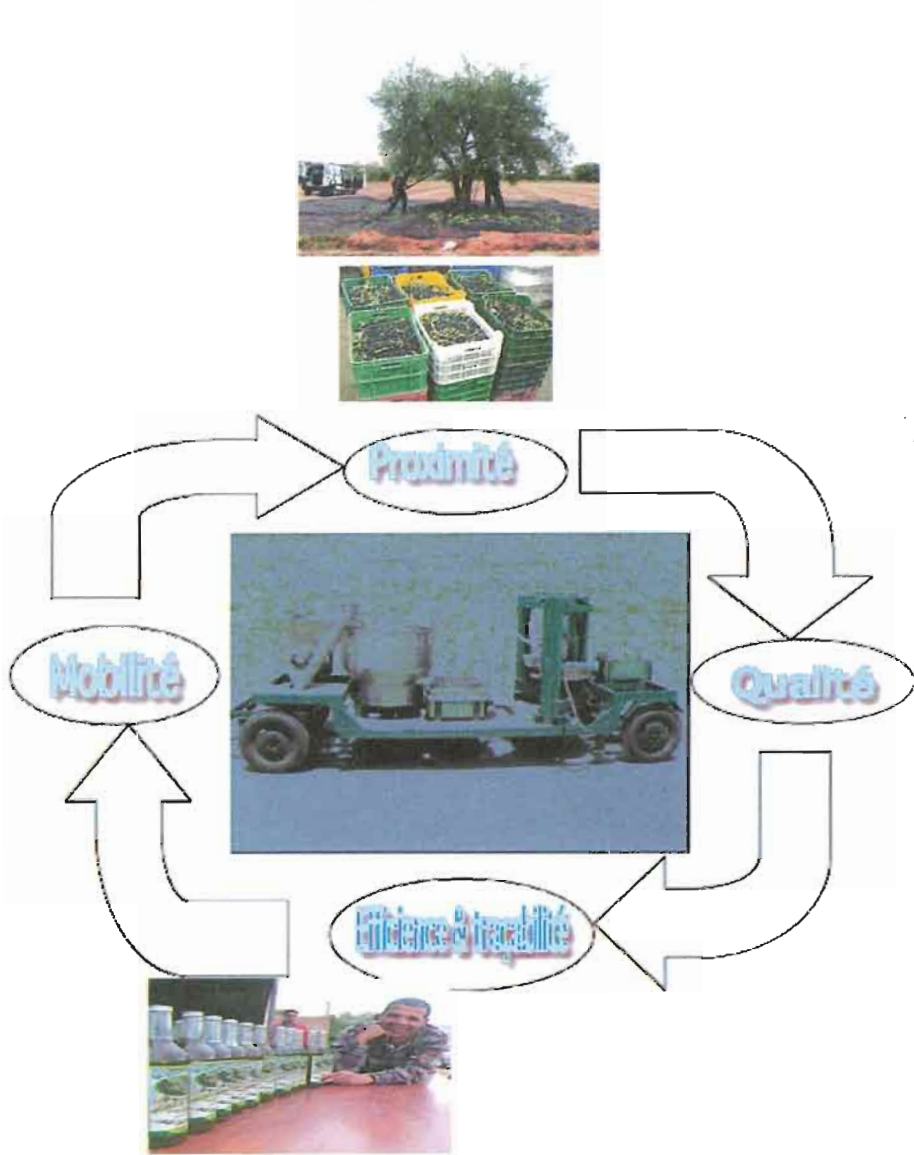


Figure 7. Technologies mobiles post-récolte au service de la traçabilité et de la labellisation des produits de terroirs

6. MODÈLE PRÉVISIONNEL POUR L'APPLICATION DE LA TRAÇABILITÉ

L'approche consiste à impliquer tous les opérateurs concernés par le projet. Un groupement ou une entreprise qui décide de mettre en place la traçabilité et la certification doit suivre un itinéraire logique lui permettant la mise en œuvre d'un système adapté à ses objectifs, à ses possibilités et aux attentes de ses clients.

Une telle démarche doit suivre les étapes indiquées dans la figure 8.

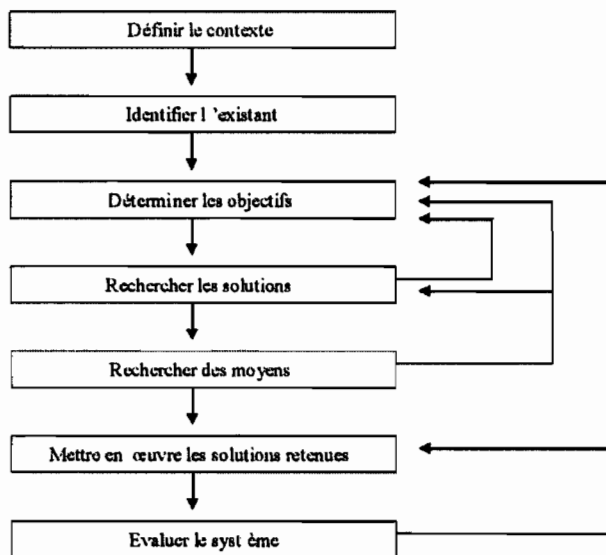


Figure 8. Démarche méthodologique pour la mise en œuvre de la traçabilité (Fascicule FD V 01-020, 2002)

Le label Maroc et la marque NM, délivrés par le SNIMA, sont des garanties de conformité à des référentiels spécifiques à la qualité standard et non pas des mentions d'origine témoignant d'un savoir-faire typique lié à un terroir donné.

7. CONCLUSION

La certification dans les milieux conservateurs est basée sur la vérification humaine. C'est quelque chose qui se vit d'une génération à l'autre. La traçabilité et la labellisation dans les terroirs passe par le transfert et l'adaptation des réglementations, des innovations technologiques pour s'aligner avec les standards de qualité à l'échelle nationale et internationale.

L'introduction de nouvelles technologies modernes basées sur le savoir-faire local ont permis à certains produits d'acquérir une réputation qui dépasse les frontières de la réserve et leur a permis de regagner des circuits identiques à ceux qui sont empruntés par les produits d'Appellation d'Origine Protégée (AOP) ou d'Indication Géographique Protégée (IGP) voire des mentions de Spécialité Traditionnelle Garantie (STG). C'est le cas des produits de l'Arganier.

Les conséquences de mise en place des systèmes de traçabilité seraient non négligeables en matière de diversification des sources de revenus pour le petit agriculteur, de dissuasion de certaines migrations internes (exode rural) en dessinant aux acteurs concernés des perspectives économiques intéressantes, etc.

8. POUR EN SAVOIR PLUS

- CE (2002) Règlement N° 178/2002 du parlement européen et du conseil. *Journal officiel des Communautés européennes*. Bruxelles. Belgique.
- CNA (2001) Avis sur la traçabilité des denrées alimentaires. Conseil national de l'alimentation. France.
- Codex Alimentarius (1969) Code d'usage international recommandé – principes généraux d'hygiène alimentaire. [CAC/RCP 1-1969 Rev 4 (2003)].
- Duflot V. (1997) Traçabilité maître mot d'une campagne. *Circuits culture* 307: 38-5
- Fellahi S. (2004) Les produits alimentaires de terroir au Maroc: état des lieux et stratégies de valorisation. Mémoire 3^{ème} cycle Agroéconomie, Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II
- Hilali A. (2005) Cadre juridique national relatif au domaine de la sécurité des aliments: état des lieux et aspects de traçabilité traités. Intervention lors de la 8^{ème} édition du Forum de l'ASSELEING-IAA le 19 mars 2005. DPVCTRF. Ministère de l'Agriculture, du Développement Rural et des Pêches Maritimes. Rabat. Maroc.
- Ismaili Alaoui M. & Dogse P. (2005) Certification des produits agricoles de qualité des écosystèmes oasiens: application des technologies mobiles. *In Symposium International sur le développement Agricole Durable des systèmes oasiens, Erfoud du 07-10 mars 2005.*
- Ismaili Alaoui M. (2005) Développement des économies de qualité des Oasis du Sud, UNESCO.
- Ismaili Alaoui M. (2005) Étude pilote sur la certification et la labellisation pour le développement des économies de qualité dans la réserve de biosphère
- ISO 9001 (2000) Système de management de la qualité – Exigences. NM 1809001 (Indice de classement NM 00.5.053)
- Lagrange L. & Trognon L. (1995) Produits alimentaires de terroir: typologie, construction, enjeux. Communication au Séminaire Qualification des produits et des territoires, Toulouse les 2 et 3 octobre 1995, Toulouse: INRA ESR.12 p.
- MADRPM/DERD (1998) Bulletin de liaison du programme national de transfert de technologie en agriculture, n°51.
- Norme Française FD V 01-020 (2002) Lignes directrices pour l'établissement d'une démarche de traçabilité dans les filières agricoles et alimentaires. AFNOR, France, 21 p.
- Sarsri L. (2005) Contribution et mise en œuvre d'un système de traçabilité pour la filière de l'huile d'olive
- Service de Normalisation Industrielle Marocaine. Labellisation des produits agro-alimentaires. Disponible sur Internet

Webographie

- http://www.fnsea.fr/publications/information_agricole/Extraits/ia784dossier.pdf
- <http://www.inao.fr>
- <http://www.gqnpc.com>
- <http://www.wipo.int>
- <http://www.aoc-igp.ch>
- <http://www.fromag.com/pratique/signes.html>
- <http://www.fromag.com/pratique/reglemen.html>
- <http://www.credoc.asso.fr/pub/pub.htm>
- <http://www.inao.gouv.fr/public/home.php>
- <http://www.crc-conso.com>
- http://www.agriculture.gouv.fr/spip/ressources/publicationsofficielles/avisduconseilnationaldelalimentationcna_r381.html
- http://www.missioneco.org/maroc/documents_new.asp?V=10_PDF_71237
- <http://www.certificationqualite.com, 2001>
- http://www.missioneco.org/maroc/documents_new.asp?V=10_PDF_71237
- <http://www.aniveau.ma>
- <http://www.asept.fr>
- <http://www.dnv.fr>
- <http://www.eacce.org.ma>

Tentative de modernisation des Maâsra traditionnelles. Unité mobile d'extraction des huiles d'olives

My Mustapha ISMAILI ALAOUI ¹ & Ali HEDDOUN ²

¹ Institut Agronomique & Vétérinaire Hassan II, B.P. 6202-Instituts, Madinate Al Irfane, 10101 Rabat, Maroc

² Sacmi

Auteur correspondant, courriel: m.ismaili@iav.ac.ma

1. INTRODUCTION

L'oléiculture marocaine participe à l'autosuffisance du pays en huiles alimentaires à près de 18% des besoins (Touzani, 1998). La picholine marocaine, bien adaptée à la fois pour la production des olives de table et pour l'extraction de l'huile d'olive, prédomine dans les oliveraies marocaines à plus de 95%. La production marocaine est d'environ 400 à 500 000 tonnes d'olives par an et permet de créer 11 millions de journées de travail par an, soit l'équivalent de plus de 60 000 emplois permanents. Les exportations marocaines en olives de table s'élèvent à environ 1 milliard de DH. La production à hauteur de 65% est réalisée par des petits producteurs pratiquant une agriculture de subsistance. De ce fait, ce secteur souffre de l'utilisation d'une technologie à caractère artisanal. En effet, l'huile d'olive est produite dans des conditions d'extraction fastidieuses avec un faible rendement, des pertes importantes et une qualité souvent médiocre, de type «lampante» (à acidité élevée > 3,3) et donc impropre à la consommation.

Les Maâsra traitent en moyenne 150 à 200 000 t d'olives/an avec des rendements qui ne dépassent pas 14% contre 21 à 23% du potentiel de la variété «Picholine marocaine», ce qui engendre une perte importante dépassant 3 litres d'huile par quintal d'olive correspondant à 18 à 25% de la production nationale, soit 8 à 10 000 t/an, d'une valeur de 14.000.000 à 21.000.000 DH/an, sans tenir compte des pertes dans les margines.

Sur le plan de la qualité, près de 60% de la production oléicole du pays est «lampante» (Rahmani, 1999). Les raisons qui expliquent une telle situation ont trait à la mauvaise qualité de la matière première triturée, aux équipements vétustes d'extraction, à la conduite des opérations technologiques menées lors de la production de l'huile et aux conditions d'hygiène régnant au niveau des Maâsra.

La matière première (olives) traitée au niveau de ces unités conditionne également et de façon significative la qualité de l'huile. Les figures 1 et 2 résument les principaux paramètres influençant le rendement et la qualité de l'huile d'olive.



Figure 1. Principaux paramètres influençant la qualité de l'huile d'olive

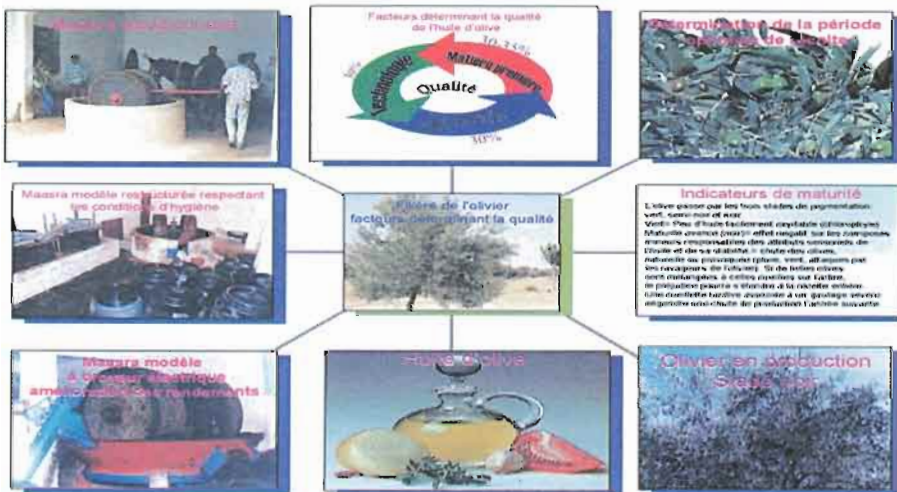


Figure 2. Schéma récapitulatif des principales étapes influençant la qualité de l'huile d'olive

Dans le cadre du projet restructuration des Maâsra traditionnelles au Maroc, on a axé notre effort essentiellement sur la rationalisation des techniques d'exploitation de l'olivier par la mise en place d'une Industrie Oléicole nationale fondée sur la mobilité, la proximité et la qualité en tenant compte des réalités socio-économiques du milieu rural.

2. OBJECTIFS

Le projet a pour objectif de consolider et d'appuyer le Plan National Oléicole pour le développement de la filière de l'olivier au Maroc. Son but principal est l'amélioration des conditions de vie des petits oléiculteurs en mettant à leur disposition des outils technologiques adaptés aux réalités du monde rural.

Les objectifs spécifiques de notre modeste contribution sont les suivants:

- Amélioration des techniques d'extraction de l'huile d'olive avec deux volets:
 - * Transfert du nouveau système technologique aux propriétaires des Maâsra.
 - * Dissémination de l'information auprès des oléiculteurs et formation du personnel.

Les techniques oléicoles pratiquées au Maroc restent dans leur grande majorité rudimentaires, tant au niveau de la production des olives (manque d'irrigation, seulement 10% des oliveraies bénéficient d'une irrigation; rendements médiocres: 480 000 tonnes produites par an et ne couvrant que 18% des besoins en huile alimentaire) qu'au niveau des techniques d'extraction, la réflexion sur l'intervention du projet dans la filière de production des huiles d'olives, et plus particulièrement son impact économique et social, aborde une question importante et assez complexe.

La question est importante parce que la stratégie actuelle du pays en la matière vise à développer le secteur oleicole (la superficie oléicole nationale est passée de 97 000 ha en 1947 à 150 000 ha en 1960, à 247 000 ha en 1970 et à 540 000 ha en 2001. D'ailleurs, le Plan National Oléicole prévoit de doubler cette superficie en 2010. Les superficies mentionnées représentent des aires de production très mal réparties: moins de dix pour cent correspondent à des oliveraies intensives, ce qui équivaut à une superficie de 54.000 ha. Plus de soixante pour cent des aires oléicoles correspondent à des oliveraies traditionnelles, soit une superficie de 324.000 ha et plus de vingt pour cent des aires oléicoles correspondent à des oliveraies marginales, soit une superficie d'environ 108.000 ha. La répartition de la production entre ces trois aires de production reste méconnue. Les raisons qui expliquent cette méconnaissance sont souvent d'ordre technique.

Les zones à oléiculture intensive sont souvent situées dans des régions favorables, utilisant une technologie moderne d'implantation et de production. C'est le cas de la région Nord de la zone de Tadla.

Les zones à oléiculture traditionnelle sont caractérisées par des cultures ou plantations dans des conditions qui ne permettent pas à l'espèce (Picholine marocaine) d'offrir les résultats de production dont elle est capable. Quant aux zones marginales, elles se caractérisent par une faible production liée à des causes pédologiques, orographiques et climatiques. Ce sont souvent des sols très accidentés, squelettiques à grandes pentes, d'une pluviométrie faible et de distribution irrégulière.



Figure 3. Exemple de zones à oléiculture intensive/ traditionnelle

La culture de l'olivier, que ce soit dans les zones traditionnelles ou marginales, ne présentant pas de bilan économique favorable, sa justification est surtout liée à la clôture des parcelles, à la protection du sol et à la conservation du paysage. Le coût financier des investissements dans ces zones n'est pas à la portée des oléiculteurs qui comptent toujours sur les interventions des pouvoirs publics.

La question est complexe car elle fait appel à un savoir scientifique, économique et une réflexion d'ordre sociologique sur les comportements et les pratiques des concernés. L'approche globale adoptée est centrée sur tous les aspects de la filière depuis la production jusqu'à la commercialisation. Il y a lieu de signaler que dans les deux zones du projet, l'oléiculture souffre de trois problèmes presque identiques:

- Manque de formation des oléiculteurs. Leur culture est essentiellement orale.
- Baisse de productivité.
- Faible qualité.

Ainsi, pour sensibiliser les décideurs dans ces zones, le projet cherche à appuyer les techniques existantes et à améliorer la qualité de l'huile. La vision du projet à long terme consiste essentiellement à améliorer les conditions de travail des propriétaires des petites unités traditionnelles de presses à olives (Maâsra). Ceci permettra d'augmenter leurs revenus et de les insérer dans le marché international en mettant à leur disposition une technologie adaptée aux réalités socio-économique du pays tout en préservant les spécificités intrinsèques des paysans marocains. On cherche à identifier, en partenariat avec le Crédit Agricole, les zones ou terroirs qui peuvent installer les systèmes de traçabilité et d'Appellation d'Origine Contrôlée (AOC) à l'image de ce qui se fait en Europe.

3. SITUATION DES STRUCTURES DE PRODUCTION

Les contraintes majeures entravant le développement de ce secteur sont plus d'ordre technique et économique que d'ordre naturel. En effet, quoique les conditions naturelles soient parfois exceptionnelles pour l'obtention d'une huile de qualité, une grande proportion des huiles produites est défectueuse. Par conséquent, ces huiles sont inaptes à la consommation humaine sans être rectifiées.

Le manque d'organisation des circuits de distribution, la non maîtrise des techniques appropriées freinent l'expansion de ce secteur dans les zones du projet. Pour lever ces contraintes majeures et optimiser les actions menées par le projet, un appui institutionnel et un encadrement technique s'imposent.

3.1. Mesures d'accompagnement

Sur le plan institutionnel, les mesures d'accompagnement qui seront prises en compte par le projet devront permettre de valoriser et de renforcer la performance des propriétaires des Maâsra les plus pauvres et de les intégrer dans un circuit organisé. Ces mesures visent:

- La promotion et l'organisation des coopératives existantes.
- La formation des jeunes (fils d'agriculteurs).
- La constitution d'un réseau ou d'une filière de transformation des sous-produits.
- L'appui à la constitution d'un réseau de commercialisation.

3.2. Diffusion de la technologie

La diffusion de ce type d'unités mobiles, qui répond à des performances plus importantes et à des normes d'hygiène exemplaires, doit jouer le rôle de référentiel et de modèle pour la formation des artisans en matière d'hygiène et de techniques améliorées. Cette nouvelle méthode d'extraction devrait:

- Aider à diminuer la pénibilité du travail des femmes et des enfants qui sont concernés par cette activité surtout pour la collecte et la trituration des olives.
- Diminuer les pertes occasionnées par l'ancienne méthode et ainsi augmenter les rendements.
- Diminuer le temps de stockage ce qui, d'une part, baissera les coûts et, d'autre part, améliorera la qualité de l'huile par une diminution de l'acidité.

La formation et l'information des populations cibles suivant la méthode de Recherche active participative « MARP » permettent d'expliquer les critères de classification des huiles d'olive.

Le modèle proposé permet de compléter le savoir-faire marocain dans la mesure où il permet:

- La pratique d'effeuillage et de lavage des olives.
- La réduction du temps de leur stockage.
- La manière de les entreposer.
- La façon pour éviter les broyages multiples et les altérations avec les pressages.
- La pratique de stockage différenciée et adéquate.
- L'amélioration des conditions d'extraction par la restructuration des Maâsra.

4. CONCLUSION

L'adoption de ce modèle par les oléiculteurs devrait contribuer à la réalisation des objectifs visés par le Plan National Oléicole et le Crédit Agricole. Il permettra non seulement d'éviter les pertes actuelles estimées 7.800.000 litres d'huile d'olives par an, mais également d'améliorer la qualité hygiénique et organoleptique de cette huile reconnue comme étant hypocholestérolémiant et donc préventive des maladies cardiovasculaires (Ettalibi, 2000).

Les principaux bénéficiaires de cette technologie seront les petits oléiculteurs qui traitent 60% de la production nationale et qui auront à leur disposition un outil technologique adapté aux réalités socio-économiques du milieu rural. Ce type d'unité est conçu à 100% à l'échelle nationale selon les normes du Conseil Oléicole International. Ceci devrait permettre aux huiles d'olive marocaines de répondre aux normes de qualité émises par ce conseil.

Cette innovation constitue une contribution à la mise en place d'une technologie oléicole marocaine qui aura des retombées directes au niveau de la filière de l'olivier avec des effets multiplicateurs divers.

Ce modèle unique de Maâsra sera disséminé, à l'échelle nationale et même à l'échelle méditerranéenne, via la mise en place de groupements de jeunes prometteurs. Il permet de travailler le plus près des oléiculteurs en touchant le maximum d'oliveraies pendant la même campagne oléicole. Cette unité devrait également permettre de respecter le calendrier des périodes optimales de récolte. Cette technologie est écologique: elle permet de diluer dans le temps et dans l'espace les margines, du fait qu'elle ne permet pas leur accumulation dans une seule zone.

En plus des aspects socio-économiques, cette unité de trituration mobile vise à réduire la durée de stockage des olives au niveau des Maâsra et donc à améliorer les rendements d'extraction, la qualité hygiénique et technologique des Maâsra traditionnelles. En effet, l'un des principaux handicaps du secteur reste la sous et la mauvaise exploitation, car la technologie utilisée procure un taux d'extraction inférieur au potentiel de la variété «Picholine marocaine» (21 à 23%), ce qui occasionne une perte importante dépassant 3 litres d'huile d'olive par quintal d'olives, soit 600.000 à 900.000 l/an, d'une valeur de 14 000 000 à 21 000 000 DH/an, sans tenir compte des pertes dans les margines. Sur le plan de la qualité, les huiles d'olive produites au niveau des Maâsra traditionnelles sont souvent classées dans la catégorie «lampante».

Les résultats de mise en place d'une unité mobile d'extraction des huiles d'olive devraient permettre l'accompagnement d'installation d'oliveraies modèles dans les zones favorables et la rationalisation des techniques de récolte et d'extraction des huiles d'olive (Figure 4).



Figure 4. Unité mobile de trituration d'olives (Objet d'un brevet d'invention)

L'unité semi-mobile d'extraction des huiles d'olive (Figure 5) présente l'avantage d'être déposée au bord de la route près des oliveraies (ce qui est bon pour la publicité). Bien entendu, on ne laisse que les parties difficiles à transporter.



Figure 5. Unité semi-mobile

L'unité mobile est conçue suivant le module compact monobloc tractable, flexible, modulaire, réglable et optimisé. Elle comporte les modules suivants: trémie, effeuilleuse, laveuse, broyeur, malaxeur, répartiteur, presses et décanteur (Figures 6 à 14).



Figure 6. Trémie de réception des olives



Figure 7. Système d'alimentation et de lavage



Figure 8. Système de broyage (meules en granit)



Figure 9. Pâte d'olive en cours de broyage



Figure 10. Malaxeur et trémie de broyage



Figure 11. Presse des scourtins chargés d'olives triturées à l'aide de l'unité mobile

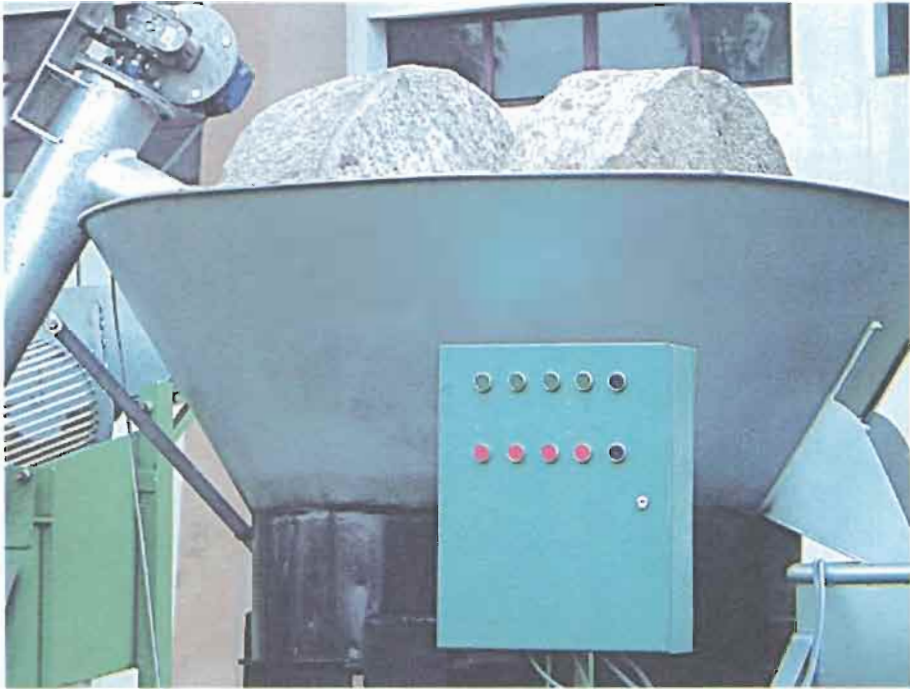


Figure 12. Armoire électrique de commande



Figure 13. Récupération des huiles d'olives décantées à partir du bassin de décantation



Figure 14. Vue d'ensemble de l'unité mobile première version

La dégustation et le dosage de l'huile d'olive occupent une place importante (Figures 15, 16 & 17)



Figure 15. Huiles d'olive de différentes Maâsra du Maroc

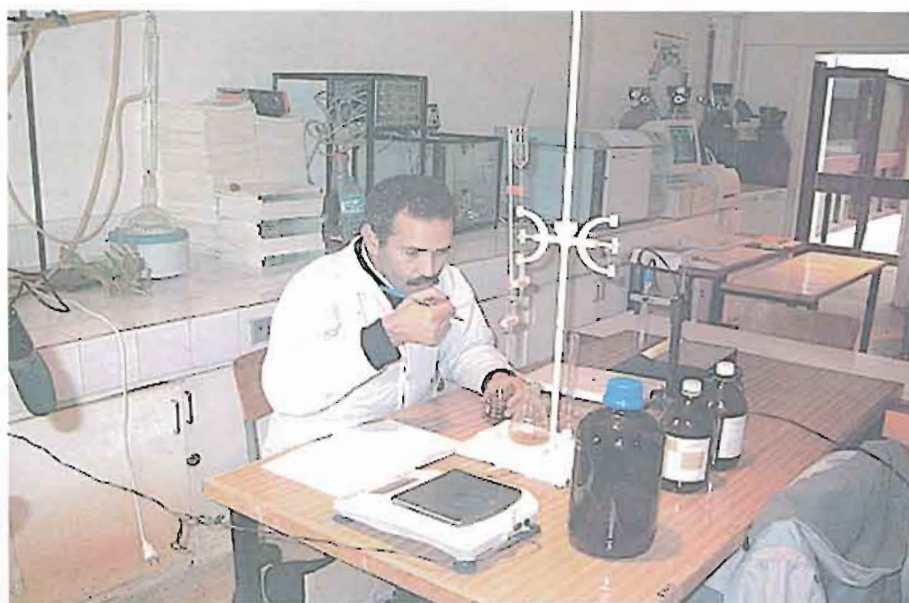


Figure 16. Dégustation avant dosage des huiles d'olive



Figure 17. Dosage des huiles d'olive de la campagne (2004)

Bien entendu, les objectifs ne peuvent être atteints que s'il y a analphabétisation professionnelle sur les lieux de production (Figures 18, 19, 20 & 21)



Figure 18. Journée de sensibilisation et de formation organisée en collaboration avec l'Office de Mise en valeur Agricole de Tafilalet



Figure 19. Journée de sensibilisation organisée en collaboration avec l'Office de Mise en valeur Agricole de Tafilalet



Figure 20. Dégustation des huiles d'olives produites par l'unité mobile

Les oléiculteurs ayant reçu l'explication sur l'acidité d'une huile d'olive sont les dégustateurs



Figure 21. Fabriquer des unités d'extraction des huiles d'olive, c'est possible aujourd'hui au Maroc

En résumé, parmi les domaines d'application envisagés pour l'unité mobile, le principal demeure l'extraction des huiles d'olives sur les lieux de production au niveau même des oliveraies. Le conditionnement des huiles d'olive produites est également envisagé.

Le modèle réalisé répond aux normes technologiques préconisées par les spécialistes d'extraction des huiles alimentaires. Il s'adapte aux besoins des oléiculteurs du milieu rural. Il permet de triturer des olives sur les lieux de production et d'améliorer le rendement d'extraction, les conditions hygiéniques de production, la réduction des coûts de transport et de durée de stockage des olives. En conséquence la qualité des huiles d'olive est bel et bien améliorée. Les huiles d'olives obtenues sont extra-vierges, d'excellente qualité physico-chimique et organoleptique.

Cette unité mobile constitue en réalité une école professionnelle pour les oléiculteurs des zones enclavées. Elle est à la fois interface entre le savoir-faire des oléiculteurs traditionnels et la technologie moderne. Elle se veut un modèle d'échanges culturels et industriels digne d'un partenariat exemplaire. Aussi, est-il demandé aux décideurs d'accompagner cette nouvelle expérience.

5. RÉFÉRENCES CITÉES

Ettalibi M. (2000) Lipides. Collection Biochimie pour tous. Actes Editions, 288 p., ISBN: 9981-801-42-9, Rabat, maroc

Rahmani M. (1999) Journée d'informations sur les potentialités de l'olivier dans la région de Taounate, 8 mai 1999

Touzani A. (1998) Gestion technique des plantations d'oliviers en condition d'agriculture pluviale: nouvelles perspectives. Ministère du commerce extérieur. Rabat

Évolution de la technologie d'élaboration de l'huile d'olive vierge en Espagne durant la décennie 1994-2004

José ALBA MENDOZA

Almazara Experimental. Instituto de la Grasa. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. C.S.I.C., Sevilla, España

L'huile d'olive est le jus huileux obtenu au cours du processus d'élaboration des olives par des moyens uniquement physiques. Grâce à ce système et lors de l'utilisation de fruits frais, au point optimal de murissement, l'huile ainsi obtenue présente des caractéristiques organoleptiques et une composition appréciée par les consommateurs. Elle apporte toute une série de composés de grande valeur nutritionnelle grâce à sa particulière composition en acides gras mono- et poly-insaturés, antioxydants comme les tocophérols et les polyphénols qui exercent une influence positive sur l'état général de santé. D'autre part, ce que le consommateur doit apprécier lorsqu'il s'en sert est le plaisir et la satisfaction sensoriels produits par sa couleur, son arôme et son goût, de façon individuelle ou mélangée à d'autres aliments.

Bien entendu, tout ceci fait partie de la culture alimentaire du bassin méditerranéen. Toutefois, malgré une information très pauvre à l'échelle mondiale, la consommation de l'huile d'olive est en train de s'étendre non seulement dans les pays producteurs, mais aussi dans les pays non producteurs.

Il faut savoir que les vertus principales de ce produit se trouvent dans les huiles vierges de qualité et c'est pourquoi l'objectif de la production d'olives et de son élaboration doit être d'adapter tous les procédés afin d'obtenir un jus huileux de la meilleure qualité.

Aussi, qu'en est-il de l'évolution de ce secteur en Espagne pendant la décennie 1994-2004?

Traditionnellement, le murissement de l'olive est mis en rapport avec les changements de coloration des fruits. On réalise la récolte, en général, sous un critère visuel où l'un des facteurs les plus importants est le contenu en huile.

Aujourd'hui, il est démontré que le système le plus rationnel pour déterminer l'évolution du murissement est le contrôle d'échantillons pris pendant une période de temps d'environ 30 jours avant la date possible de la récolte.



Influence physique du murissement sur l'olive et sur l'huile

Les déterminations que l'on doit effectuer sont le contrôle du point de murissement basé sur une échelle de couleurs de la peau et de la pulpe des fruits, les contenus en humidité, en huile partielle par centrifugation et huile totale à sec, l'extractabilité, l'acidité et les caractéristiques organoleptiques de l'huile obtenue par centrifugation.

Indice de murissement

Classe 0: Peau vert foncé.
 Classe 1: Peau vert jaunâtre.
 Classe 2: Peau verte avec des tâches rosâtres sur moins de la moitié du fruit. Début de séchage.
 Classe 3: Peau rosâtres ou violette sur plus de la moitié du fruit. Fin de séchage.
 Classe 4: Peau noire et pulpe blanche.
 Classe 5: Peau noire et pulpe violette. Moment de la mûre de la pulpe.
 Classe 6: Peau noire et pulpe violette sans arriver au noyau.
 Classe 7: Peau noire et pulpe violette complètes (jusqu'au noyau).

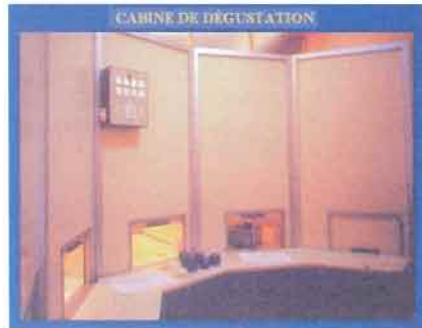
Étant A, B, C, D, E, F, G, H le nombre de fruits des classes 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 et 7 respectivement on obtient l'indice de mûre selon la formule:

$$I.M. = \frac{A \times 0 + B \times 1 + C \times 2 + D \times 3 + E \times 4 + F \times 5 + G \times 6 + H \times 7}{100}$$

Détermination du contenu partiel en huile. Méthode de centrifugation Abencor-MC2

L'évolution du contenu en huile partielle et totale, pendant la période établie, indique l'optimum de la biosynthèse de l'huile. Le reste des paramètres détermine sa qualité à chaque instant. Ceci permet de préciser, à partir de l'expérimentation avec cette méthodologie scientifique, le moment optimal pour la récolte.

Détermination du contenu total en huile. Méthode de Résonance Magnétique Nucléaire



La récolte était réalisée traditionnellement par le système de gaulage, ce qui provoquait une détérioration considérable aux olives et surtout à l'arbre. Maintenant ce système est en train d'être remplacé par d'autres systèmes de vibration des tiges et des branches tout en utilisant de plus en plus une bâche, un filet ou un parapluie inversé, afin

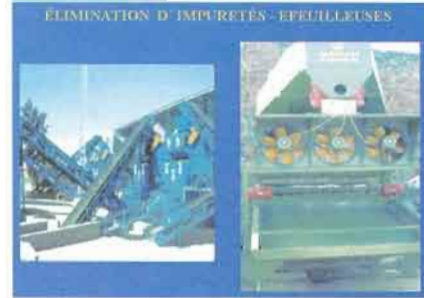
d'isoler les olives de l'arbre de celles qui sont par terre, ainsi que des polluants qui peuvent exister sur le terrain.



Afin de produire le moins possible de détériorations aux olives récoltées, on a adopté un transport via des conteneurs perforés qui facilitent l'aération et qui évitent l'aplatissement. On ne se sert du transport en vrac que lorsque les distances sont courtes.



Dans la zone de réception, où la répercussion est très élevée en ce qui concerne la différenciation des fruits et la conservation de la qualité, il s'est produit de grands changements, surtout en raison de pouvoir séparer les olives selon les variétés, l'état de murissement et l'origine. Pour ceci, il existe des zones de circulation ordonnées et il y a des trémies de réception différenciées avec des lignes d'effeuillement (nettoyeuses qui n'emploient que de l'air) et d'élimination d'impuretés plus lourdes (nettoyeuses qui n'emploient que de l'eau), tout cela en fonction de l'origine et de l'état des olives.

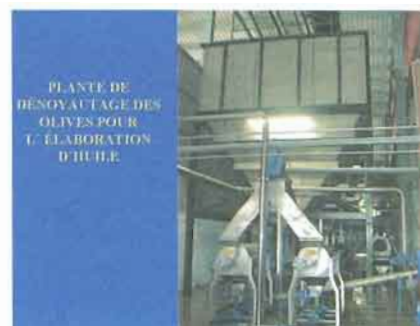
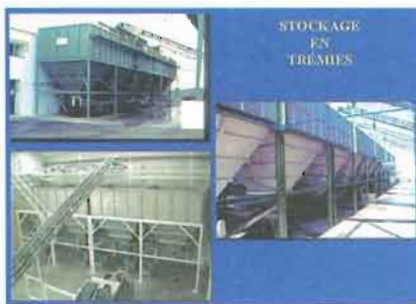


Aujourd'hui, dans toutes les installations, on fait un contrôle du poids de chaque lot exempt d'impuretés et on prend un échantillon représentatif pour une valorisation économique, tout en déterminant dans le laboratoire, à l'aide des instruments appropriés, le contenu en humidité et en huile totale, le rendement industriel et l'acidité de l'huile.



À la suite du niveau de séparation en fonction de la qualité des olives et pour établir la traçabilité du produit, il y a au moins deux trémies "poumon" prêtes à admettre les taux maxima de réception. L'une est consacrée à l'élaboration et l'autre à la réception d'une journée. La plupart de ces trémies sont en train d'être changées par d'autres en acier inoxydable. L'élaboration commence avec le processus de pressage. Le système traditionnellement utilisé dans cette opération était le broyeur à marteaux, que l'on continue à employer sous la variante en acier inoxydable. Pour faire diminuer son influence au niveau de l'amertume, on utilise désormais des broyeurs à cylindres striés parallèles, des broyeurs à double crible et à disques dentés.

La dernière nouveauté consiste à dénoyauter les olives, mais pour le moment cette procédure n'est employée que dans peu d'installations. D'ailleurs, la production différenciée de ce type d'huile de haute qualité peut influencer sur sa divulgation, malgré les difficultés d'élaboration que ces pâtes dénoyautées présentent.



Dans le processus de malaxage, on a essayé d'augmenter son efficacité dans les systèmes de chauffage et de contrôle. Pour cela, on emploie des senseurs placés à des endroits stratégiques pour garantir un niveau de température adéquat. Pour que la coalescence des gouttes d'huile soit plus grande, on augmente le niveau de frottement de la pâte en introduisant des commutateurs et en augmentant le nombre de palettes.



Afin de disposer de façon continue de l'information nécessaire sur la composition de la pâte broyée qui entre dans le malaxeur et pour atteindre un effet optimal, il existe des projets plaçant un équipement infrarouge proche (NIR) à l'entrée de la pâte qui

permettra de connaître l'humidité et le contenu gras. De cette façon, et avec l'utilisation de produits comme de l'eau ou du talc, on pourra obtenir la texture et la rhéologie appropriées pour avoir une bonne préparation de la pâte.

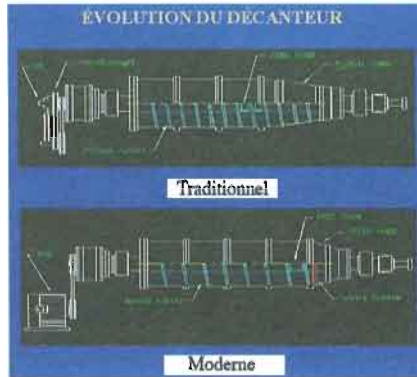
Pendant le processus de malaxage, dont la durée est d'environ une heure en fonction de la capacité de travail du décanteur, la pâte est en contact avec l'air. Ceci provoque une certaine modification de la composition et des caractéristiques organoleptiques de l'huile à cause de l'oxydation due à l'action de quelques enzymes endogènes qui se trouvent dans la graine et dans la pulpe. Pour pallier ces effets, on utilise des malaxeurs inertes. Les huiles obtenues, de catégories différentes, dépendent de l'état des olives à l'origine et de leur degré d'inertie.



Cette modification est assez récente et exige une étude plus large en fonction des variétés et des procédés pour avoir une connaissance plus approfondie de l'influence de ce paramètre sur la qualité de l'huile. Étant donné que l'intérieur du malaxer présente des difficultés pour un nettoyage périodique et considérant que cette situation peut donner lieu à des modifications des huiles à cause des processus de fermentation, on est en train d'adopter des systèmes de nettoyage sémi-automatiques pour résoudre ce problème.



Aujourd'hui, en Espagne, la séparation solide-liquide se fait à 99% par centrifugation, à 94% via deux sorties ou phases et à 6% via trois sorties ou phases. Heureusement, le système de pression est testimonial et il n'est présent que dans de petites installations. L'équipement de base du processus de centrifugation est le décanteur centrifuge horizontal ou décanteur. Dernièrement, il a évolué en augmentant la longueur de la zone cylindrique et en diminuant la zone conique.



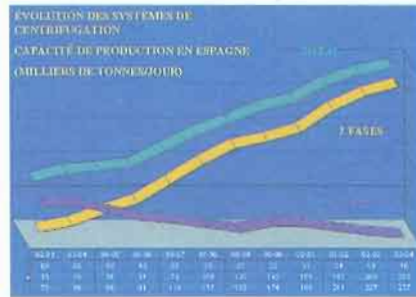
De cette façon, on a réussi à améliorer l'effet de séparation des phases, en plus de certaines modifications de la vis intérieure comme, par exemple, les différents passages d'hélices et le disque de rétention situé avant la sortie de la phase solide. L'adoption d'un variateur de la vitesse différentielle dans le décanneur permet de travailler sous des conditions très variables en fonction de la fluidité, du contenu en humidité, du contenu en huile de la pâte, ainsi que du nombre et de l'état des phases que l'on veut séparer.



L'installation dans les plans de centrifugation de systèmes de contrôle et d'automatisation a permis au rythme d'alimentation et de séparation d'être presque constant, ce qui permet d'améliorer l'efficacité et l'efficacité de la séparation par centrifugation.



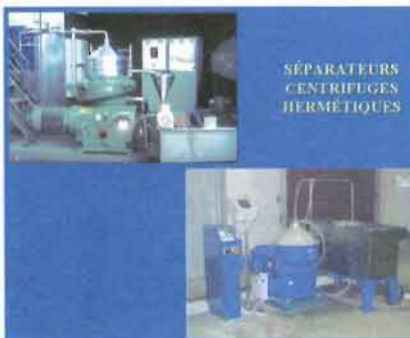
Le graphique suivant indique l'évolution du système à deux phases dès son début jusqu'à aujourd'hui, ainsi que la capacité de production quotidienne avec les systèmes de centrifugation.



Un autre système adopté a été le procédé d'une seconde centrifugation en continu. Ce système est nécessaire quand, afin d'obtenir des huiles de haute qualité, on décide de faire un malaxage à une température inférieure et/ou d'utiliser la pâte d'olives dénoyautées à des rythmes élevés d'alimentation. Dans ces cas, le contenu en huile des pâtes centrifugées est élevé et celles-ci doivent subir, en continu, un nouveau processus de malaxage et de séparation dans un autre décanteur. Avec ce procédé, l'huile obtenue en seconde centrifugation présente, en général, des caractéristiques d'huile lampante et son niveau d'altération dépend de la qualité des olives d'origine et des conditions du deuxième malaxage.

Aujourd'hui, dans les processus de séparation liquide-liquide, les séparateurs centrifuges verticaux sont employés, presque exclusivement, pour l'huile. Ces séparateurs évoluent vers une alimentation fermée afin d'éviter l'aspiration et l'occlusion d'air dans l'huile pendant la centrifugation.

Les séparateurs pouvant modifier l'anneau de réglage avec une commande externe sans arrêter le rotor, ainsi que les séparateurs qui font l'élimination des boues de forme intermittente, commencent à se répandre.



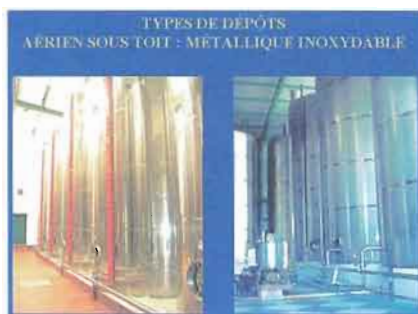
Pour améliorer l'efficacité de ce processus, en fonction d'une alimentation homogène et constante, on utilise des doseurs d'huile-eau et des régulateurs de la température de l'eau de lavage qui ne doit pas être inférieure à 35°C.



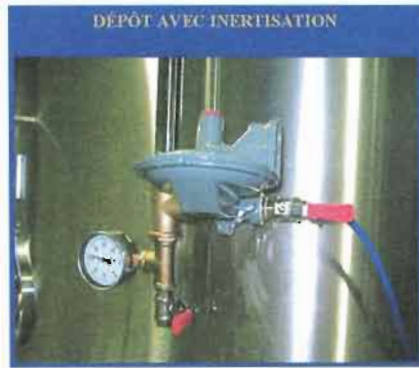
Couramment, l'huile obtenue à partir des séparateurs passe par des décanteurs où, dans un délai de 24-48 heures, on élimine l'air piégé par la centrifugation. Une fois l'huile refroidie et décantée, on retire les impuretés flottantes et on la classe en fonction de son acidité et de ses caractéristiques organoleptiques de production avant de passer au cellier.

Les celliers ont évolué vers des nefs adjacentes et séparées de la zone d'élaboration, équipées de parements verticaux et horizontaux isolants, avec des systèmes de chauffage et, dans certains cas, avec le conditionnement de l'air.

60% des installations possèdent des cuves en acier inoxydable d'une capacité unitaire de 50 tonnes, dont 80% possèdent un fond incliné et le reste un fond conique. En général, tous ces types de cuves possèdent un système automatique de nettoyage intérieur.



En général, avant de commencer la production d'huile, on établit des groupes de cuves en fonction des quantités et des différentes qualités qu'on espère obtenir. L'objectif n'est autre que d'obtenir un classement consciencieux de la production. Actuellement, on a commencé à rendre inerte l'ensemble des cuves consacrées au stockage des huiles de haute qualité et le système de gestion des mouvements d'huile dans le cellier s'est généralisé.



Toute l'évolution technologique mise en œuvre durant cette décennie a permis de consolider l'intérêt et la disponibilité du secteur huilier espagnol à améliorer non seulement la production d'huile vierge, mais aussi à augmenter notamment la qualité. En général, le secteur offre aux consommateurs une grande variété d'huiles vierges de qualité, sélectionnées à partir de la production mono-variétale et des ensembles multi-variétaux où l'objectif est de réussir l'harmonie de sensations olfacto-gustatives équilibrées que la nature nous offre dans les fruits de l'olivier.

Co-compostage des boues riches en polyphénols issues du traitement des margines

Nozha ABID¹, Fathi ALOUI¹, Abdelhafidh DHOUB¹, Michel PENNINCKX²
& Sami SAYADI¹

¹ Laboratoire des Bio-procédés, Centre de Biotechnologie de Sfax (CBS), B.P. «°K°», 3038, Sfax, Tunisie

² Université Libre de Bruxelles, UPEM, Belgique
Auteur correspondant, courriel: sami.sayadi@cbs.mrt.tn

1. INTRODUCTION

Plus de 30 millions de m³ de margines sont produites chaque année à travers le monde pendant une courte période de 4 mois (Casa *et al.*, 2003). Les margines contiennent de fortes charges organiques et sont toxiques particulièrement à cause de leur richesse en composés phénoliques (Sayadi *et al.*, 2000). Pour cette raison, plusieurs traitements physico-chimiques (décantation, coagulation, floculation, ultrafiltration, évaporation,...) ou biologiques (fermentations aérobie et anaérobie) ont été mis en œuvre pour le traitement et la détoxification des margines. Ces traitements engendrent des quantités importantes de boues valorisables. Le Centre de Biotechnologie de Sfax a développé un procédé de traitement des margines à l'échelle préindustrielle. Ce procédé génère des boues riches en polyphénols.

Dans ce travail, on s'est proposé d'étudier l'évolution des paramètres d'humification et de stabilisation de ces boues par co-compostage avec des déchets agricoles et d'évaluer les exigences du processus pour une détoxification adéquate et une transformation des composés phénoliques. L'optimisation du compostage a été réalisée dans des réacteurs à l'échelle laboratoire.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

Au cours de ce travail, on a utilisé des composteurs mis au point au laboratoire. Il s'agit de réacteurs cylindriques en PVC d'une capacité de 5 litres munis d'une aération forcée et humidifiée. À la sortie, les effluents gazeux sont recueillis dans des flacons étanches contenant une solution d'acide borique pour piéger l'azote ammoniacal et une solution de soude pour piéger le CO₂. Le programme de température suivi reproduit l'évolution classique de température observée dans les composts en tas (Godden *et al.*, 1983).

Le pH et la conductivité électrique ont été mesurés dans l'extrait aqueux du compost 1/10 (p/v). Les éléments majeurs (Ca, Mg, K,...) ont été déterminés par absorption atomique après incinération de l'échantillon puis attaque acide des cendres. La concentration en polyphénols hydrosolubles a été déterminée selon la méthode de Folin & Ciocalteu (1927). La phytotoxicité a été déterminée par mesure de l'indice de germination des graines de *Lepidium sativum* (Zucconi *et al.* 1981).

3. RÉSULTATS

Une étude d'optimisation des différents substrats agricoles utilisés pour le compostage a permis de choisir les grignons et les déchets d'amandes comme agents structurants et les fientes de volailles comme source d'azote. Dans une étape suivante, on a procédé à l'optimisation du taux d'incorporation des boues. Pour cela, quatre mélanges contenant 25%, 35%, 50% et 65% de boues ont été compostés après correction de l'humidité (50%-55%) et du rapport C/N (30).

3.1. Évolution des différents paramètres physico-chimiques au cours du compostage

3.1.1. pH et conductivité électrique (CE)

Au cours du compostage, le pH augmente pendant la phase thermophile dans tous les composts (Figure 1) pour atteindre des valeurs supérieures à 8 et ce, suite à l'hydrolyse de la matière azotée et à la génération du NH_4^+ . À la fin de cette phase, les valeurs de pH diminuent progressivement, ce qui se traduit par une tendance à la maturation du compost.

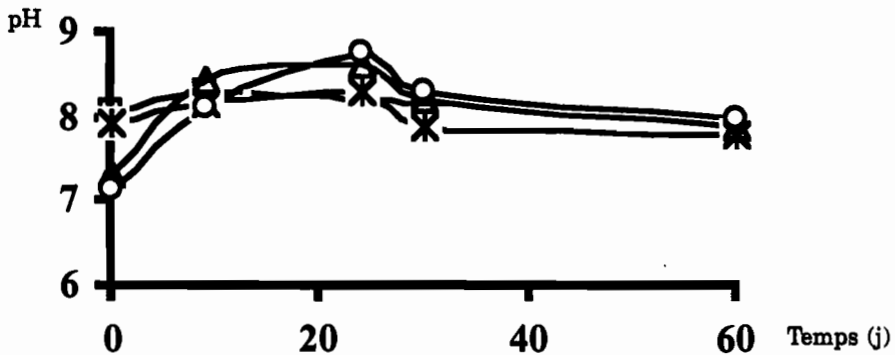


Figure 1. Évolution du pH dans les composts contenant -- 25%; -*- 35%; -Δ- 50% et -○- 65% de boues

Concernant la conductivité électrique, elle diminue progressivement au cours du processus et atteint des valeurs inférieures à 3 mS/cm dans les quatre composts (Figure 2) qui est la limite supérieure recommandée par la norme belge (V.L.A.C.O. 1995). Ceci pourrait s'expliquer par le phénomène d'immobilisation des minéraux au sein des acides humiques formés.

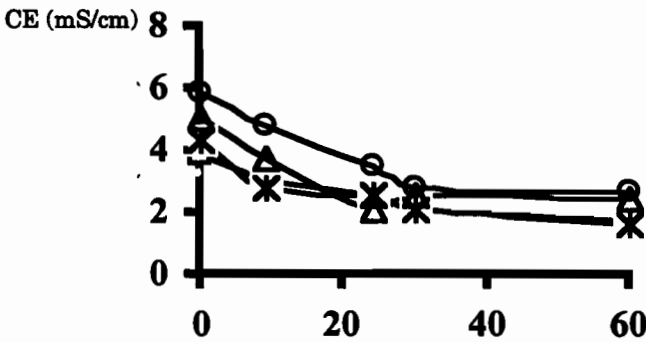


Figure 2. Évolution de la CE dans les composts contenant - - 25%; -* 35%; -▲- 50% et -○- 65% de boues

3.1.2. Cycle d'azote

Au cours du processus de compostage, les pertes d'azote dues à la volatilisation de l'ammoniaque (Figure 3) ont été enregistrées essentiellement pendant la phase thermophile suite à l'élévation du pH. Ces pertes ne dépassent pas 20% dans tous les composts. Elles sont relativement faibles par rapport aux valeurs (50%) enregistrées par Witter & Lopez (1987). Ceci serait dû à la richesse des composts en substances ligno-cellulosiques qui joueraient un rôle important dans la réduction des pertes en azote (Paredes *et al.* 1996).

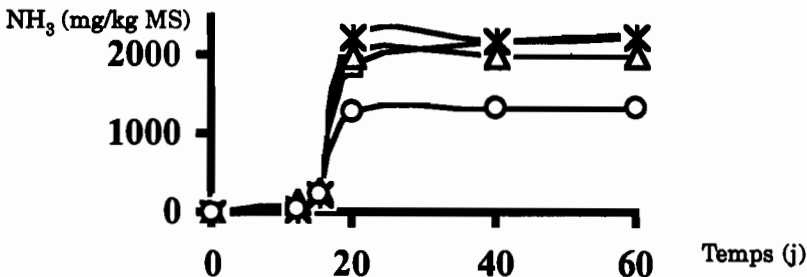


Figure 3. Évolution des pertes en azote dans les composts contenant - - 25%; -* 35%; -▲- 50% et -○- 65% de boues (MS: Matière sèche)

Le taux d'azote total augmente avec la même allure de 1 à 1,6% dans tous les composts (Figure 4). Ce résultat est en accord avec les travaux de Paredes *et al.* (2002) et peut être dû à la diminution du taux de matière sèche suite à la minéralisation de la matière organique (Viel *et al.*, 1987) et également à l'immobilisation de l'azote dans les protéines microbiennes. Le rapport $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ final considéré comme un indice de maturation est supérieur à 1 dans les quatre cas.

3.1.3. Polyphénols

Les taux initiaux et résiduels des polyphénols hydrosolubles sont proportionnels à la quantité des boues incorporée dans les mélanges de départ (Figure 5). Un taux moyen de diminution des polyphénols de 68% a été enregistré dans tous les composts. Ceci suggère que les polyphénols pourraient jouer le rôle de précurseurs pour la synthèse

d'autres molécules plus stables et moins toxiques comme les acides humiques (Sanchez-Monedero *et al.* 1999). En parallèle, l'indice de germination de *Lepidium sativum* correspondant aux 4 composts augmente de 0% à plus de 75% (Figure 6).

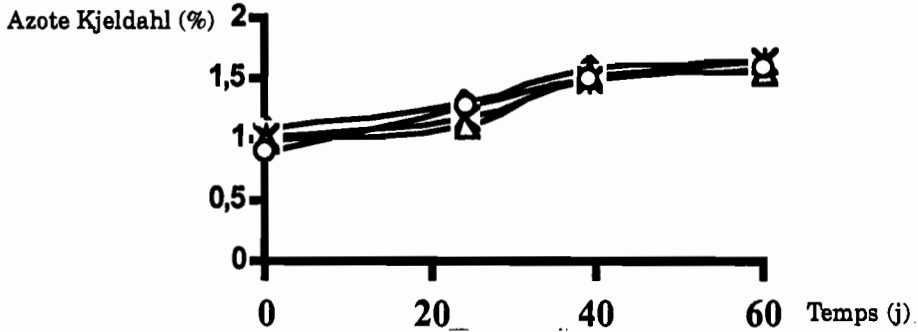


Figure 4. Évolution de l'azote Kjeldahl dans les composts contenant - - 25%; -* 35%; -Δ- 50% et -O- 65% de boues

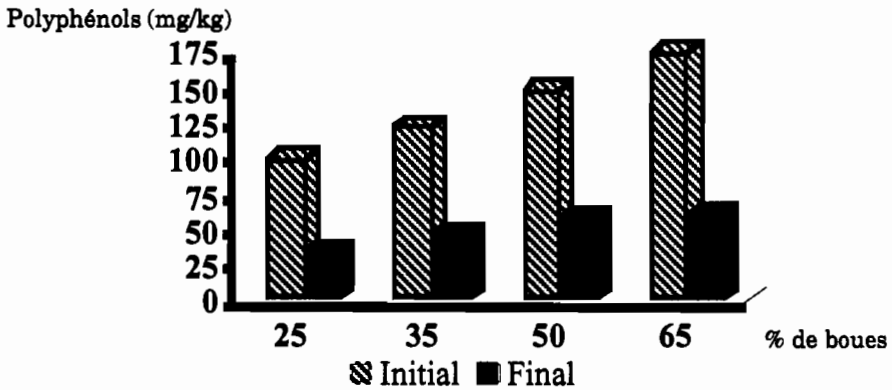


Figure 5. Évolution des taux de polyphénols dans les composts contenant 25, 35, 50 et 65% de boues

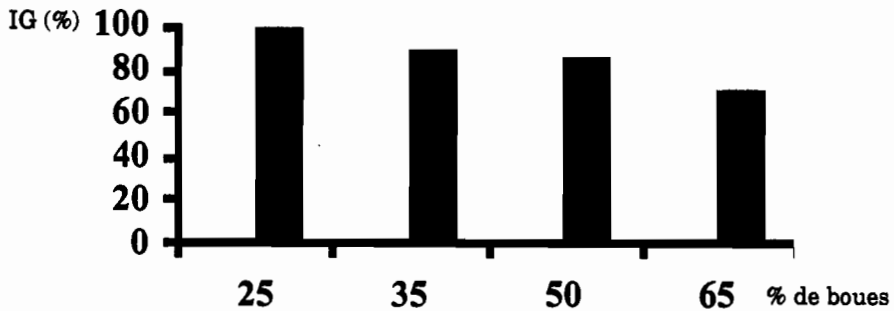


Figure 6. Indice de germination des composts matures contenant 25%, 35%, 50% et 65% de boues

3.1.4. Caractéristiques physico-chimiques

Les caractéristiques des composts matures sont regroupées dans le tableau 1. Les taux de la matière organique y sont inversement proportionnels aux quantités de boues utilisées dans les mélanges. Tous les composts obtenus sont riches en éléments fertilisants (N, P, K) et en éléments secondaires (Mg, Fe). Les teneurs en métaux (Cu et Zn) et en métaux lourds (Ni, Cd, Cr) respectent les normes européennes.

Tableau 1. Paramètres physico-chimiques des composts matures

	C1	C2	C3	C4	Normes
NO ₃ ⁻ /NH ₄ ⁺ (%)	1.2	1.1	1.45	1.22	>1**
C/N	15.8	15.7	15.6	14.6	
MO (%)	48.6	40.8	34.5	25	>20**
P ₂ O ₅ (%)	2.9	2.11	1.8	1	-
K ₂ O (%)	0.54	0.68	0.8	1.2	-
MgO (%)	0.45	0.56	0.61	0.64	-
Fe (g/kg)	50,5	81,74	100,3	122,65	-
Cu (mg/kg)	120	120	126	121.2	600**
Zn(mg/kg)	202	87	90	87	210-4000**
Ni (mg/kg)	46	75	90	35	20-4000**
Cd (mg/kg)	<1	<1	<1	<1	0.7-10**
Cr (mg/kg)	23	87	100	100	70-1200**

** Norme européenne (EC) (décembre 2000).

C1: Compost contenant 25% de boues; C2: Compost contenant 35% de boues; C3: Compost contenant 50% de boues; C4: Compost contenant 65% de boues.

4. CONCLUSION

Les boues de margines issues d'un traitement d'oxydation par électro-Fenton sont compostables en utilisant des déchets végétaux locaux comme agents structurants et substrats riches en azote. Une dégradation et une stabilisation des polyphénols sont obtenues même avec des proportions allant jusqu'à 65%. Les composts matures obtenus ne sont pas phytotoxiques. Ils sont riches en éléments fertilisants et en éléments secondaires.

Le compost renfermant 25% de boues présente le taux le plus élevé en matière organique finale, la quantité de polyphénols résiduelle la plus faible et le meilleur indice de germination.

5. REMERCIEMENTS

Ce travail a été financé par le projet de coopération AGCD-CIUF (Belgique) et Contrats Programmes Laboratoire des Bioprocédés (SERST, Tunisie).

6. RÉFÉRENCES CITÉES

- Casa R., D'Annibale A., Pieruccetti F., Stazi S.R. (2003) Reduction of the phenolic components in olive-mill wastewater by enzymatic treatment and its impact on durum wheat (*Triticum durum* Desf.) germinability. *Chemosphere* 50: 959-966
- Folin O., Ciocalteau U. (1927) On tyrosine and tryptofan determinations protein. *J. Biol. Chem.* 73: 627-650
- Godden B., Penninckx M. J., Pierard A., Lannoye R. (1983) Evolution of enzyme activities and microbial populations during composting of cattle manure. *Europ. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 17: 306-310
- Paredes C., Bernal M.P., Cegarra J., Roig A. (2002) Bio-degradation of olive mill waste water sludge by its co-composting with agricultural wastes. *Bioresource Technology* 85: 1-8
- Paredes C., Bernal M.P., Cegarra J., Roig A., Navarro A.F. (1996) Nitrogen transformation during the composting of different organic wastes. In: Van Cleemput O., Hofman G., Vermoesen A. (Eds.), *Progress in Nitrogen Cycling Studies*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 121-125
- Sanchez-Monedero M.A., Roig A., Cegarra J., Bernal M.P. (1999) Relationships between water-soluble carbohydrate and phenol fractions and the humification indices of different organic wastes during composting. *Bioresource Technology* 70: 193-201
- Sayadi S., Allouche N., Jaoua M., Aloui F. (2000) Detrimental effects of high molecular-mass polyphenols on olive mill wastewater biotreatment. *Process Biochemistry* 35: 725-735
- V.L.A.C.O (1995). Vlamse organisatie ter bevordering van de afzet van groenten fruit tuin en groencompost. *Aktiviteitenverslag VLACO, vzw, Mechelen, Belgium*-pp 29
- Viel M., Sayag D., Andre L. (1987) Optimisation of agricultural industrial wastes management through in-vessel composting. In: deBertoldi *et al.* M. (Eds.), *Compost: Production, Quality and use*. Elsevier Applied Science, Essex, pp. 230-237
- Witter E., Lopez-Real J. (1987) The potential of sewage sludge and composting in a nitrogen recycling strategy for agriculture. *Biol. Agric. Hortic.* 5: 1-23
- Zucconi F., Forte M., Monac A., Beritodi M. (1981) Biological evaluation of compost maturity. *Biocycle* 22: 27-29

Co-compostage des boues riches en polyphénols issues du traitement des margines

Les boues des margines issues d'un traitement d'oxydation par électro-Fenton ont été compostées avec des déchets agricoles dans des réacteurs de laboratoire. Les taux d'incorporation des boues utilisées sont de 25, 35, 50 et 65%. Au cours du compostage et dans tous les essais, le taux moyen de diminution des polyphénols a été de 68%. La stabilisation d'une fraction de polyphénols par polymérisation a été notée. L'indice de germination des graines de *Lepidium sativum* a augmenté d'au moins 75%. La conductivité électrique a diminué et a atteint des valeurs inférieures à 3 mS/cm. Le compost mature renfermant 25% de boue présente le taux le plus élevé en matière organique, la quantité de polyphénols résiduelle la plus faible et le meilleur indice de germination. Tous les composts obtenus sont riches en éléments fertilisants (N, P, K) et en éléments secondaires (Mg, Fe). Les teneurs en métaux (Cu et Zn) et en métaux lourds (Ni, Cd, Cr) respectent les normes européennes.

Impact des margines traitées et non traitées sur la microflore nitrifiante et des formes azotées du sol

Ali MEKKI, Abdelhafith DHOUIB & Sami SAYADI

Laboratoire des Bio-procédés, Centre de Biotechnologie de Sfax, BP: «K», 3038, Sfax, Tunisie

Auteur correspondant: Tel: 216 74 44 04 52; Fax: 216 74 44 08 18; courriel: sami.sayadi@cbs.rmt.tn

1. INTRODUCTION

Les margines, résidus liquides de l'industrie oléicole, sont caractérisées par leur haute charge polluante (DCO: 40-195 g/l) et leur richesse en composés phénoliques toxiques (3-24 g/l) (Sierra *et al.*, 2001). La production annuelle moyenne des margines dans les pays méditerranéens est de l'ordre de 30 millions de tonnes ce qui constitue une importante source de pollution (Sayadi & Ellouz, 1995). En Tunisie, la production moyenne des margines est de 500000 tonnes/an. Actuellement ces déchets sont déversés dans des bassins d'évaporation. Les études ont montré que l'application directe des margines non traitées modifie les propriétés du sol et contamine la nappe (Moreno *et al.*, 1987; Yesilada *et al.*, 1999). Le sol est un écosystème particulier dans lequel coexistent divers biotopes où se développent plusieurs réactions biochimiques (Gienfreda & Bollag, 1996). Ces réactions concernent les trois cycles les plus importants à savoir le carbone, le phosphore et l'azote (Kissi *et al.*, 2001). Dans le sol, l'azote coexiste sous diverses formes (minérale et organique, libre et adsorbée). Le recyclage de l'azote est assuré par l'activité biologique et biochimique du sol.

La forme oxydée (NH_4 , NO_2 , NO_3 , N_2) est réalisée par une véritable chaîne de micro-organismes (nitrifiants). La régénération de la forme organique est assurée par une large gamme de microorganismes. La nitrification et la dénitrification constituent les deux processus déterminants du cycle de l'azote. Ces deux processus fonctionnent de façon parallèle et réversible. La nitrification constitue la voie majeure où l'ammonium est oxydé de façon aérobie en nitrate. Ce phénomène est catalysé par deux enzymes majeures, l'uréase (qui donne l'ammonium par hydrolyse de l'urée), et l'ammonium oxydase (donnant le nitrate après oxydation de l'ammonium). Les germes nitrifiants sont réputés par leur sensibilité aux agents polluants. Un sol contaminé constitue un environnement limitant pour le développement normal de ces germes et, par conséquent, un déséquilibre du cycle de l'azote. Toutes les transformations biochimiques au sein du sol sont fonction des activités enzymatiques (Kissi *et al.*,

2001). Les enzymes impliquées dans la minéralisation de la matière organique peuvent être utilisées comme bio-indicateurs du potentiel métabolique du sol. L'uréase, l'ammonium oxydase et la nitrate réductase sont les enzymes impliquées dans le métabolisme azoté (Tscherko *et al.*, 2003). Dans cette étude on se propose de suivre le cycle de l'azote dans les sols irrigués avec les margines par le dosage de ses différentes formes et des activités enzymatiques impliquées.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. Incubation des sols

Le sol étudié est un sol sableux, riche en calcaire et à pH relativement alcalin (Tscherko *et al.*, 2003; Öhlinger, 1995). Des échantillons de 1 kg de sol sec sont incubés en présence de 100 ml de margines brutes (S_1) et de 400 ml de margines traitées (S_2). L'incubation est réalisée avec (S_1 (A), S_2 (A)) et sans (S_1 , S_2) correction du rapport C/N des margines suivant un rapport C/N/P = 100/5/1. La température est de 25°C. L'aération est assurée par brassage du sol tous les 2 jours et l'humidité est maintenue à 50% par pesée.

2.2. Matière sèche et contenu en eau du sol

La matière sèche et le contenu en eau du sol sont déterminés par différence de poids avant et après incubation à 105°C pendant 24 h (Öhlinger, 1995).

2.3. Demande chimique en oxygène

La demande chimique en oxygène est déterminée par la méthode de Knechtel (1978).

2.4. Demande biologique en oxygène (DBO_5)

La demande biologique en oxygène (DBO_5) est déterminée dans des conditions définies (incubation pendant 5 jours à 20°C et à l'obscurité). L'appareil utilisé est un respiromètre à DBO (BSB-controller Mortel 620T).

2.5. Matière organique

La matière organique volatile est déterminée par calcination à 600°C pendant un temps minimal de 2 heures (Sierra *et al.*, 2001).

2.6. Carbone organique total (COT)

Le carbone organique total est déterminé à l'aide d'un analyseur multi N/C 1000, type analytic jena.

2.7. Acidité (pH) et conductivité électrique (CE)

Le pH est déterminé à l'aide d'un pH-mètre METLER TOLEDO MP 220. La conductivité électrique est mesurée à l'aide d'un conductimètre CONSORT.

2.8. Azote total Kjeldahl (N.T.K)

La méthode de Kjeldahl a été appliquée (Kandeler, 1995).

2.9. Dosage de l'ammonium

L'azote ammoniacal est déterminé suivant la méthode de Kandeler (1995).

2.10. Azote organique

L'azote organique est déterminé par différence entre l'azote total Kjeldahl et l'azote minéral.

2.11. Germes totaux

Les germes aérobies mésophiles totaux sont déterminés sur milieu PCA dans des conditions standards. Les boîtes sont ensemencées en masse et incubées à 30°C pendant 48 heures.

2.12. Germes ammonium oxydant

Pour dénombrer les germes ammonium oxydant un milieu de culture purement minéral est utilisé (Trolldenier, 1995).

2.13. Respirométrie

Les échantillons de sol ont été incubés à 25°C dans des jarres de Mazon étanches. Le CO₂ produit est absorbé par le NaOH et quantifié par titration avec l'acide sulfurique (Öhlinger, 1995).

2.14. Dosage de l'uréase et de l'ammonium oxydase

Pour déterminer l'activité uréase, un échantillon de sol est incubé pendant 2 h à 37°C en présence de l'urée comme substrat. L'extraction de l'ammonium formé se fait par une solution de potassium. La réaction du salicylate de sodium avec le NH₃ en présence de dichloroisocyanurate de sodium et sous pH alcalin forme un complexe de coloration verte. Le nitroprusside de sodium utilisé comme catalyseur augmente la sensibilité de la méthode de 10 fois. L'ammonium formé est dosé par colorimétrie à 690 nm (Kandeler, 1995).

La détermination de l'activité ammonium oxydase est basée sur l'utilisation du chlorure d'ammonium (NH₄Cl) comme substrat. L'incubation du sol en présence du NH₄Cl pendant 24 heures et à 25°C génère le nitrite (NO₂). Le nitrite réductase est inhibé par addition de 2-4-dinitrophénol. Le nitrite formé est extrait par une solution de chlorure de potassium et déterminé par colorimétrie à 520 nm (Kandeler, 1995).

3. RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

3.1. Caractéristiques des margines

Les margines brutes (MB) utilisées dans cette étude sont issues d'un système d'extraction à chaîne continue. Elles sont caractérisées essentiellement par leur pH acide, leur rapport C/N élevé, et leur grande teneur en polyphénols. Les margines issues du procédé de traitement par digestion anaérobie (MT) ont un pH alcalin, une conductivité électrique assez élevée et un rapport C/N faible. Leur charge polluante est relativement faible. Par rapport aux margines brutes la teneur en polyphénols passe de 7,8 à 0,6 g/l (Tableau 1).

Tableau 1. Caractéristiques moyennes des margines

Paramètres	MB	MT
pH (25°C)	4,9	9,04
CE (dS/m).....	7,4	12,3
DCO/DBO ₅	2,63	2,01
COT (g/l)	10,6	2,61
NT (g/l).....	0,31	0,17
C/N	34,2	15,6
Polyphénols totaux (g/l).....	7,8	0,6
Germes totaux (10 ³ .ufc/m ²)	650	30

3.2. Évolution de la matière organique

Le sol étudié est pauvre en éléments fertilisants et sous climat aride. L'épandage des margines brutes à 100 m³/ha. an (100 ml/kg de sol) et des margines traitées à 400 m³/ha.an (400 ml/kg de sol) apporte la même quantité de matière organique au sol. Cependant la forte teneur en composés toxiques rend la matière organique des margines brutes difficilement biodégradable. En effet, les sols recevant les margines traitées présentent un potentiel de biodégradation 3 fois plus grand que celui des sols recevant les margines brutes. La correction du rapport C/N permet d'accélérer cette biodégradation pour les sols irrigués (Figure 1).

M.O (g/100 g sol sec)

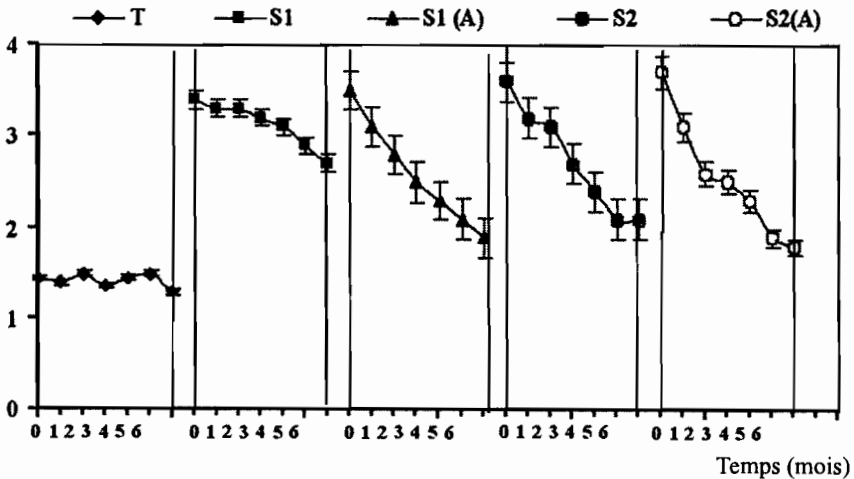


Figure 1. Évolution de la matière organique des sols

3.3. Évolution des formes azotées du sol

L'apport des margines en azote reste négligeable devant les autres éléments comme le carbone et le potassium. Le sol irrigué avec les margines traitées présente une teneur en azote total deux fois plus importante que le sol recevant les margines brutes. Le contenu en azote total du sol reste pratiquement constant au cours du temps. La minéralisation de l'azote organique est plus importante dans le cas des margines traitées.

Cette minéralisation se traduit par une ammonification plus intense pour les marges traitées, moins importante pour les marges brutes et pratiquement nulle pour le sol témoin. La correction du rapport C/N/P initial améliore cette minéralisation (Figures 2a & 2b).

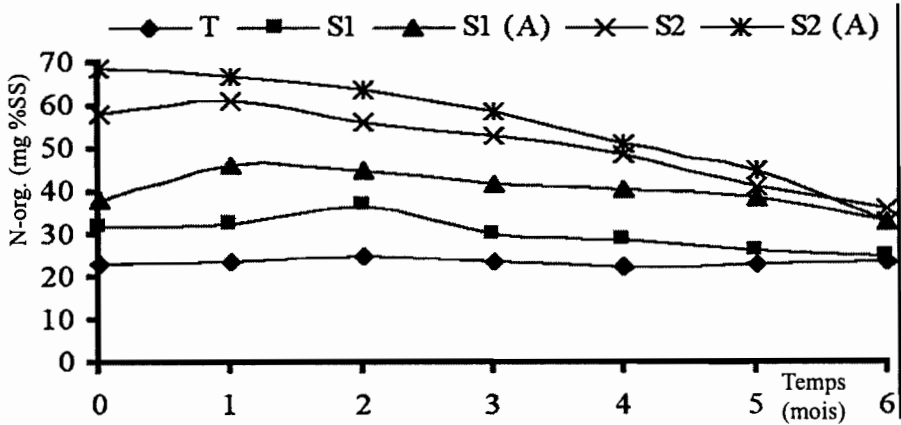


Figure 2a. Évolution de l'azote organique des sols en fonction du temps d'incubation

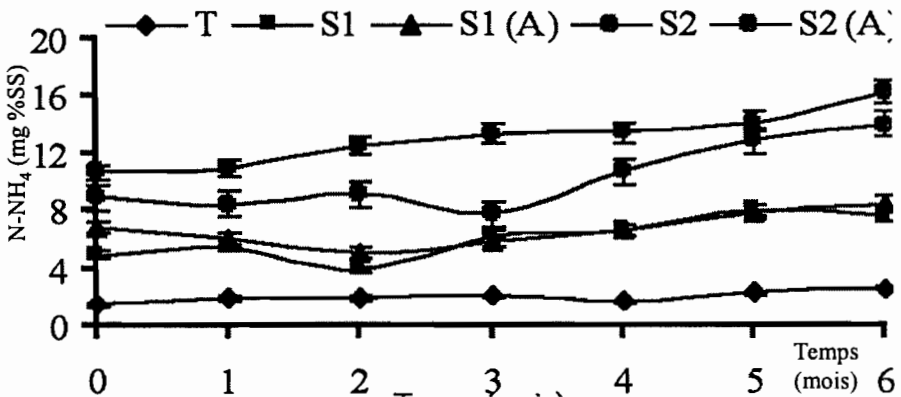


Figure 2b. Évolution de l'azote ammoniacal des sols en fonction du temps d'incubation

3.4. Germes ammonium oxydants

Les germes ammonium oxydants constituent le premier maillon dans la chaîne des micro-organismes nitrifiants. En effet, ces germes assurent l'oxydation de l'ammonium en nitrite puis ce sont les germes nitrite oxydants qui prennent la relève. Le nombre des germes (ammonium oxydant) augmente de manière significative dans les sols irrigués aux marges. Cette augmentation est enregistrée jusqu'au 4^{ème} mois après épandage, puis une diminution est notée. Ceci pourrait être expliquée par la diminution du contenu du sol en matière organique azotée (Figure 3).

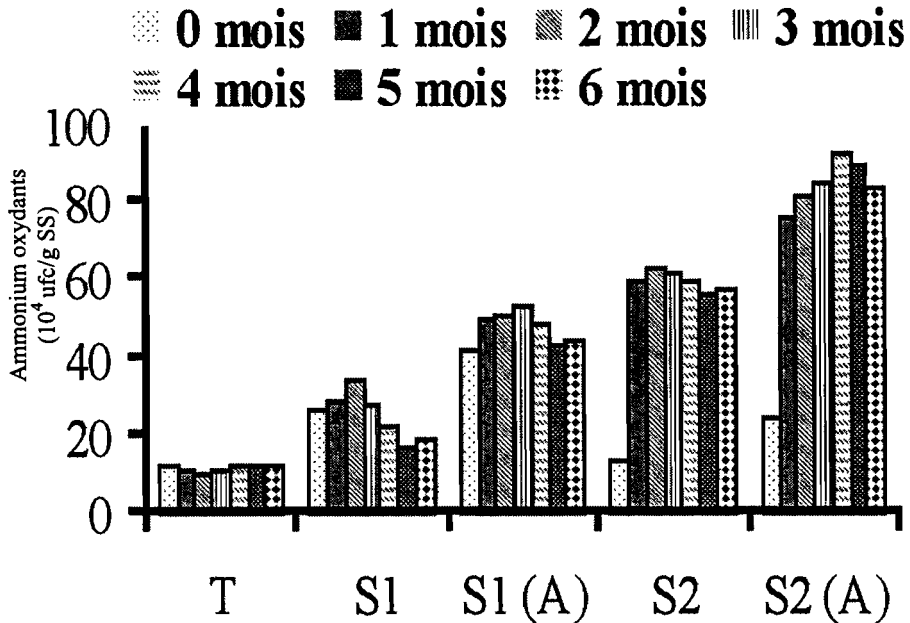


Figure 3. Évolution du nombre des germes ammonium oxydant

3. 5. Uréases et ammonium oxydases

La nitrification est assurée par deux enzymes majeures, l'uréase et l'ammonium oxydase. L'uréase joue un rôle clé dans le cycle de l'azote, elle contribue à la transformation de l'azote organique (urée, acides aminés, protéines) en azote ammoniacal assimilable. L'activité uréase dans le sol peut être extracellulaire ou intracellulaire (Gienfreda *et al.*, 1995).

L'ammonium oxydase est l'enzyme clé de la nitrification. Cette enzyme assure la transformation du produit de l'ammonification en azote assimilable par les plantes à savoir les nitrates.

Ces deux enzymes sont nettement stimulées dans les sols irrigués aux marges traitées. En fonction du temps d'incubation, l'activité uréase est presque linéaire pour les sols recevant les marges traitées. Elle est relativement faible dans le cas des marges brutes et pratiquement constante pour le sol témoin.

L'activité ammonium oxydase est constante pour le sol témoin et le sol recevant les marges brutes. Dans le cas des marges traitées, cette activité augmente jusqu'au 3^{ème} mois après épandage puis elle se stabilise.

Ceci semble être dû à la chute des germes ammonium oxydants 4 mois après l'ajout des marges (Figures 4a & 4b).

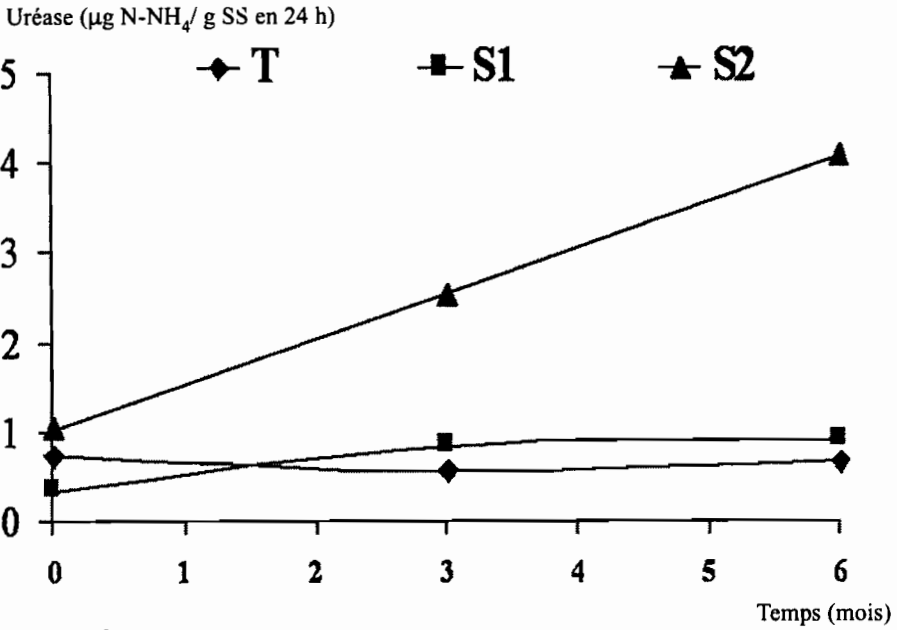


Figure 4a. Évolution de l'activité uréase des sols

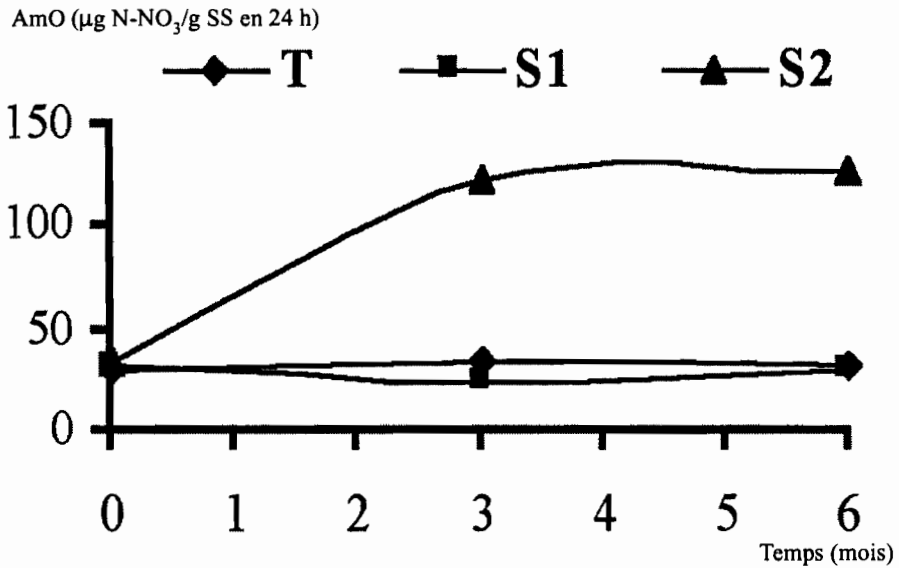


Figure 4b. Évolution de l'activité ammonium oxydase des sols

3. 6. Respirométrie

Les micro-organismes jouent un rôle clé dans le recyclage des nutriments dans le sol. Ce travail microbien se traduit entre autres en activité respiratoire. Le sol témoin

initialement pauvre en matière organique montre une activité respiratoire très faible. L'apport de la matière organique améliore cette activité. Cependant, dans le cas des margines brutes, malgré un apport important en matière organique, l'activité respiratoire reste faible. Par contre, les sols incubés en présence des margines traitées montrent une importante activité respiratoire (Figure 5).

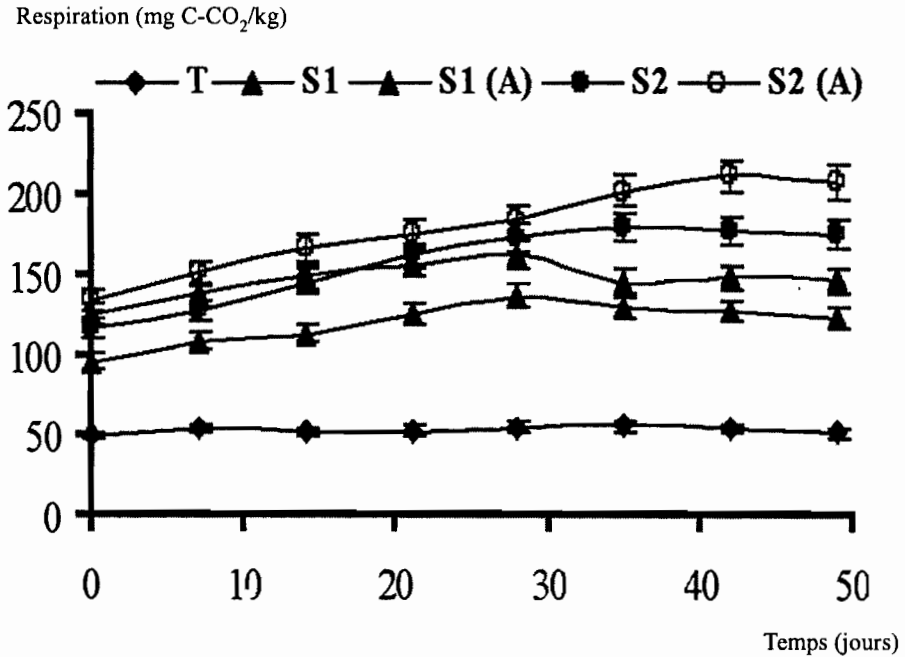


Figure 5. Respiration spécifique des sols incubés en fonction du temps

4. CONCLUSION

La richesse des margines en éléments fertilisants permet leur utilisation en ferti-irrigation agricole. C'est une solution potentielle de valorisation et de dépollution. Cependant, leur application à l'état brut modifie les propriétés du sol et contamine la nappe. Un traitement préliminaire est donc nécessaire pour limiter l'impact négatif sur le milieu récepteur.

Au centre de Biotechnologie de Sfax (Tunisie), le procédé de traitement des margines génère des eaux moins toxiques. L'utilisation de ces eaux en fertiirrigation améliore le pool organique du sol, apporte de l'azote bioassimilable et stimule la nitrification.

5. REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé dans le cadre du projet Inco-med: « Mediterranean usage of biotechnological treated effluent water » ICA3-CT-1999-00010.

6. RÉFÉRENCES CITÉES

- Gienfreda L. & Bollag J.M. (1996) Influence of Natural and Anthropogenic Factors on Enzyme Activity in Soil. *Soil Biochemistry* 9.
- Gienfreda L., De Cristofaro A., Maria A., Rao & Violante A. (1995) Kinetic Behavior of Synthetic Organo-and Organo-Mineral-Urease Complexes. *Soil Science Society of America Journal* 59, (May-June).
- Kandeler E. (1995) Total nitrogen. In: Schinner F., Öhlinger R., Kandeler E., Margesin R. (Eds.). *Methods in soil biology*. Springer, Berlin, pp. 406-408.
- Kissi M., Mountadar M., Assobhei O. & Gargiulo E. (2001) Roles of two white-rot basidiomycete fungi in decolorisation and detoxification of olive mill waste water. *Applied Microbiology Biotechnology* 57: 221-226.
- Knechtel R.J. (1978) A more economical method for the determination of chemical oxygen demand. *Water Pollut Control* (May/June), 25-29.
- 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.
- Öhlinger R. (1995) Soil respiration by titration. In: Schinner F., Öhlinger R., Kandeler E., Margesin R. (Eds.). *Methods in soil biology*. Springer, Berlin, pp. 95-98.
- Sayadi S. & Ellouz R. (1995) Roles of lignin peroxidase and manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* in the decolorization of olive mill wastewaters. *Applied Environmental Microbiology* 61: 1098-1103.
- Sierra J., Marti E., Montserrat G., Cruanas R. & Garau M. A. (2001) Characterization and evolution of a soil affected by olive oil mill wastewater disposal. *The Science of the Total Environment* 279: 207-214.
- Trolldenier G. (1995) Nitrifiers by MPN method. In: Schinner F., Öhlinger R., Kandeler E., Margesin R. (Eds.). *Methods in soil biology*. Springer, Berlin, pp. 32-36.
- Tscherko D., Bölter M., Beyer L., Chen J., Elser J., Kandeler E., Kuhn D. & Blume H-P. (2003) Biomass and enzyme activity of two soil transect at King George Island, Maritime Antarctica; Arctic, Antarctic, and Alpine Research 35: 34-47.
- Yesilada E., Özmen M. & Yesilada Ö. (1999) Studies on the toxic and genotoxic effect of olive oil mill wastewater. *Fresenius Envir Bull* 8: 732-739.

Impact des margines traitées et non traitées sur la microflore nitrifiante et des formes azotées du sol

L'incidence de l'épandage des margines brutes et traitées sur les formes azotées du sol a été réalisée. Les sols irrigués aux margines brutes présentent des teneurs faibles en azote total et en azote ammoniacal (N-NH₄). Par rapport au sol témoin une légère augmentation des germes nitrifiants a été observée. L'importante teneur en composés toxiques apportés par les margines brutes diminue l'assimilation de l'azote par la microflore du sol. Le procédé de traitement des margines, élaboré au Centre de Biotechnologie de Sfax, génère des eaux à faible charge polluante (DCO = 4 g/l; polyphénols = 0,6 g/l; C/N = 15), potentiellement utilisable en ferti-irrigation. L'azote apporté par ces eaux présente une minéralisation rapide dans le sol, ce qui se traduit par une augmentation des germes ammonium oxydants et des activités uréase et ammonium oxydase par rapport au sol témoin. La correction préliminaire du rapport C/N/P des margines améliore le potentiel métabolique des sols.

Mots-clés: Margines - Sol - Azote - Germes nitrifiants - Minéralisation

Incidence of treated and untreated olive mill wastewater on the soil nitrogen

Incidence of crude and treated olive mill wastewater (OMW) amendment on the soil nitrogen was studied. Compared to control, soils amended with crude OMW show low levels of total and ammoniacal nitrogen (N-NH₄). High levels of toxic compounds brought by crude OMW decreased nitrogen assimilation by the soil microflora. A process developed by the «Centre de Biotechnologie de Sfax» based on anaerobic digestion produced treated wastewater of a good quality which could be used in ferti-irrigation. The biological treated OMW has a low content of pollutants (COD = 4 g/l; polyphenols = 0.6 g/l; C/N = 15). Nitrogen brought by these residues was rapidly mineralized in the soil. This phenomenon was accompanied by an increase of ammonium oxydants microflora and urease and ammonium oxydase activities.

Keywords: Olive mill wastewater - Soil - Nitrogen - Nitrifiers - Mineralization

Electro-Fenton oxidation of olive mill wastewater phenolic compounds

Sonia KHOUFI¹, Michel PENNINCKX² & Sami SAYADI¹

¹ Laboratoire des Bioprocédés, Centre de Biotechnologie de Sfax; B. P. «K», 3038 Sfax, Tunisia

² Université Libre de Bruxelles, UPEM, Belgium

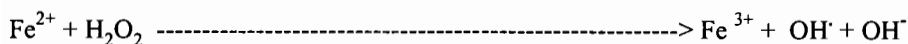
Auteur correspondant; courriel: sami.sayadi@cbs.mrt.tn

1. INTRODUCTION

Treatment and disposal of olive mill wastewater represents one of the main problems for olive oil producing countries of the Mediterranean area. Tunisia is one of the largest olive oil producers in the world with an average annual production of 450 000 tonnes, the by-product of which is 600 000 m³ OMW. These liquid residues are 400 times more heavily loaded with pollutants than ordinary domestic wastewater. This effluent can cause severe environmental problems related to its high chemical oxygen demand (COD) together with elevated polyphenols concentration and deep color content. Treatment of OMW still presents a problem, which has not been solved today. Many pollution disposal methods, such as concentration, evaporation, incineration, ultra-filtration, lime precipitation, aerobic treatment, anaerobic digestion, lagooning, co-digestion etc were tested but none of them led to industrial application.

The clear advantages of anaerobic digestion of the material make it the process of choice (Borja *et al.*, 1992). However, many problems concerning the high toxicity and inhibition of biodegradation of these effluents have been encountered during anaerobic treatments, because some bacteria, such as methanogens, are particularly sensitive to the organic contaminants present (Andreoni *et al.*, 1984). The phenolic compounds, especially, severely limit the possibility of using anaerobic digestion (Sayadi *et al.*, 2000). Therefore the elimination of phenolic compounds from OMW is an important objective in order to reduce its toxicity and to permit the occurrence of microbial fermentation. More promising seems to be the alternative based on a physico-chemical pre-treatment carried out to remove the toxic compounds of OMW (Beccari *et al.*, 1999).

In recent years there has been increasing interest in the use of electrochemical technologies for the treatment of wastewaters. In addition, hydrogen peroxide has been widely used as an oxidant in advanced oxidation process to decompose refractory or toxic wastewaters. As indicated in reaction (Borja *et al.*, 1992), when the ferrous ion reacts with hydrogen peroxide it will generate strong oxidant hydroxyl radicals (OH[•]).



This $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ system, often referred to as Fenton's reagent, has dual function of OH^\cdot radical peroxidation as well as ferrous/ferric coagulation. During this process the non-biodegradable organics and toxic pollutants present in the wastewaters such as polyphenols are usually destroyed by direct or indirect anodic oxidation via the production of oxidants such as hydroxyl radicals and complexes coagulants that promote the flocculation of the matter (Israilides *et al.*, 1997; Panizza *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2002).

In this context, we have proposed the electro-Fenton process ($\text{Fe}^{3+}/\text{H}_2\text{O}_2$) to reduce toxicity of OMW polyphenolic compounds. Experiments were performed to investigate the effects of hydrogen peroxide dosage and current density on COD, color and monomers removal by electro-Fenton reaction.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. OMW fraction characterization

Fresh OMW were obtained from an olive oil continuous processing plant located in Sfax (southern Tunisia). The low molecular-mass phenolics were selectively fractionated using ultra-filtration on a poly-sulfone 2 kDa cut-off membrane. OMW fraction (pH=4.7; COD=30 g.l⁻¹) contained 1500 mg.l⁻¹ of phenolics monomers. The composition and concentration of monomers in the fraction were determined using HPLC equipped with a C18-column (Figure 1). As about the COD, it was estimated using the method described by Knechtel (1978) and fading color was monitored by measuring the absorbance at 395 nm, the length of the maximum absorbance using a spectrophotometer (Anthlie Advanced 5 Secomam).

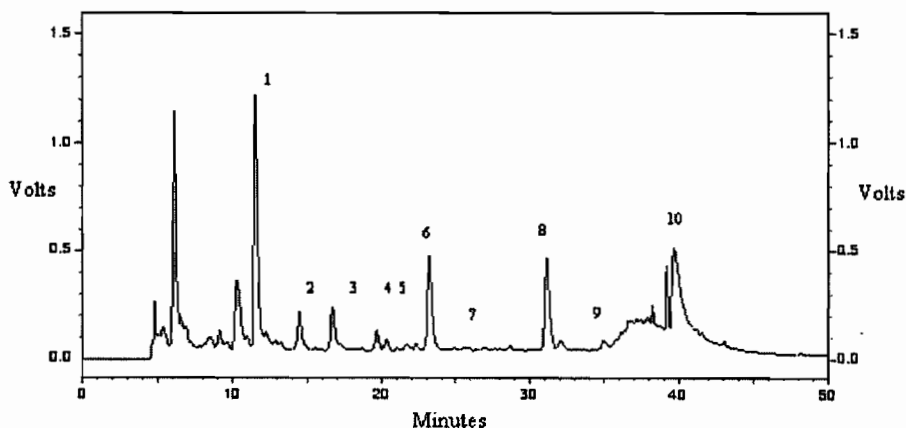


Figure 1. C18-HPLC chromatogram of phenolic compounds present in OMW fraction.
 1: Hydroxytyrosol; 2: 3, 4 dihydroxyphenyl acetic acid; 3: Tyrosol; 4: p-OH benzoïc acid; 5: p-OH phenylacetic acid; 6: Vanillic acid; 7: Cafeic acid; 8: p-Coumaric acid; 9: Vanillin; 10: Ferulic acid

2.2. Electro-Fenton reaction

Experiments were carried out in 250 ml glass reactor with a 200 ml of low molecular mass OMW fraction (Figure 2). The reactants were homogenised by magnetic agitation to avoid concentration gradients. The electrolysis reactor is formed by one pair of anodic and cathodic electrodes (cast iron plates) which are positioned approximately 1.5 cm apart from each other and were dipped in the OMW fraction. The total effective surface area of electrodes was 20 cm². The current input was supplied by a convergy power supply. In the test runs, a desired amount of H₂O₂ chosen between 0.5 and 1.5 g.l⁻¹ was added to the electrolytic cell before the electrical current was turned on. The electro-Fenton reaction lasted usually approximately 4 hours. During the experiments, samples were withdrawn and immediately analysed for water quality measurements. It is noted that during the electrolysis treatment of the OMW fraction, a certain amount of iron was continuously dissolved into the wastewater from the cast iron anodes, as governed by the Faraday's law (Pletcher & Walsh, 1990).

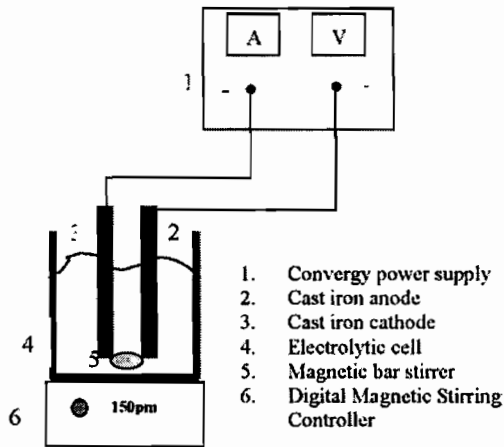


Figure 2. Schematic representation of the electro-Fenton process at laboratory scale

2.3. Bioluminescence toxicity test

A luminescent bacteria *Vibrio fischeri* LCK 480, which emits light naturally, was used for measuring bioluminescence inhibition. Percentage inhibition of luminescence was determined according to El-Alawi *et al.* (2002) using a lumistox Dr lange apparatus.

3. RESULTS AND DISCUSSION

Before treatment the pH of OMW fraction was adjusted to 4.0, as optimum value for Fenton's reaction. In this study effects of operating factors, such as current density and H₂O₂ amounts on the pollutant characteristics of the OMW fraction, were investigated.

3.1. The effects of current density

A number of different reaction regimes were used to determine the optimum conditions for decreasing the toxicity of the OMW low molecular fraction.

Table 1 presents the effects of current density on the pH and the removal of color, COD and polyphenolic compounds when the OMW fraction is treated with a H_2O_2 dosage of 1 g.l^{-1} and during 4 hrs of reaction.

The data obtained clearly show that the pH of the treated OMW as well as the COD and the color removal increase with the current density and that the effect is much more pronounced for the color than the COD. Contrarily to this, the increase of current density from 1.25 to 7.5 A.dm^{-2} does not increase monomer removal efficiencies significantly. Moreover, the monomer removal efficiency is already very ($> 81\%$) at the lowest current density tested.

Table 1. Effect of current density on the coloration, COD and monomers removals and pH of OMW fraction in the presence of 1 g.l^{-1} of H_2O_2 and during 4 hours of electro-Fenton reaction

	pH	Color removal	COD removal	Monomers removal
1.25 A/dm^2	9.2	25.6%	18.2%	81.2%
3.75 A/dm^2	11.6	53.8%	22.5%	87.6%
7.5 A/dm^2	11.9	69.7%	26.5%	87.8%

3.2. The effect of hydrogen peroxide dose

Figure 3a-b-c presents the effect of hydrogen peroxide dose on the removal of COD, color and monomer for the electro-Fenton reaction at a current density of 7.5 A.dm^{-2} . It is noticed in Figure 3a that, COD removal increase with the time of treatment. After 4 hours of treatment the removal efficiencies of COD were 21.4%, 26.5% and 27.5% in the presence of 0.5; 1 and 1.5 g.l^{-1} , respectively. It is shown here that the amount of H_2O_2 does not improve significantly the COD removal and also the color removal (Figure 3b). It is also worth mentioning that in electro-Fenton reaction the color intensity in the first 30 min increases and was probably due to the polymerisation of monoaromatics. However, this subsequently decreased to 39.5%, 53.1% and 64% at current density of 1.25, 3.75 and 7.5 A.dm^{-2} , respectively after 4 hours as a result of the coagulation and rapid sedimentation of highly polymerised polyphenolic compounds. This is confirmed by the increasing of the concentration of total suspended solids (TSS) over the 4 hours period of the reaction which finally reached 25 g.l^{-1} (Figure 3d). Figure 3c shows the removal of total monoaromatic compounds when the H_2O_2 doses are varying. As observed from this figure, when the H_2O_2 dose is increased from 0.5 to 1.5 g.l^{-1} the total monomers removal increases from 76% to 98%. The maximum removal of monomers (98%) was obtained in the presence of 1

g.l^{-1} . It is further noticed here that the effect of H_2O_2 was insignificant when its concentration exceeded 1 g.l^{-1} . As summary of the results obtained during the electro-Fenton treatment of OMW fraction at different current density and doses of H_2O_2 , the optimum results were registered in the case of electro-Fenton treatment with 1 g.l^{-1} H_2O_2 at current density of 7.5 A.dm^{-2} .

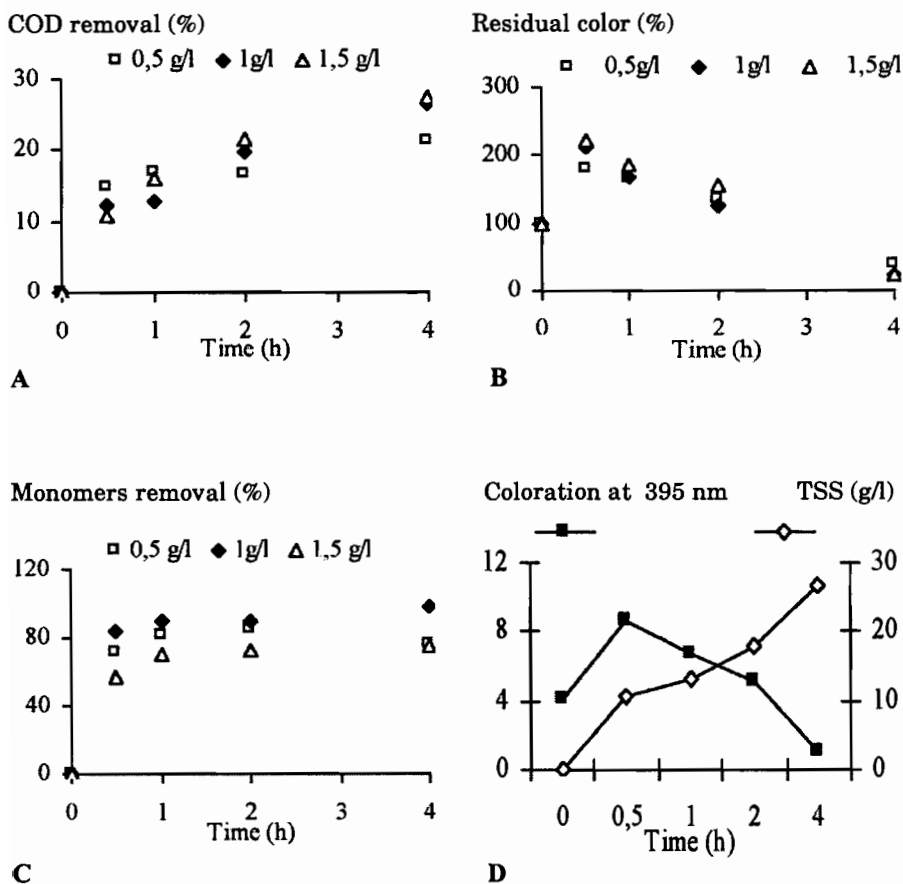


Figure 3. Effect of hydrogen peroxide dose on COD (A), color (B) and monomers (C) removals and evolution of coloration and TSS ($\text{H}_2\text{O}_2 = 1 \text{ g.l}^{-1}$) (D) during the electro-Fenton reaction of OMW fraction at current density of 7.5 A.dm^{-2} .

The reactant collected during the Fenton reaction at 30 min (Figure 4, TF1) was found to be toxic but the sample collected at the end of the electrolysis stage at 4 hours (Figure 4, TF2) was found not to be toxic based on the *Vibrio fischeri* LUMISTox test. HPLC analysis confirmed the removal of most of the low molecular-mass phenolics with a concomitant decrease in toxicity to 67% after 30 min (TF1) and to 28% at 4 hours incubation (TF2).

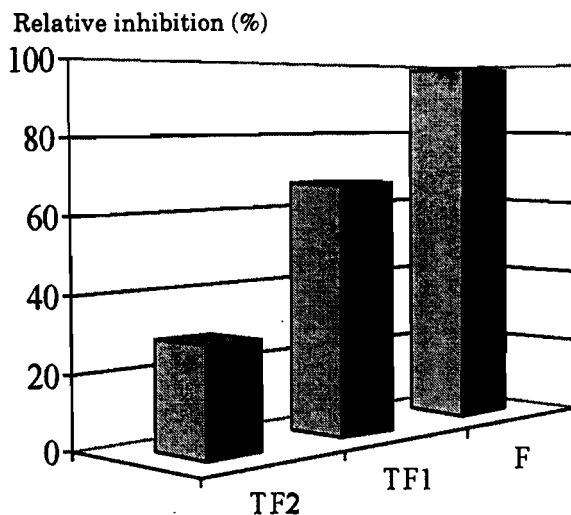


Figure 4. Relative toxicity of OMW fraction before (F) and after electro-Fenton treatment using the *Vibrio fischeri* LUMISTox test
 TF1 and TF2 reactants collected during the Fenton reaction at 30 min and 4 hours of incubation, respectively.

4. CONCLUSION

From the experiments run in laboratory scale, it can be concluded that the electro-Fenton treatment of OMW phenolic fraction in the presence of $1 \mu\text{g.l}^{-1}$ of H_2O_2 operating at 7.5 A.dm^{-2} is effective in the removal of COD and color intensity as well as decrease in the concentration of phenolic compounds and the level of toxicity.

Therefore the electro-Fenton oxidation can be used as pre-treatment for detoxification of OMW to maximize the effectiveness of anaerobic post-treatment.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by C.I.U.F. (Belgium) and Contrats Programmes Laboratoire des Bioprocédés (SERST, Tunisia).

6. REFERENCES

- Andreoni V, Ferrari A, Ranali G & Sortini C (1984) The Influence Of Phenolic Acids Present In Oil Mill Waters On Microbial Groups For The Methanogenesis. In Proc. *Of Inter. Symp. On olive by-products valorization FAO*, Spain, 5-7 March 1984.

- 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. Technol.* 40: 347-355
- Borja R, Martin A, Maestro R, Alba J & Fiestas JA (1992) Enhancement Of The Anaerobic Digestion Of OMW By The Removal Of Phenolic Inhibitors. *Proc. Biochem.* 27: 231-237
- Chen X, Chen G & Yue PL (2002) Novel Electrode System For Electroflotation Of Wastewater. *Environ. Sci. Technol.* 36(4): 778-783
- El-Alawi YS, McConkey BJ, Dixon DG & Greenberg BM (2002) Measurement of Short- and long-Term Toxicity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Using Luminescent Bacteria. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 51, 12-21.
- Israilides CJ, Vlyssides AG, Mourafeti VN & Karvouni G (1997) Olive Oil Wastewater Treatment With The Use Of An Electrolysis System. *Biores. Technol.* 91: 163-170
- Knechtel RJ (1978) A More Economical Method For The Determination Of Chemical Oxygen Demand.. *Wat. Pol. Contr.* 25-9 May /June, 1978.
- Panizza M, Bocca C & Cerisola G (2000) Electrochemical Treatment Of Wastewater Containing Polyaromatic Organic Pollutants. *Wat. Res.* 34(9): 2601-2605
- Pletcher D & Walsh FC (1990) *Industrial Electrochemistry*, 2nd ed. Chapman and Hall, London, UK.
- Sayadi S, Allouche N, Jaoua M & Aloui F (2000) Detrimental Effects Of High Molecular Mass Polyphenols On Olive Mill Wastewater Biotreatment. *Process Biochem.* 35: 725-735

Electro-Fenton oxidation of olive mill wastewater phenolic compounds

Olive mill wastewater (OMW) is a powerful pollutant. It can cause severe environmental problems related to its high chemical oxygen demand (COD) together with elevated polyphenols concentration and deep color content. This work studied, on a laboratory scale, the possibility of reducing the polluting load of OMW through an electrochemical process named electro-Fenton oxidation. Experiments were performed to investigate the treatment of OMW fraction mainly containing high concentration of recalcitrant and toxic phenolics of low molecular masses. The influence of hydrogen peroxide (H_2O_2) concentration and current density on pH, decoloration and on the removal of COD and polyphenols were studied. Results indicated that COD and polyphenol removal efficiencies of 26.5 and 87.8% respectively, were obtained in the presence of 1 g.l^{-1} of H_2O_2 working at a constant current density of 7.5 A.dm^{-2} . Moreover, a sensible decrease of coloration (69.7%) was detected. These results suggest the use of electro-Fenton oxidation as a pre-treatment stage for detoxification of OMW before anaerobic post-treatment.

Keywords: Electro-Fenton - Olive mill wastewater - Polyphenols

Distribution écologique des champignons filamenteux thermophiles isolés à partir des principales

Maâsra du Maroc

Khadija LAMRANI ¹, Mustapha ISMAILI-ALAOUI ¹, Mostafa CHEHEB ¹,
Nizar KAMMAS ¹, Lotfi IRAQI HOUSSAINI ¹, Hicham HASSOUNI ¹,
Bernard RIO ², Moussa ETTALIBI ³ & Sevastianos ROUSSOS ²

¹ Laboratoire des Bioconversions, Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, BP. 6202-Instituts, Madinate Al Irfane, 10101 Rabat, Maroc

² IRD, Biotrans R-185, IMEP, Boite 441; FST Saint Jérôme, Université Paul Cézanne, F-13397, Marseille cedex 20, France

³ Département de Biochimie, Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, BP. 6202-Instituts, Madinate Al Irfane, 10101 Rabat, Maroc

Auteure, correspondante: lamranikhadija@hotmail.com

1. INTRODUCTION

Les champignons représentent un ensemble très hétérogène. Les individus occupent toutes sortes d'habitats. L'intérêt économique des champignons filamenteux repose sur leur capacité à produire une grande diversité de molécules. Cette caractéristique a pour conséquence une grande diversité biochimique (Boiron, 1996). Les recherches sur les champignons filamenteux thermophiles (CFT) ont déjà acquis un grand intérêt, principalement pour la production d'enzymes thermostables utilisés dans des procédés industriels (Maheshwari *et al.*, 2000). Les CFT sont caractérisés par des vitesses de croissance élevées. Ceci suppose que la biosynthèse des produits issus de leur métabolisme serait particulièrement rapide (Cordova, 1998; Cordova *et al.*, 2003).

Le Maroc offre des biotopes très différenciés (désert, mer, montagnes, ...), ce qui le rend très riche en biodiversité où la sélection s'est faite le plus naturellement possible. L'olivier constitue, au Maroc, la principale essence fruitière tant par le nombre d'arbres existants que par l'importance sociale de sa culture. Il est présent dans des aires écologiques très différentes.

La production d'olives est destinée à la transformation en huile. Le reste est réservé à la consommation directe sous forme d'olives de table. La trituration des olives a lieu dans des moulins traditionnels appelés Maâsra (Loussert, 1986).

Le nombre des Maâsra (Photo 1 et Photo 2) est estimé à 16 000 unités (MAMVA, 1997) concentrées dans deux régions principales: la zone des plateaux (Fès, Meknès et Taza) et la zone des plaines intérieures avec principalement les régions de Tadla et du Haouz de Marrakech.



Photo 1. Maâsra traditionnelle



Photo 2. Maâsra améliorée

En général, la culture des champignons est effectuée sur milieu solide (Carlile & Watkinson, 1996), ce qui correspond à leur habitat naturel de croissance (il y a très peu de champignons dans l'eau; par contre, les moisissures colonisent naturellement tous les substrats solides humidifiés) (Roussos, 1985). Les champignons filamenteux sont des eucaryotes présentant une structure mycélienne à organisation cœnocyttique (Alexopoulos *et al.*, 1996; Dix & Webster, 1995). Les CFT présentent des températures limites de croissance situées entre 20°C et plus 50°C. Quant aux champignons filamenteux thermotolérants, des températures inférieures à 20°C peuvent être tolérées (Cooney & Emerson, 1964; Crisan, 1973).

Pour mieux étudier la mycoflore des Maâsra du Maroc, on s'est fixé trois axes:

- La biodiversité des champignons filamenteux thermophiles (CFT) des Maâsras et d'autres biotopes afin de constituer une collection importante IAV-IRD.
- L'isolement, la purification, la description et l'identification de nouvelles souches de champignons filamenteux thermophiles et thermotolérants.
- L'étude des mécanismes physiologiques, biochimiques des souches sélectionnées en décrivant les besoins nutritionnels et les potentialités métaboliques de ces micro-organismes en vue de sélectionner des souches capables de produire des enzymes thermostables par fermentation en milieu solide et ce, en utilisant des grignons d'olives et/ou d'autres sous-produits de l'industrie agricole.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. Échantillonnage

Le prélèvement d'échantillons de différentes natures (sol, olives, grignons d'olives, brindilles, feuilles, ...) a été réalisé à partir des différentes Maâsra du Maroc. L'échantillonnage a été effectué dans différentes régions oléicoles et pendant trois campagnes oléicoles successives: 1999-2000; 2000-2001 et 2001-2002.

2.2. Collection des champignons filamenteux thermophiles et thermotolérants

Au cours de ce travail, environ 400 souches de champignons filamenteux thermophiles et thermotolérants ont été isolées à partir des Maâsra appartenant à différentes régions du Maroc. En outre, 12 souches de référence ont été utilisées, 6 souches provenant de

la collection internationale du CBS (CentraalBureau voorSchimmelcultures) et 6 souches de la collection du MNHN(Muséum National d'histoire Naturelle).

2.3. Milieux de culture et conditions d'incubation

Plusieurs milieux de culture ont été utilisés comme le montre le tableau 1. Le pH est ajusté à 5.6. La stérilisation est effectuée à 120°C pendant 20 min

Tableau 1. Composition des différents milieux de culture utilisés et conditions d'incubation des champignons filamenteux thermophiles et thermotolérants

Milieux de culture	Composition (g/l)	Incubation
Isolement	Grignons d'olive: 40, agar: 15, chloranphénicol:0,25 PDA, autres+chloranphénicol	50°C; 3 à 7 j
Identification	MEA (Malt Extract Agar) PDA(Potato Dextrose Agar)	30°C, 37°C & 45°C ; 7 j
Sporulation	PDA	30°C, 7 j
Thermophilie	Peptone,10; NaCl,5; CaCl ₂ ,0.1; agar, 20; tween 80, 10 ml PDA	(19°C, 25°C, 35°C,45°C, 55°C, 60°C) 3 à 10 j
Détection des estérases	Milieu thermophilie	35°C, 45°C, 3 à 7 j
Détection des phytases	L'acide phytique:10;KH ₂ PO ₄ :0,247 ; (NH ₄) ₂ SO ₄ : 6,6 ;CaCl ₂ :0,48 ;MgSO ₄ : 0.38;NaCl: 0,32 ; Agar: 20	35°C, 45°C, 3 à 7 j
Détection des tannases	L'acide tannique:4; KH ₂ PO ₄ :2,47; le reste idem	35°C, 45°C, 3 à 7 j

2.4. Isolement et entretien des souches

Pour l'isolement des souches thermophiles et thermotolérantes, la température d'incubation utilisée a été fixée à 50°C. Pour les différents milieux d'isolement, un antibiotique (chloramphénicol: 0,25 g/l) a été ajouté pour inhiber toute prolifération bactérienne.

Après isolement, plusieurs repiquages des souches sur milieu PDA (Potato Dextrose Agar) sont nécessaires avant d'obtenir une souche pure. Le choix des espèces à prélever est fait à l'œil nu, en tenant compte de la ressemblance des thalles.

Une fois que la souche est obtenue à l'état pur, elle est conservée de trois manières:

- dans des piluliers contenant du PDA;
- dans des petits piluliers contenant du sable sec et stérilisé à sec;
- sous azote liquide à -196°C.

2.5. Identification

L'étude des caractères cultureux et morphologiques des souches isolées a été réalisée en utilisant différentes clés d'identification et en les comparant à des souches de référence (Roquebert,1997).

2.5.1. Clés d'identification

Ont été utilisées:

- La clé de Raper & Fennel (1965,1977) pour l'identification des *Aspergillii*.
- La clé de Pitt (1979, 1998) pour l'identification des *Penicillii*.
- La clé de Cooney&Emerson (1964) pour l'identification des champignons filamenteux thermophiles (CFT).
- La clé de Schipper (1978) et de Schipper & Stalpers (1984) pour l'identification des *Mucor* et des *Rhizopus*.

2.5.2. Caractérisation des souches thermophiles

Pour ce faire, le milieu Hankin & Anagnostakis(1975) et le milieu Potato Dextrose Agar (39 g/l) ont été utilisés à différentes températures (19°C, 25°C, 35°C, 45°C, 55°C et 60°C). La croissance apicale a été déterminée par la vitesse de colonisation d'une surface solide suivant la relation:

$$Va \text{ moy} = \frac{D_{\max}/2}{\text{Temps}}$$

Va moy étant la vitesse de croissance apicale moyenne en mm/ heure et Dmax le diamètre en mm du dernier jour

2.5.3. Effet de la source de carbone

Le glucose, la caséine, l'amidon, la carboxyméthylcellulose (CMC), le saccharose, le tween 80, l'acide phytique et l'acide tannique ont été utilisés séparément comme unique source de carbone. La température d'incubation a été fixée à 50°C.

2.5.4. Détection sur milieu solide des activités enzymatiques

L'estérase et la tannase sont mises en évidence par la présence d'un halo clair, visible sur un fond noir. Cela correspond à la zone d'hydrolyse du substrat approprié. Pour les autres enzymes, elles sont mises en évidence par la croissance du champignon sur le milieu contenant le substrat correspondant.

2.6. Comptage des spores

Deux à trois gouttes d'une suspension de spores ont été inoculées dans des erlenmeyers de 250 ml contenant 50 ml de PDA en surfusion, puis incubés à 45°C pendant 5 à 7 jours. Les spores sont récupérées à la surface du milieu gélosé à l'aide d'un agitateur électromagnétique pendant environ 30 minutes, dans une solution de tween 80 (0.01%) pour l'obtention de $2 \cdot 10^7$ spores par gramme de substrat sec.

Pour le comptage proprement dit des spores, on utilise la cellule de Malassez sous microscopie optique. Pour cela, on effectue une dilution au $1/100^5$ à l'aide de l'eau tweenée précédente. Le comptage est valable lorsque le nombre de spores est compris entre 10 et 30 par champ de lecture. Les résultats sont exprimés soit en nombre de spores par ml de la suspension initiale, soit en nombre de spores par cm^2 . Pour les calculs on utilise la relation suivante:

$$N = n \cdot 10^5 \cdot F$$

N: nombre de spores par ml suspension initiale

n: nombre moyen de spores dans la cellule de comptage

f: facteur de la dilution (inverse de la dilution)

$$X = (N \cdot V) / S$$

X: nombre de spores par cm^2

N: nombre de spores par ml de la suspension initiale.

V: volume de la solution de tween 80 ajoutée en ml.

S: surface du milieu gélosé en cm^2

3. RÉSULTATS ET DISCUSSION

Ce travail a été focalisé sur l'isolement, l'identification et le dénombrement des champignons filamenteux thermophiles et thermotolérants dans leur habitat naturel.

3.1. Stratégie d'échantillonnage

Les prélèvements ont été méticuleusement opérés à partir des sites bien ciblés. L'opération consistait avant tout d'anticiper sur la réussite d'isolement des champignons filamenteux thermophiles. Aussi, a-t-on raisonné sur le fait que quantitativement la microflore serait importante si les prélèvements réalisés étaient à l'intérieur du tas, là où la vapeur issue des réactions exothermiques du métabolisme est visible. Concernant les 178 échantillons étudiés, ils diffèrent du point de vue nature (sol, grignons d'olive, feuilles, olives,...) et du point de vue origine.

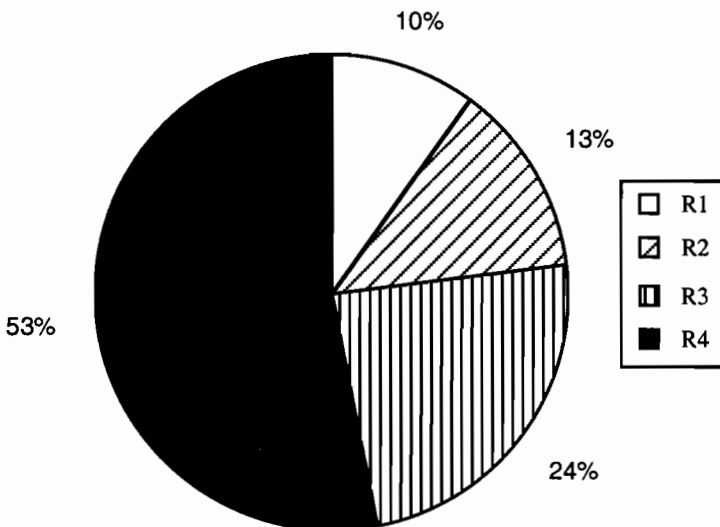


Figure 1. Origine des 178 échantillons prélevés à partir des Maâsra appartenant à différentes régions du Maroc

R1: Ouezzane, Chefchaouène; R2: Méknès, Khémisset; R3: Béni-Mellal, Fkih Bensalah; R4: Taroudant, Rich, Errachidia

3.2. Isolement

Pour l'isolement d'un champignon filamenteux quelconque, la première étape consiste à faire le choix de l'habitat du micro-organisme voulu (ex: CFT). La deuxième étape concerne la technique d'enrichissement. Celle-ci est réalisée en mettant un échantillon dans un milieu de culture sélectif en fixant les conditions d'incubation. L'objectif est d'obtenir un champignon filamenteux spécifique en culture pure (Scriban, 1993).

La stratégie d'isolement, à partir de 178 échantillons provenant de différentes zones du Maroc, a été planifiée comme suit:

- Pour favoriser la croissance des champignons thermophiles, plusieurs milieux d'enrichissement sélectifs ont été utilisés à 50°C (Photo 3).
- Pour purifier les différentes souches obtenues à partir d'un même échantillon, des repiquages successifs ont été réalisés sur un milieu d'enrichissement à base de PDA contenant un antibiotique spécifique, en l'occurrence le chloramphénicol (0,25g/ml).



Photo 3. Mélange d'espèces de CFT cultivées sur différents milieux après incubation à 50°C

Les souches purifiées sont conservées sur milieu d'entretien PDA en piluliers à 4°C. Pour la conservation longue durée, les souches sont enfouies dans du sable et sous azote liquide à -196°C.

3.3. Purification et conservation

Au cours de la purification, le repiquage repose sur le choix des espèces à prélever. Ceci doit tenir compte de la ressemblance des thalles d'après leurs caractères visibles à l'œil nu, à savoir:

- la couleur des spores;
- la couleur des thalles;
- la présence d'un pigment diffusant;
- la présence d'un organe de reproduction sexuelle;
- la présence ou non d'un exsudat;
- la vitesse de croissance apicale;
- l'aspect, le contour et le revers du thalle.

Par ailleurs tout détail quelconque est recherché pour différencier ou rapprocher deux thalles.

3.4. Identification

Cette identification a été réalisée selon différentes clés et en comparaison avec les souches répertoriées. Elle fait appel aux caractères cultureux et morphologiques de la souche à étudier.

Les caractères cultureux concernent la vitesse apicale, la texture, l'épaisseur, la couleur du thalle, la pigmentation de l'agar, la production d'exsudat et les odeurs des colonies.

Les caractères morphologiques comprennent les observations microscopiques suivantes:

- au niveau du mycélium: couleur, dimensions, ornementation des parois, mode de ramification, différenciation des thallospores, absence ou présence de cloisons.
- au niveau des organes différenciés: forme, couleur, dimensions, texture des parois, etc.

Botton *et al.* (1990) estiment le nombre de champignons à 50 000 espèces connues et considèrent qu'il en existe au moins autant à découvrir. Ces micro-organismes, d'une grande variété de formes et de structures, ont fait l'objet de classifications complexes (Tableau 2).

Tableau 2. Principaux groupes de moisissures à importance industrielle (Botton *et al.*, 1990)

Nom du groupe	Principaux caractères
Zygomycètes	Thalle à mycélium siphonné, sans ou à cloisons présentes seulement au niveau des appareils reproducteurs, Spores asexuées formées dans des sporocystes.
Ascomycètes	Thalle à mycélium cloisonné. Reproduction végétative généralement par conidies exogènes ou par fragmentation du mycélium. Spores sexuées formées dans des asques, en nombre défini.
Deuteromycètes	Thalle à mycélium septé. Pas de reproduction sexuée connue (ou reproduction sexuée peu fréquente)

3.4.1. *Identification de quelques espèces de champignons filamenteux thermophiles et thermotolérants*

Les souches sont ensemencées en duplicata sur MEA (Malt Extract Agar) et incubées, pendant une semaine, à deux températures 30°C et 37°C. Même lorsque les champignons récemment isolés se développent mieux à des températures élevées, les descriptions morphologiques doivent être faites sur des cultures réalisées à 30°C et à 37°C afin de pouvoir exploiter les clés d'identification existantes dans la littérature.

3.4.1.1. Identification du genre *Aspergillus fumigatus*

Ce filamenteux de la classe des Hyphomycètes appartient à la famille des Phialosporae. Il se caractérise par la formation d'organes de reproduction asexués: les kystes aspergillaires. Le conidiophore non septé, de longueur variable, présente un renflement à son extrémité (la tête conidienne).

Parmi les propriétés examinées, on distingue:

- La présence de filaments hyalins cloisonnés, ramifiés, de diamètre constant voire de kystes aspergillaires (rares mais caractéristiques) à l'examen direct.
- La culture avec apparition rapide, en 3 à 5 jours, de thalles d'aspect poudreux.
- Les filaments mycéliens septés, chevelus et vésiculeux.
- Une croissance rapide sur milieu PDA, sans chloramphénicol, ou sur milieu de Czapek.
- La surface de la colonie se colore en vert foncé puis en gris vert foncé.
- Les conidiophores verdâtres mesurent environ 300 µm de long.
- La tête conidienne claviforme (forme de massue) porte directement de nombreuses phialides (tête unisériée) disposées parallèlement à angle droit.
- Les conidies globuleuses à sub-globuleuses.

3.4.1.2. Identification du genre *Humicola*

Pour ce genre appartenant également à la classe des Hyphomycètes, deux espèces thermophiles ont été isolées: *Humicola lanuginosa* et *Humicola grisea*.

Les observations sont comme suit:

- Thalle hyalin puis virant au gris à brun - noir.
- Parfois diffusion d'un pigment.
- Hyphes sont septées et courtes.
- Phialides rares.
- Cellules fertiles courtes, hyalines ne formant qu'une seule spore à leur extrémité noire; ces spores ou conidies solitaires globuleuses à sub-globuleuses, le plus souvent lisses, sont aussi appelées Aleuriospores.

Humicola lanuginosa est caractérisée par des conidies globuleuses, noires, à paroi épaisse et verruqueuse. Pour sa part, *Humicola grisea* présente des conidies plus grosses, 12-17 µm de diamètre.

3.4.1.3. Identification de *Pæcilomyces variotii*

Pæcilomyces variotii appartient à l'ancienne classe des Deuteromycotina, actuellement Hyphomycètes. Les thalles de *P. variotii* sont à croissance habituellement rapide et sont blancs, jaunes, bruns, roses. Les conidiophores isolés ou en verticilles portent directement des phialides à base large, à col long, ou via des branches dont sont issues les conidies.

Parmi les propriétés examinées, on distingue:

- Des filaments mycéliens septès, hyalins de 3 à 5µm dont certains sont plus ou moins déformés dans les tissus.
- Une croissance rapide, un aspect poudreux,
- Une couleur brun pale à brun jaune.
- Un revers jaunâtre à brun foncé.
- Des conidiophores de 30 à 90 µm sur 3 à 7 µm portant 2 à 7 phialides.
- Certaines phialides sont solitaires, le long des hyphes.
- Des ramifications en verticilles plus ou moins irrégulières.

3.4.1.4. Identification du genre *Rhizopus*

Ce champignon appartient à la classe des Zygomycètes, ordre des Mucorales. Il est caractérisé par un mycélium luxuriant, des sporocystophores (sporangiophores) ramifiés vers le haut, formés soit sur des hyphes aériennes, soit sur des stolons avec, dans les deux cas, des rhizoïdes.

Parmi les propriétés examinées, on distingue:

- Des sporocystes multispores, globuleux, noirs, pourvus d'une collumelle, sans apophyse. la vitesse de la croissance apicale est extrêmement rapide surtout sur PDA à 45°C.

Rhizopus miehei, sur PDA, présente un thalle d'abord blanc puis gris. Il est caractérisé par le fait qu'il est homothallique et par des zygospores ne dépassant pas 50 µm.

3.5. Caractérisation physiologique

3.5.1. Recherche des champignons filamenteux thermophiles et thermotolérants

La température est un des facteurs environnementaux influençant la croissance des champignons. Pour le tester, les souches ont été incubées à 6 températures différentes: 19°C, 25°C, 35°C, 45°C, 55°C, 60°C (Tableau 3).

Les résultats montrent que les espèces isolées sont capables de se développer à différentes températures. *Aspergillus fumigatus* est la seule espèce qu'on peut considérer comme thermotolérante, car elle présente une croissance à 19°C. Les autres espèces sont thermophiles. Dans le cas de *Humicola lanuginosa*, *H. grisea*, *Thermoascus aurantiacus*, *Malbranchea sulferea* et *Myceliophthora thermophila*, il y a une croissance à 60°C. Ces CFT ont été fréquemment isolées au niveau des régions du sud (Errachidia, Rich,...)

Tableau 3. Croissance apicale (mm.h⁻¹) des différentes espèces en fonction de la température d'incubation

Espèces	19°C	25°C	35°C	45°C	55°C	60°C
<i>Aspergillus fumigatus</i>	0,17	0,27	0,31	0,40	0	0
<i>Humicola grisea</i>	0	0	0,46	0,47	0,25	0,05
<i>Humicola lanuginosa</i>	0	0	0,25	0,42	0,34	0,21
<i>Malbranchea sulfurea</i>	0	0,01	0,27	0,35	0,07	0,03
<i>Myceliophthora thermophila</i>	0	0,37	0,67	0,68	0,37	0,03
<i>Paecilomyces variotii</i>	0	0,03	0,65	0,47	0,45	0
<i>Rhizopus miehei</i>	0	0,41	0,77	0,89	0,45	0
<i>Thermoascus aurantiacus</i>	0	0	0,34	0,65	0,35	0,05

3.5.2. Effet de la source de carbone

Les souches ont été cultivées sur différents milieux où la source de carbone varie: glucose, tween 80, caséine, amidon, carboxyméthylcellulose (CMC), saccharose, acide phytique (MAP) et acide tannique (MAT). Il s'agit ici de mettre en évidence la capacité de ces souches à se développer sur ces différentes sources de carbone et de cribler indirectement la production des enzymes extracellulaires (Figure 2).

D'après la figure 2, toutes les souches semblent dégrader le glucose, l'amidon et la caséine. Les autres sources de carbone sont utilisées selon les espèces (Tableau 4).

Tableau 4. Croissance apicale (mm.h⁻¹) des différentes espèces isolées à partir des Maâsra, en fonction de différentes sources de carbone, l'incubation ayant lieu à 50°C pendant 7 jours

Espèces	Glucose	Saccharose	Amidon	Caséine	Tween	CMC	MAP	MAT
<i>A. fumigatus</i>	0,17	0,16	0,13	0,13	0,07	0,06	0	0,12
<i>R. miehei</i>	0,35	0	0,57	0,5	0,55	0,02	0,02	0
<i>H. lanuginosa</i>	0,27	0	0,3	0,29	0,27	0	0,07	0
<i>M. thermophila</i>	0,41	0,37	0,48	0,42	0,4	0,5	0,1	0
<i>T. aurantiacus</i>	0,27	0,29	0,27	0,28	0,23	0	0,04	0,03
<i>H. grisea</i>	0,12	0,11	0,13	0,12	0,02	0,19	0	0
<i>M. sulfurea</i>	0,27	0,2	0,01	0,32	0,12	0,08	0,01	0,01
<i>P. variotii</i>	0,15	0,17	0,17	0,18	0,12	0,15	0,1	0,01

Ces résultats montrent que les champignons thermophiles et thermotolérants sont capables de dégrader une variété de sources de carbone à 50°C. La croissance apicale varie selon l'espèce et même selon la souche. Ce qui est présenté dans le tableau 4 est la moyenne. Ainsi, au sein de la même espèce, qui est supposée utilisée une source de carbone donnée, on peut trouver des souches qui n'obéissent pas à cette règle. Aussi, a-t-on noté que la même souche change de couleur, d'aspect et de taille selon la source de carbone utilisée.

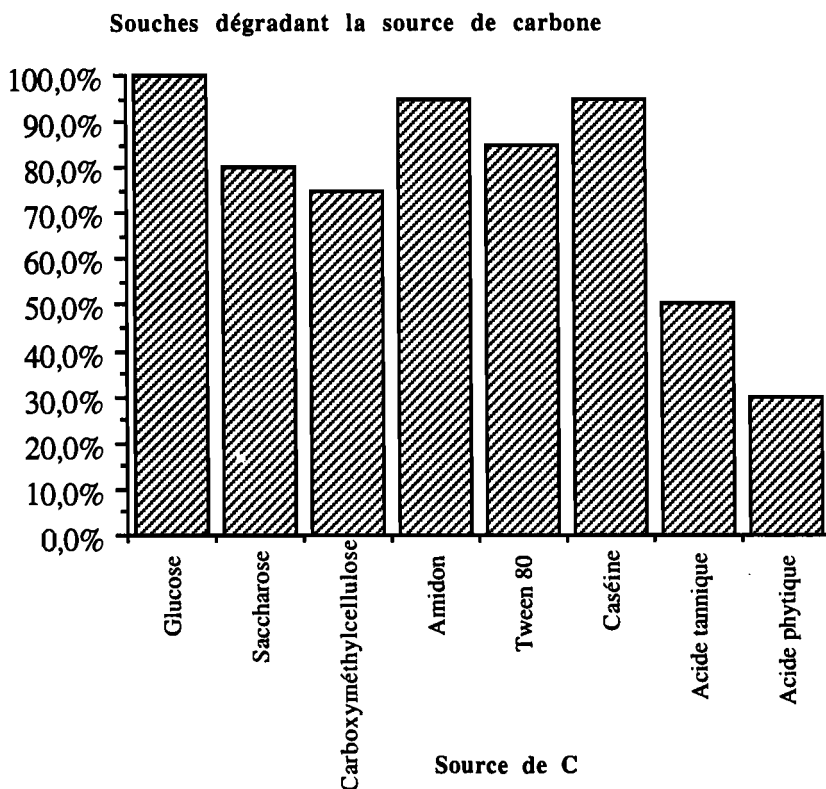


Figure 2. Pourcentage des souches isolées en fonction des différentes sources de carbone

3.5.3. Détection sur milieu solide des activités enzymatiques

Les techniques de criblage des micro-organismes, en vue de la production des enzymes, sont généralement effectuées sur des milieux liquides en agitation. Étant donné le grand nombre de souches à tester, on a adopté les techniques de détection des enzymes fongiques extracellulaires en culture superficielle suivant la méthode de Hankin & Anagnostakis (1975), qui sont peu lourdes et peu coûteuses, surtout pour la recherche de l'estérase.

Les résultats obtenus montrent que les CFT sont capables de produire des enzymes extracellulaires (Tableau 4) allant de l'amylase à la phytase en passant par la protéase, la cellulase, etc. Donc, les souches isolées sont capables d'hydrolyser et d'assimiler différents substrats comme unique source de carbone (en fonction de l'espèce) après incubation à 50°C. De ce fait, on peut suspecter la thermostabilité des enzymes mises en évidence.

Pour l'activité estérasique, le tween 80 a été utilisé comme substrat lipidique. En effet, les estérases hydrolysent mieux le tween que les autres lipides surtout en présence de *Rhizopus miehei* (Adams & Deploy, 1978).

3.6. Indice de sporulation

Les souches isolées ont présenté des indices de sporulation variables à une température d'incubation constante. La comparaison des moyennes de sporulation pour les différentes espèces a révélé un intervalle qui varie de $0,1 \cdot 10^7$ à $7 \cdot 10^7$ spores/cm².

4. CONCLUSIONS

Pour la première fois, l'étude de la biodiversité des champignons filamenteux thermophiles et thermotolérants a été consacrée aux Maâsra du Maroc.

97% des échantillons prélevés à partir des Maâsra contiennent des souches de champignons filamenteux thermophiles et thermotolérants. En moyenne, 100 souches ont été isolées par an depuis la campagne oléicole 1999-2000. Dans l'ensemble, ces souches appartiennent à 8 espèces différentes, sauf une neuvième qui est en cours d'identification.

Les souches des espèces *Aspergillus fumigatus* sont classées comme étant des champignons thermotolérants. Les espèces *Humicola lanuginosa*, *Humicola grisea*, *Malbranchea sulferea*, *Myceliophthora thermophila*, *Pæcilomyces variotii*, *Rhizopus miehei* et *Thermoascus aurantiacus* sont des champignons thermophiles, ces derniers étant fréquents dans la région sud du Maroc.

Les meilleures vitesses de croissance apicale ont été obtenues sur les milieux contenant, séparément, les protéines, les sucres simples, la cellulose et les lipides comme unique source de carbone et d'énergie. Par ailleurs, toutes les souches isolées présentent les activités enzymatiques suivantes: amylolytique, protéolytique et cellulolytique.

Aspergillus fumigatus, *Rhizopus miehei*, *Thermoascus aurantiacus*, *Myceliophthora thermophila* et *Humicola grisea* ont montré les indices de sporulation les plus élevés.

La caractérisation phylogénique des CFT est nécessaire pour confirmer leur taxonomie et pour identifier tous les métabolites primaires et secondaires.

Cette étude ouvre de nouvelles utilisations des champignons filamenteux thermophiles cultivés en fermentation en milieu solide en vue de la production d'enzymes fongiques et la valorisation des sous-produits agricoles (travaux en cours).

5. REMERCIEMENTS

Ce travail a été financé par la coopération bilatérale Franco-Marocaine: IRD, Marseille et IAV Hassan II, Rabat (Réf. PRAD 02/13) et par l'IRD-DSF (bourses de formation continue).

6. RÉFÉRENCES CITÉES

- Adams P.R. & Deploey J.J. (1978) Enzymes produced by thermophilic fungi. *Mycologia* 70: (4) 906-910.
- Alexopoulos C.J., Mims C.W. & Blackwell M. (1996) Fungal Systematics. in « Introductory Mycology ». John Wiley & Sons. New York, pp. 61-85.
- Boiron P. (1996) Organisation et biologie des champignons. Nathan, 126 p
- Botton B., Breton A., Fèvre M., Guy Ph., Laprent J.P., Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y. & Veau P. (1990) Les moisissures utiles et nuisibles: importance Industrielle. Masson, Paris. 512 p.
- Carlike M.J. & Watkinson S.C. (1996) The fungi as a major group of organisms. In "The fungi". Academic Press. London. 1-7.
- Cooney G.D. & Emerson R. (1964) Thermophilic fungi. W.H. Freeman and Company, San Francisco & London. 3-28 .
- Cordova J., Roussos S., Baratti J., Nungaray J. & Loera O. (2003) Identification of Mexican thermophilic and thermotolerant fungal isolates. *Micologia Aplicada Internacional* 15 (2): 37-44.
- Cordova Lopez J.A. (1998) Isolement, identification et physiologie des champignons thermophiles en vue de la production de lipases par fermentation en milieu solide. Thèse de doctorat. Université Montpellier II. 243 p. et 4 annexes.
- Crisan E.V. (1973) Current concepts of thermophilism and thermophilic fungi. *Mycologia*. 65: 1170-1198.
- Dix N.J. & Webster J. (1995) Structure and fungal communities. In « Fungal Ecology ». Chapman & Hall. London. 39-84.
- Hankin L. & Anagnostakis S.L. (1975) The use of solid Media for Detection of Enzyme Production by fungi. *Mycologia* 67: 597-607.
- Loussert R. (1986) Les aires écologiques de l'olivier au Maroc. *OLIVAE* 18: 32-35.
- Maheshwari R., Bharadwaj G. & Bhat M.k. (2000) Thermophilic fungi: Their physiology and enzymes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64(3) 461-488.
- MAMVA (1997) Bilan de la campagne oléicole 1996-1997.
- Pitt J.I. (1979) The Genus *Penicillium* and its teleomorphic states: *Eupenicillium* and *Talaromyces*. Academic Press, London, 634 p.
- Pitt J.I. (1998) Laboratory guide to common *Penicillium* Species, Academic press (London, new York, Toronto, Sydney, San Francisco).
- Raper K.B. & Fennell D.I. (1965) The Genus *Aspergillus*, The Williams and Wilkins Baltimore.
- Raper K.B. & Fennell D.I. (1977) Pathogenicity. In « The Genus *Aspergillus* ». R.E. Krieger Publishing Company, Inc. 82-128.
- Roquebert M.F. (1997) Les moisissures: nature, biologie et contamination. Site Web: <http://www.culture.gouv.fr/culture/conservation/fr/cours/roqueber.htm>

- Roussos S. (1985) Croissance de *Trichoderma harzianum* par fermentation en milieu solide: physiologie, sporulation et production de cellulases. Thèse d'État, Université de Provence, Marseille, 193 p.
- Schipper M.A.A. (1978) The *Rhizopus stolonifer* group and *Rhizopus oryzae*. A revision of the genus *Rhizopus*. In Studies in Mycology N°25, Institute of the Royal Netherlands Academy of Sciences and Letters, CBS, Baarn.
- Schipper M.A.A. & Stalpers J.A. (1984) The *Rhizopus microsporus* group. A revision of genus *Rhizopus*. In Studies in Mycology. N° 25. Institute the royal Netherlands Academy of Sciences and Letters. Centraalbureau voor Schimmelcultures Baarn.
- Scriban R. (1993) Production des enzymes. In Biotechnologies. Ed. R. Scriban. Tec & Doc. Lavoisier, Paris pp. 356-363.

Distribution écologique des champignons filamenteux thermophiles isolés à partir des principales Maâsra du Maroc

Le Maroc présente des biotopes très différenciés et très particuliers (désert, mer, montagnes, etc.) ce qui le rend très riche en biodiversité où la sélection des micro-organismes s'est faite naturellement. C'est dans cette optique que l'IRD (Marseille: UR 185) en collaboration avec l'IAV Hassan II (Rabat: unité de bioconversions) a démarré un programme sur la biodiversité des champignons filamenteux thermophiles isolés à partir des Maâsra (petites unités traditionnelles de trituration des olives) situées dans les principales régions oléicoles du Maroc. La première partie du travail consiste à isoler de nouvelles souches de champignons filamenteux thermophiles à 50°C, capables de sporuler et de se développer sur différents substrats utilisés comme seule source de carbone (glucose, saccharose, amidon, caséine, carboxyméthylcellulose, tween 80, acide phytique, acide tannique) afin de mettre en évidence leurs activités enzymatiques. Les résultats préliminaires ont permis d'isoler environ 400 souches de champignons filamenteux thermophiles appartenant, au moins, à huit espèces différentes: *Aspergillus fumigatus*, *Rhizopus miehei*, *Thermomyces lanuginosus*, *Myceliophthora thermophila*, *Thermoascus aurantiacus*, *Paecilomyces variotii*, *Malbranchea sulfurea*, *Humicola grisea*. Les souches de l'espèce *Aspergillus fumigatus* ont été classées comme étant des champignons thermotolérants et les espèces *Humicola lanuginosa*, *Myceliophthora thermophila*, *Humicola grisea*, *Rhizopus miehei* et *Paecilomyces variotii* comme étant des champignons thermophiles. Les souches des espèces *Aspergillus fumigatus*, *Rhizopus miehei*, *Myceliophthora thermophila* et *Humicola grisea* ont montré les indices de sporulation les plus élevés, les meilleures vitesses de croissance apicale ayant été obtenues sur des milieux contenant des protéines, des sucres simples, de la cellulose ou des lipides comme unique source de carbone et d'énergie.

Effet antioxydant de *Lactobacillus plantarum* sur l'augmentation des composés phénoliques de l'huile d'olive

Faten KACHOURI & Moktar HAMDI

UR, Procédés Microbiologiques et Alimentaires, ESIAT-INSAT, BP 676 1080 Tunis, Tunisie
Auteur correspondant, courriel: moktar.hamdi@insat.rnu.tn

1. INTRODUCTION

L'huile d'olive est un produit très important dans le régime alimentaire grâce à sa saveur, mais également à sa valeur nutritionnelle et biologique pour la santé humaine. En plus, l'huile d'olive est riche en composés antioxydants comme les tocophérols, les caroténoïdes, les stérols et les composés phénoliques. Les composés majeurs de l'huile d'olive sont les acides gallique, caféique, vanillique, p-coumarique, syringique, ferulique, homovanillique, p-hydroxybenzoïque et protocateurique, le tyrosol et l'hydroxytyrosol. Ces composés phénoliques possèdent plusieurs propriétés et jouent un rôle très important dans la stabilité de l'huile d'olive.

La valeur nutritionnelle, biologique et organoleptique de l'huile d'olive est intimement liée à sa qualité et, en particulier, à sa richesse en composés phénoliques. Or, une grande partie de ces composés et particulièrement les orthodiphénols sont perdus au cours de l'opération du malaxage suite aux réactions d'oxydation. Les bactéries lactiques, qui sont connues pour leur effet antioxydant, jouent un grand rôle dans la biopréservation des produits végétaux fermentés.

L'objectif de ce travail est d'étudier l'influence de l'application de *Lactobacillus plantarum* au cours du processus d'extraction sur la qualité de l'huile d'olive et en particulier sur sa composition phénolique.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

Lactobacillus plantarum a été isolé à partir de différents essais de fermentation des olives (Figure 1). Les cellules de *Lactobacillus plantarum* cultivées sur MRS ont été récupérées par centrifugation à 6000 rpm pendant 10 min après 18 heures d'incubation à 37°C. Les cellules ont été resuspendues dans de l'eau physiologique stérile (9‰). Cette préparation a été utilisée pour l'inoculation des olives.

Les olives utilisées dans cette étude appartiennent à la variété « Chétoui » provenant du nord de la Tunisie. L'huile d'olive a été extraite à partir de deux lots d'olives (Figure 2). Un lot a été inoculé par *Lactobacillus plantarum* (2.10^6 UFC/ml). Un autre lot non inoculé a été utilisé comme témoin.

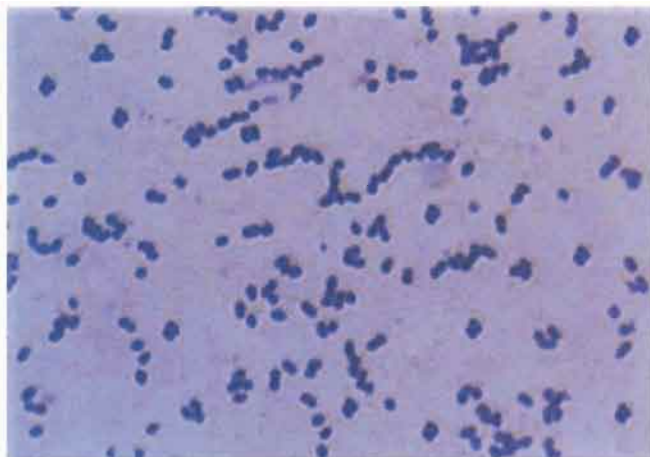


Figure 1. Aspect de colonies de *Lactobacillus plantarum* après coloration Gram

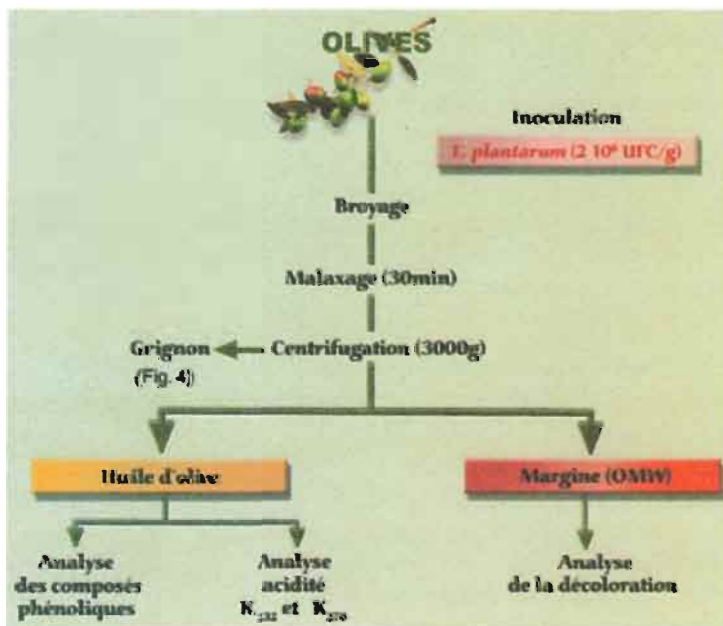


Figure 2. Diagramme d'extraction de l'huile d'olive en une seule phase selon le brevet tunisien SN 02034 (Hamdi *et al.*, 2002)

La composition phénolique a été déterminée selon la méthode décrite par Mateos *et al.* (2001). L'activité de la polyphénoloxydase a été mesurée selon la méthode décrite par Valgimigli *et al.* (2001). L'activité antioxydante totale (TAA) a été évaluée par la capacité de la bactérie à inhiber l'oxydation de l'acide linoléique (Kullisaar *et al.*, 2002).

3. RÉSULTATS ET DISCUSSION

L'analyse chromatographique des composés phénoliques de l'huile d'olive (Tableau 1) montre que le dialdéhyde de l'acide élénolique lié à l'hydroxytyrosol (Hy-EDA), au tyrosol, à la lutéoline, à l'hydroxytyrosol et au 1-acétoxypinorésinol sont les composés phénoliques les plus prononcés dans l'huile d'olive.

L'application de *Lactobacillus plantarum* au cours du malaxage des olives favorise l'augmentation des composés phénoliques de l'huile d'olive (56.1 mg/kg pour l'échantillon d'huile issue des olives témoins et 100.9 mg/kg pour l'échantillon d'huile issue des olives inoculées). La concentration des orthodiphénols augmente de 80% dans l'échantillon d'huile issue des olives inoculées, particulièrement pour Hy-EDA (31 mg/kg pour l'échantillon d'huile issue des olives témoins contre 56 mg/kg pour l'échantillon d'huile issue des olives inoculées). Parmi les non-orthodiphénols, le tyrosol augmente de 64%.

Tableau 1. Effet de l'inoculation des olives par *Lactobacillus plantarum* sur la composition phénolique (mg/kg) de l'huile d'olive extraite

Composés	Témoin	Essai inoculé
Hydroxytyrosol	3.45	2.17
Tyrosol	12.00	19.69
Acide vanillique	0.40	0.72
Vanilline	0.52	0.79
Acide p-coumarique	0.28	0.43
Acide m-coumarique	0.32	0.55
Hy-EDA	31.02	56.04
Pinorésinol	1.39	5.86
1-Acétoxypinorésinol	3.20	4.52
Lutéoline	3.52	10.15
Orthodiphénols ^a	37.99	68.36
Non-orthodiphénols ^b	18.11	32.56

^a Somme Hy + Hy-EDA + lutéoline; ^b Somme: Ty + Ac. Vanillique + Vanilline + Ac. p-coumarique + Ac. m-coumarique + 1-Acétoxypinorésinol + Pinorésinol

L'augmentation de ces composés phénoliques pourrait être due à la capacité de *Lactobacillus plantarum* de piéger l'oxygène présent au cours de l'opération du malaxage et qui est responsable de l'auto-oxydation des composés phénoliques. En effet, l'activité antioxydante de *Lactobacillus plantarum* a été mesurée en utilisant le test de l'acide linoléique et a été estimée à 50%. Kullisaar *et al.* (2002) ont démontré que deux *Lactobacillus fermentum* ont une forte activité antioxydante. Cette activité antioxydante est d'autant plus importante quand la concentration d'oxygène est plus élevée. De plus, l'activité de la polyphénoloxydase (Figure 3), enzyme responsable de l'oxydation des composés phénoliques, a été totalement inhibée en présence de *Lactobacillus plantarum*.

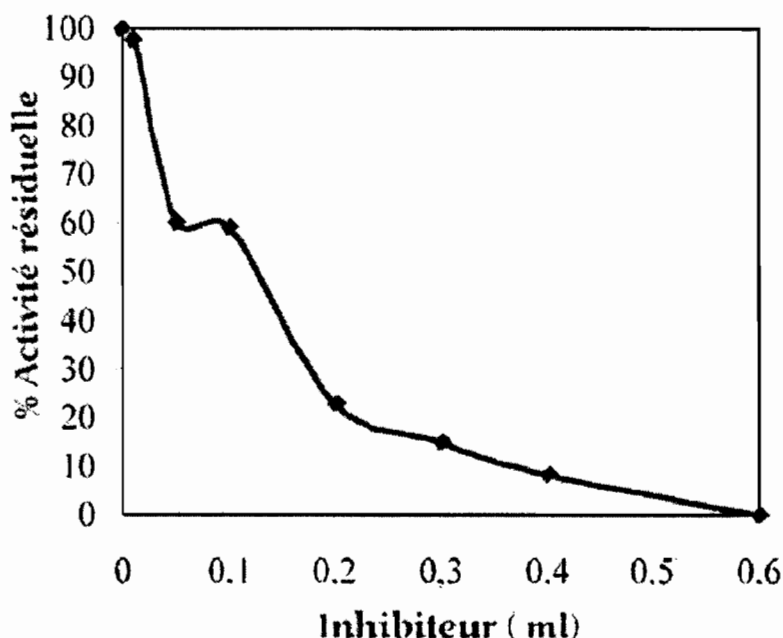


Figure 3. Inhibition de la polyphénoloxydase en fonction du volume d'une culture de *Lactobacillus plantarum*, l'activité initiale (100%) étant égale à 1.74 U

La différence entre l'acidité et l'absorbance à 232 nm et à 270 nm (Tableau 2) montre l'effet positif de l'application de *Lactobacillus plantarum* sur la qualité de l'huile d'olive.

Tableau 2. Effet de l'application de *Lactobacillus plantarum* sur les paramètres de la qualité de l'huile d'olive

Analyses	Témoin	Essai inoculé
Acidité (% d'acide oléique)	0.5	0.4
K232	2.30	2.15
K270	0.15	0.14

L'application de *Lactobacillus plantarum* sur la pâte d'olives au cours du stockage (15 jours) a montré aussi que la phase aqueuse inoculée est plus décolorée (4.1 UDO) que la phase aqueuse témoin (8.7 UDO) (Figure 4).

Ceci pourrait être expliqué par la diminution de la quantité des composés phénoliques à haut poids moléculaire qui sont responsables de la coloration noire des margines.



Figure 4. Effet de l'inoculation de *Lactobacillus plantarum* sur la coloration de la pâte d'olives

4. CONCLUSION

L'application de *Lactobacillus plantarum* au cours du processus d'extraction de l'huile d'olive a empêché l'oxydation des composés phénoliques et, par conséquent, a préservé leur concentration grâce à son pouvoir antioxydant.

5. RÉFÉRENCES CITÉES

- Hamdi M., Kachouri F., Kachouri M. & Chérif A. (2002) Brevet tunisien. Maîtrise de la qualité de l'huile d'olive en appliquant *Lactobacillus plantarum* comme agent de biopréservation des olives. SN 0 2 - 0 3 4.
- Kullisaar T., Zilmer M., Mikelsaar M., Vihalemm T., Annuk H., Kairane C. & Kilk A. (2002) Two antioxidative lactobacilli strains as promising probiotics. *International Journal of Food Microbiology* 72: 215-224.
- Mateos R., Espartero J.L., Trujillo M., Rios J.J., Leon-Camacho M., Alcludia F. & Cert A. (2001) Determination of phenols, flavones, and lignans in virgin olive oils by Solid-Phase Extraction and High-Performance liquid Chromatography with Diode Array Ultraviolet Detection. *J. Agric. Food Chem.* 49: 2185-2192.
- Valgimigli L., Sanjust E., Curreli N., Rinaldi A., Pedulli G.F. & Rescigno A. (2001) Photometric assay for polyphenol oxidase activity in olives, olive pastes and virgin olive oils. *JAOCS* 78: 1245-1247.

Effet antioxydant de *Lactobacillus plantarum* sur l'augmentation des composés phénoliques de l'huile d'olive

L'application de *Lactobacillus plantarum* au cours du processus d'extraction de l'huile d'olive a été évaluée sur la qualité de l'huile d'olive extraite et, en particulier, sur sa teneur en composés phénoliques. Les résultats montrent que la concentration des composés orthodiphénoliques, qui sont connus pour leur effet antioxydant, augmente de 80%. Parmi les composés non-orthodiphénoliques, le tyrosol augmente de 64%. En effet, *Lactobacillus plantarum* présente un effet antioxydant de 50% et une forte capacité d'inhibition de la polyphénoloxydase, enzyme responsable de l'oxydation des composés phénoliques. La différence entre l'acidité et l'absorbance à 232 nm et à 270 nm montre l'effet positif de l'application de *Lactobacillus plantarum* sur la qualité de l'huile d'olive.

Bioconversion des composés phénoliques de la margine par les bactéries lactiques

Nada BEN OTHMAN, Lamia AYED & Moktar HAMDI

UR-Procédés Microbiologiques et Alimentaires, Institut National des Sciences Appliquées
et de la Technologie (INSAT), BP 676, 1080 Tunis, Tunisie
Auteur correspondant, courriel: moktar.hamdi@insat.rnu.tn

1. INTRODUCTION

Les composés phénoliques de la margine, par leur toxicité et leur faible biodégradabilité, sont particulièrement impliqués dans les problèmes de pollution de l'environnement. Plusieurs bioprocédés aérobies et anaérobies ont été appliqués pour la biodégradation de la margine. Toutefois, la coloration noirâtre provoquée par les composés phénoliques récalcitrants de ce rejet n'est pas facile à éliminer.

La bioconversion des composés phénoliques par les bactéries lactiques représente une perspective intéressante, du fait que les cultures anaérobies ont l'avantage d'éviter les problèmes de polymérisation. *Lactobacillus plantarum* possède plusieurs enzymes impliquées dans la bioconversion des composés phénoliques (Figure 1): acide p-coumarique décarboxylase (Cavin *et al.*, 1997), tannase et gallate décarboxylase (Osawa *et al.*, 2000; Ayed et Hamdi, 2002). Bathelmebs *et al.* (2000) ont isolé à partir du vin une souche de *Pediococcus Pentosaceus* possédant une acide p-coumarique décarboxylase.

L'objectif de ce travail est de mettre en évidence l'effet de la fermentation des margines par les bactéries lactiques sur la bioconversion des composés phénoliques.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

Lb. plantarum a été isolé à partir d'olives fermentées. *Pc. Pentosaceus* a été isolé à partir d'une litière forestière. La margine fraîche a été obtenue à partir d'une huilerie locale. La margine utilisée pour la culture de *Pc. pentosaceus* est une margine issue d'un traitement aérobie par *Geotrichum candidum*, suivi d'une méthanisation dans un filtre anaérobie.

La décoloration de la margine a été évaluée par la mesure de l'absorbance à 390 nm. La demande chimique en oxygène (DCO) a été déterminée sur des échantillons centrifugés suivant la méthode économique de Knechtel (1978). La caractérisation des composés phénoliques avant et après fermentation est effectuée par chromatographie d'exclusion sur gel sephadex G-50.

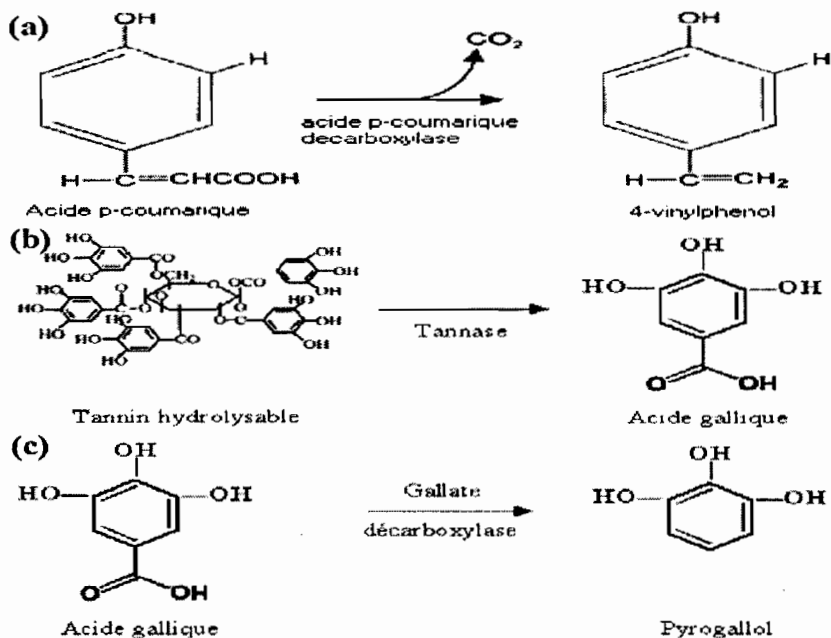


Figure 1. Mécanismes de bioconversion enzymatique de l'acide p-coumarique (a) des tanins hydrolysables (b) et de l'acide gallique (c)

3. RÉSULTATS ET DISCUSSION

3.1. Fermentation de la margine fraîche par *Lactobacillus plantarum*

La croissance de *Lb. Plantarum* sur la margine fraîche (Tableau 1) a permis une importante réduction de la couleur (59%) et de la charge organique (55,9%).

Tableau 1. Effet de la croissance de *Lb. Plantarum* sur les caractéristiques de la margine fraîche

	0 jour	6 jours
DO390	33	13,5
DCO (g/l)	17	7,5
pH	6	3.81
UFC/ml	$8,9 \cdot 10^7$	$2,3 \cdot 10^8$

L'éluion des composés phénoliques sur gel Sephadex G-50 des margines avant et après six jours de fermentation par *Lb. plantarum* à pH variable et à pH constant (Figure 2) montre la disparition d'une partie des composés à haut poids moléculaire et l'apparition d'autres composés de masse moléculaire plus faible correspondant probablement à l'hydrolyse des composés du premier groupe. La réduction a été plus importante à pH constant.

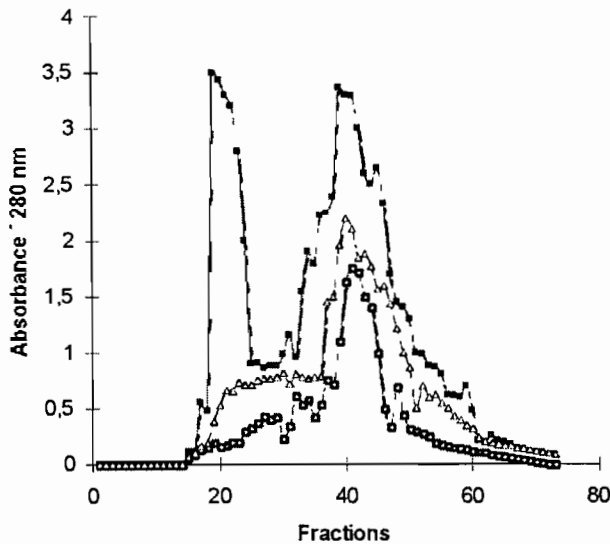


Figure 2. Profil d'éluion de la margine fraîche avant (□) et après fermentation par *Lactobacillus plantarum* à pH variable (Δ) et à pH constant (○) sur gel Sephadex G-50

3.2 Fermentation de la margine traitée par *Pediococcus pentosaceus*

La croissance de *Pc. Pentosaceus* sur margine traitée (Tableau 2) a permis une réduction importante de la couleur (68,8%).

Tableau 2. Effet de la croissance de *Pc. pentosaceus* sur les caractéristiques de la margine traitée

	0 heures	24 heures
DO390	2,6	0,81
pH	8	3,4
UFC/ml	$5,8 \cdot 10^7$	$1,2 \cdot 10^8$

Malgré la richesse du milieu en composés phénoliques toxiques, la bactérie a été capable de développer des mécanismes d'adaptation qui lui ont permis de croître et de décolorer ce rejet. La réponse de la bactérie au stress est exprimée par une production d'énergie (acide lactique) et de métabolites comme les exopolysaccharides. En effet, la production d'exopolysaccharides par *Streptococcus gallolyticus* constitue une barrière protectrice de la cellule dans une culture contenant des tanins (Donovan & Brooker, 2001).

Le chromatogramme sur gel Sephadex G-50 de la margine traitée avant et après fermentation par *Pc.pentosaceus* montre l'élimination des composés phénoliques de haut poids moléculaire et la diminution des composés de plus faible masse moléculaire (Figure 3). L'abaissement du pH par *Pc. pentosaceus* a favorisé la précipitation des composés phénoliques de masse moléculaire élevée (Hamdi, 1993).

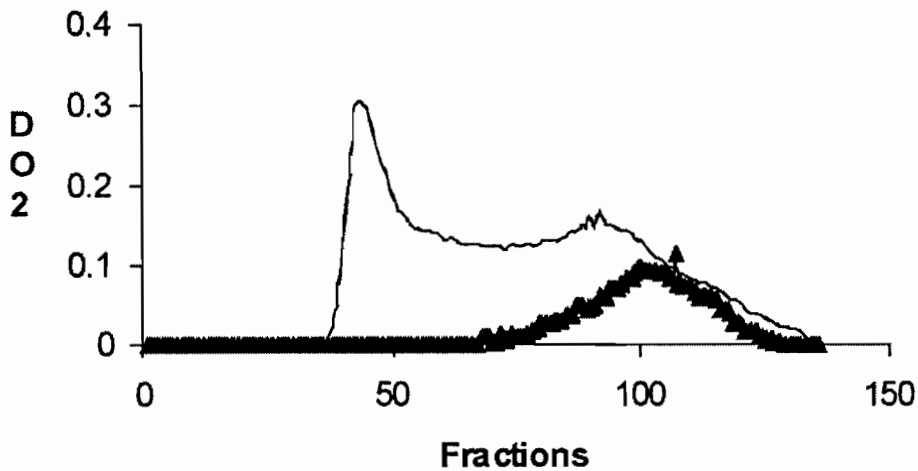


Figure 3. Profil d'éluion de la margine traitée avant (-) et après 24 h de fermentation par *Pc. pentosaceus* (Δ) sur gel Sephadex G-50

4. CONCLUSIONS

La fermentation de la margine par les bactéries lactiques a permis une réduction de la couleur quel que soit le type de margine utilisée. En plus de la bioconversion des composés phénoliques de haut poids moléculaire, les bactéries lactiques ont permis une baisse importante du pH des margines qui les rend plus stables face à l'oxydation.

5. RÉFÉRENCES CITÉES

- Ayed L. & Hamdi M. (2002) Culture condition of tannase production by *Lactobacillus plantarum*. *Biotechnology letters* 24: 1763-1765.
- Barthelmebs L., Lecomte B., Divies C. & Cavin J.F. (2000) Inducible metabolism of phenolic acids in *Pediococcus pentosaceus* is encoded by an autoregulated operon which involves a new class of negative transcriptional regulator. *Journal of Bacteriology*. 182: 6724-6731.
- Cavin J.F., Barthelmebs L. & Divies C. (1997) Molecular characterization of an inducible p-coumaric acid decarboxylase from *Lactobacillus plantarum*: gene cloning, transcriptional analysis, overexpression in *Escherichia coli*, purification and characterization. *Applied and Environmental Microbiology*. 63: 1939-1944.
- Donovan L.O. & Brooker J.D. (2001) Effect of hydrolysable and condensed tannins on growth, morphology and metabolism of *Streptococcus gallolyticus* (*S. caprinus*) and *Streptococcus bovis*. *Microbiology*. 147: 1025-1033.
- Hamdi M. (1993) Thermoacidic precipitation of darkly coloured polyphenols of Olive Mill Wastewaters. *Environmental Technology*. 14: 495-500.
- Knechtel R.J. (1978) A more economical method for the determination of chemical oxygen demand *Water Control*. 45: 25-29.
- Osawa R.O., Kuroiso K., Goto S. & Shimizu A. (2000) Isolation of tannin-degrading Lactobacilli from Human and fermented foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3093-3097.

Production des bactéries lactiques et leurs potentialités d'applications aux produits de l'olivier

Nada BEN OTHMAN, Nadia CHAMMEM, Faten KACHOURI, Lamia AYED
& Moktar HAMDI

Unité de recherche - Procédés Microbiologiques et Alimentaires, Institut National des
Sciences Appliquées et Technologie (INSAT). BP 676, 1080 Tunis, Tunisie
Auteur correspondant, courriel: moktar.hamdi@insat.rnu.tn

1. INTRODUCTION

La transformation des olives est une activité saisonnière et le stockage des fruits avant leur trituration pose un problème très important. La qualité des produits (olive de table et huile d'olive) est tributaire de la qualité du fruit et de son degré d'altération provoqué par les micro-organismes d'altération. En outre, cette industrie engendre les grignons et les margines, deux sous-produits riches en polyphénols. Ces derniers sont utiles dans le fruit pour protéger l'huile, mais deviennent polluants lorsqu'ils sont rejetés dans l'environnement à cause de leur caractère récalcitrant et antibactérien (Hamdi, 1992).

Les bactéries lactiques sont capables d'hydrolyser et de dégrader les composés phénoliques simples (Cavin *et al.*, 1997; Bathelmebs *et al.*, 2000) et d'autres molécules plus complexes comme les tanins pouvant exister dans les olives et les produits de transformations (Osawa *et al.*, 2000; Ayed & Hamdi, 2002). La fermentation lactique constitue une des méthodes sûres pour la conservation d'une large gamme d'aliments grâce aux bactéries lactiques qui contribuent à l'apport d'effets bénéfiques sur la santé humaine et au niveau de l'innocuité des produits.

Les activités enzymatiques impliquées dans la bioconversion de plusieurs composés phénoliques de l'olive devront élargir davantage les applications de ces bactéries lactiques dans ce secteur. L'application de ces bactéries passe par des étapes de sélection, de production et de conservation.

Les résultats de nos travaux de recherche sur la fermentation lactique des olives de table, la décoloration des margines et l'amélioration de la qualité des huiles d'olive par l'application de ces bactéries témoignent de l'importance de ces dernières.

2. FERMENTATION DES OLIVES DE TABLE

Ces travaux ont démarré par l'isolement de souches du genre *Lactobacillus* à partir d'olives vertes de table fermentées à la sévillane. Ces souches ont fait l'objet d'une

identification rigoureuse à l'aide de tests biochimiques, métaboliques et physiologiques. L'utilisation ultérieure de telles espèces comme starters lactiques dans l'élaboration des olives de table constitue le principal objectif à atteindre lorsqu'on veut améliorer le rapport qualité/prix de la production des olives de table et encourager, en outre, l'exportation.

Lactobacillus plantarum constitue l'espèce la plus abondante dans la saumure des olives avec un taux de 38,9% (Chammem *et al.*, 2002). La sélection de la souche à utiliser comme starter dans la fermentation des olives vertes est basée sur deux critères: réponses physiologiques aux conditions de stress salin et production de bactériocines. La souche *Lb. plantarum* *Lb.NC18* a été choisie pour être utilisée comme starter.

2.1. Production de *Lb. plantarum* *Lb.NC18* en fermenteur

Un starter lactique de fermentation d'olives de table est obtenu par production de *Lb. plantarum* *Lb.NC18* en fermenteur. Ce starter doit être produit en quantités suffisantes et doit bien s'approprier aux méthodes de conservation couramment utilisés pour les ferments lactiques industriels. Au cours de la production en fermenteur de la souche *Lb.NC18*, les consignes suivantes ont été adoptées: température = 37°C, pH = 6,5, vitesse d'agitation 70 rpm. Le choix effectué dépend des conditions optimales de croissance de la souche à produire.

Dès le démarrage de la fermentation, le suivi du pH, de l'absorbance et du glucose a été effectué (Figure 1) toutes les heures. Le dénombrement des ferments a, par contre, été réalisé toutes les 3 heures. Lors de la production en fermenteur de 300 L, la moitié du substrat est consommée au bout de 10 h de culture correspondant à une biomasse de 8 unités DO et un nombre de cellules viables de l'ordre de $3.3 \cdot 10^9$ UFC/ml. Le maximum de biomasse obtenu au bout de 20 h 30 de fermentation est de $3.9 \cdot 10^{10}$ UFC/ml.

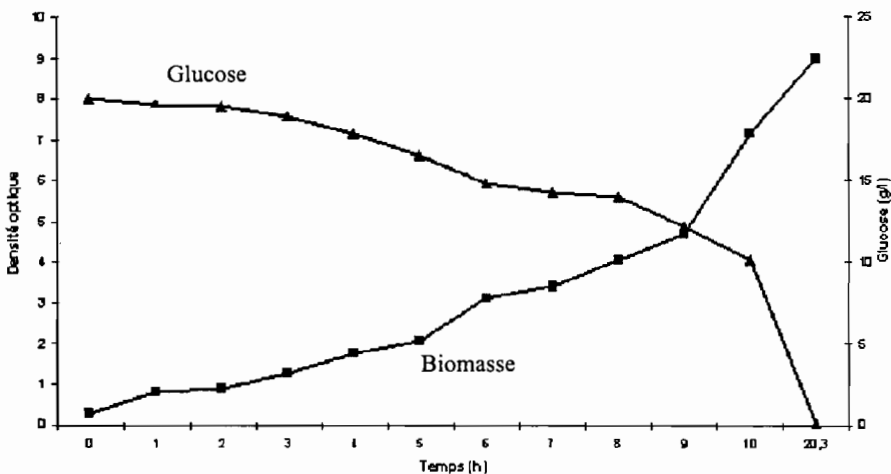


Figure 1. Évolution de la biomasse et de la concentration en glucose au cours de la production de *Lb. plantarum* *Lb.NC18* en fermenteur

Le dénombrement des cellules viables de *Lb. plantarum* *Lb.NC18* juste après lyophilisation donne un nombre de l'ordre de 10^{12} UFC/g de poudre lyophilisée. L'analyse des lyophilisats scellés sous vide au bout d'une année de conservation en atmosphère réfrigérée a montré que le taux de viabilité cellulaire est resté de l'ordre de 10^6 UFC/g de pâte lyophilisée.

2.2. Processus d'élaboration des olives de table fermentées

Différents processus d'élaboration des olives de tables fermentées ont été essayés afin de déterminer les conditions optimales d'élaboration d'un produit fini maîtrisé du point de vue microbiologique et organoleptique.

Des olives vertes de la variété locale « Meski » ont été choisies d'un certain calibre. Elles ont été soumises aux différents processus d'élaboration. La fermentation a été effectuée selon cinq procédés différents (Figure 2).

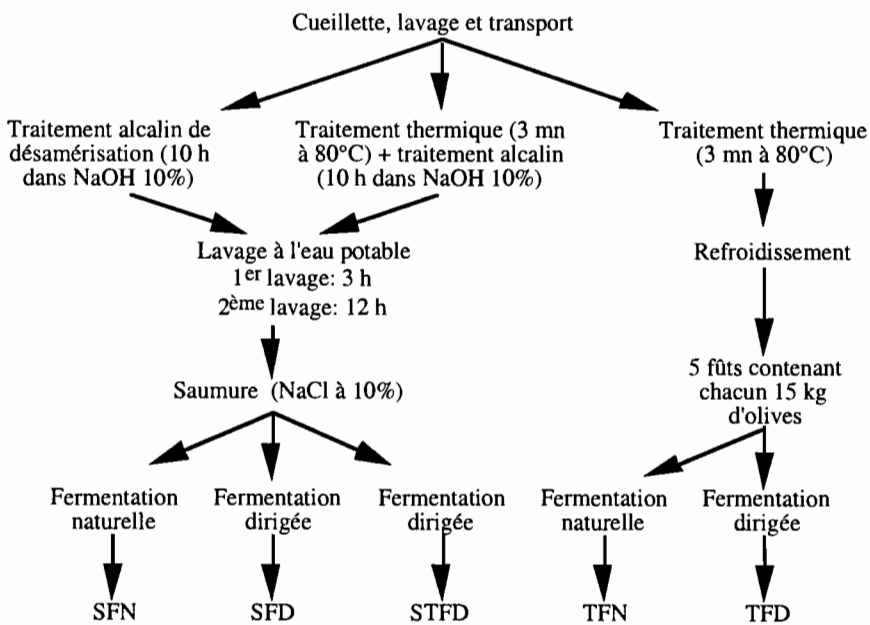


Figure 2. Diagramme de fabrication des olives de table selon différents procédés

Parmi les différents processus d'élaboration des olives fermentées, le procédé STFD a donné les meilleurs résultats du point de vue microbiologique et organoleptique. Le suivi de la microflore durant ce procédé (Figure 3) a montré une inhibition des levures et une disparition des *Enterobacteriaceae* au bout de 15 jours. L'ajout du starter lactique a permis de maintenir une importante concentration cellulaire de bactéries lactiques qui aboutit à un abaissement du pH observable dès les premiers jours. Au bout de 90 jours, le pH atteint une valeur de 3,7.

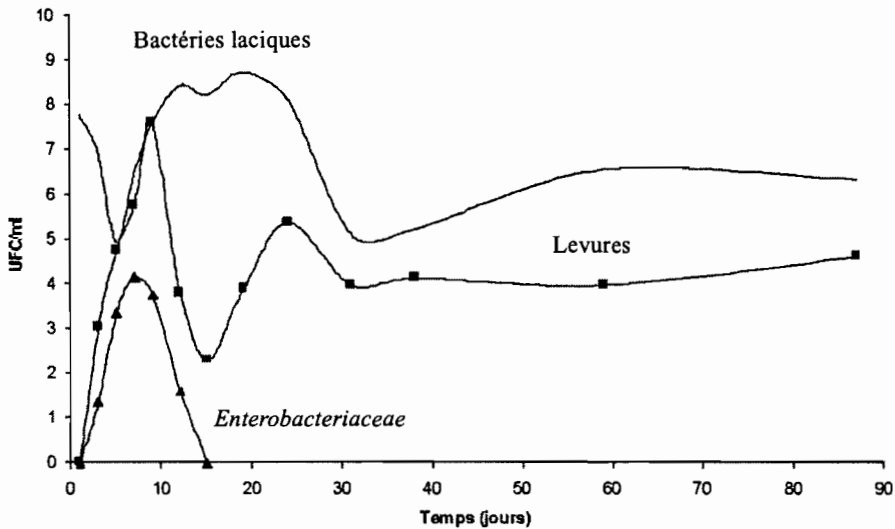


Figure 3. Évolution des *Enterobacteriaceae*, des levures et des bactéries lactiques de la saumure lors de la fermentation contrôlée des olives ayant subi un traitement alcalin suivi d'un traitement thermique (STFD)

Le traitement thermique des olives en saumure inoculées par une culture pure de *Lactobacillus plantarum* a été adéquate pour une fermentation contrôlée. Ce procédé favorise non seulement la diminution des risques de contamination, mais aussi une modification sensorielle intéressante.

3. Amélioration de la qualité de l'huile d'olive

Dans les pays méditerranéens, l'huile d'olive a une grande importance dans le régime alimentaire grâce à ses propriétés culinaires et à sa grande valeur nutritionnelle. En effet, l'huile d'olive contient une grande proportion d'acides gras mono-insaturés en plus des composés antioxydants comme les tocophérols, les caroténoïdes, les stérols et les composés phénoliques.

Les composés phénoliques de l'huile d'olive, qui sont responsables de la stabilité, proviennent de l'olive durant le processus d'extraction, mais une grande partie de ces composés est perdue au cours de l'opération de malaxage due à leur oxydation par l'oxygène (Servili *et al.*, 1999).

Le but de ce travail est d'étudier l'influence de l'application de *Lactobacillus plantarum* durant l'étape de malaxation lors du procédé d'extraction de l'huile d'olive sur la qualité de l'huile d'olive extraite et sa composition phénolique.

Lactobacillus plantarum a été isolée à partir des échantillons d'olives fermentées. Les cellules ont été récupérées par centrifugation d'une culture de 18 heures dans un milieu MRS liquide, puis resuspendues dans de l'eau physiologique stérile. Cette préparation a été utilisée pour inoculer le lot des olives.

Cent kg d'olive ont été récoltées du nord de la Tunisie. Les échantillons d'huile d'olive sont issus de deux lots d'olives (Figure 4). Un lot a été inoculé par *Lactobacillus plantarum* ($2 \cdot 10^6$ UFC/g). Un autre non inoculé a été utilisé comme témoin.

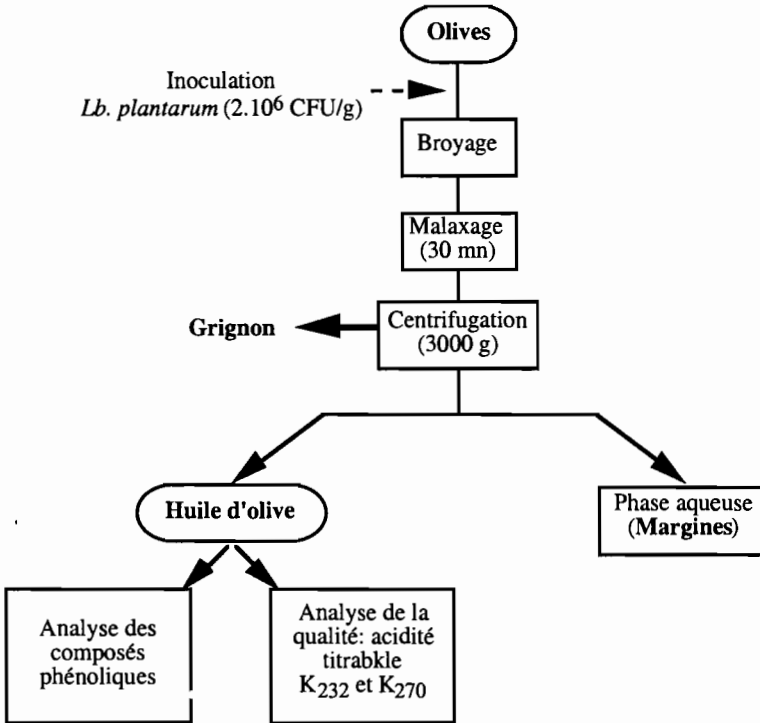


Figure 4. Diagramme du processus d'extraction de l'huile d'olive vierge (Brevet Tunisien SN 02034)

L'application de *Lb. plantarum* durant le processus d'extraction de l'huile d'olive favorise l'augmentation des composés phénoliques dans l'huile (Tableau 1). L'huile d'olive témoin contient 56.1 mg/kg de phénols totaux contre 100.9 mg/kg dans l'huile issue des olives inoculées. L'augmentation des composés phénoliques dans l'huile d'olive pourrait être due aux propriétés antioxydantes de *Lb. plantarum* qui empêche l'oxydation des composés phénoliques en piégeant l'oxygène.

La qualité de l'huile extraite à partir des lots inoculés par *Lb. Plantarum* est améliorée (Tableau 2).

En effet, une diminution des valeurs de l'acidité, des indices K232 (absorbance à 232 nm) et K270 (absorbance à 270 nm) est observée pour les lots inoculés. Cette différence pourrait être due à l'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique par *Lb. plantarum*. Certains auteurs (Lin & Chang, 2000) ont montré que quelques bactéries lactiques de l'intestin (*Lactobacillus acidophilus*) inhibent l'oxydation de l'acide linoléique et possèdent une importante activité antioxydante.

Tableau 1. Effet de l'application de *Lb. plantarum* durant le processus d'extraction sur la composition phénolique (mg/kg) de l'huile d'olive vierge

Composés	Contrôle	Inoculé
Hydroxytyrosol	3.45	2.17
Tyrosol	12.00	19.69
Acide vanillique	0.40	0.72
Vanilline	0.52	0.79
Acide p-coumarique	0.28	0.43
Acide m-coumarique	0.32	0.55
1 ^{er} dérivé de l'hydroxytyrosol	31.02	56.04
Pinorésinol	1.39	5.86
1-Acétoxypinorésinol	3.20	4.52
Lutéoline	3.52	10.15
Phénols totaux	56.1	100.9

Tableau 2. Effet de l'application de *Lb. plantarum* durant le processus d'extraction sur la qualité de l'huile d'olive

	Contrôle	Essai inoculé
Acidité	0.5	0.4
K232	2.30	2.15
K270	0.15	0.14

4. FERMENTATION DES MARGINES PAR LES BACTÉRIES LACTIQUES

4.1. Fermentation de la margine par *Lactobacillus plantarum*

La margine, effluent liquide de l'industrie de l'huile d'olive, pose de sérieux problèmes de pollution de l'environnement. En effet, les composés phénoliques que contient ce rejet sont la cause de sa toxicité et de sa faible biodégradabilité. De plus, ces composés subissent, au court du temps, une auto-oxydation qui les rend plus toxiques et difficilement biodégradables (Hamdi & Ellouz, 1993).

Plusieurs bioprocédés aérobies et anaérobies ont été appliqués pour la biodégradation de la margine. Les procédés aérobies sont limités par l'auto-oxydation et la polymérisation des tannins et des composés phénoliques en tannins condensés et des polyphénols à haut poids moléculaire (Hamdi & Ellouz, 1993; Assas *et al.*, 2000).

La bioconversion des composés phénoliques par les bactéries lactiques représente une perspective intéressante, du fait que les cultures anaérobies ont l'avantage d'éviter les problèmes de polymérisation.

La décoloration de la margine par *Lb. plantarum* a été démontrée par Ayed & Hamdi (2003). En effet, cette bactérie possède plusieurs enzymes impliquées dans la bioconversion des composés phénoliques: acide p-coumarique décarboxylase (Cavin *et al.*, 1997), tannase et gallate décarboxylase (Osawa *et al.*, 2000; Ayed & Hamdi, 2002).

La croissance de *Lb. plantarum* sur des margines fraîches induit la décoloration et la réduction de la DCO (Tableau 3).

Indépendamment de la dilution et malgré la forte concentration en polyphénols de la margine non diluée, *Lb. plantarum* a été capable de croître contrairement aux champignons qui sont inhibés en absence de dilution (Sayadi & Ellouz, 1992). Cependant, la dilution de la margine améliore la croissance et par conséquent les pourcentages de décoloration et de réduction de la DCO.

Tableau 3. Effet de la dilution sur le changement du pH, UFC, DCO (g/l) et la DO390 durant la croissance de *Lactobacillus plantarum* sur margine fraîche (UFC/ml initial: $8.9 \cdot 10^7$, pH initial: 6)

.....État initial.....	État final.....			
DO	DCO	UFC/ml	pH	DCO	DO390
300	150	$9.4 \cdot 10^7$	3.5	119	240
68	35	$1.8 \cdot 10^8$	3.75	19	37
33	17	$2.3 \cdot 10^8$	3.81	7.5	13.5

Après six jours de culture, l'élué des composés phénoliques sur gel Sephadex G-50 de la margine fraîche avant et après fermentation par *Lb. plantarum* à pH variable et à pH constant (Figure 5) montre la disparition d'une partie des composés à haut poids moléculaire et l'apparition d'autres composés de masse moléculaire plus faible correspondant probablement à la réduction des composés du premier groupe. La réduction a été plus importante à pH constant. La réduction des composés phénoliques est associée à la dépolymérisation des polyphénols, à leur adsorption sur les parois bactériennes et à la dégradation de certains phénols.

La biodégradation réductive par *Lb. Plantarum* offre des avantages significatifs par rapport à la minéralisation oxydative. Elle permet de dépolymériser les composés phénoliques, responsables de la couleur noire, en composés phénoliques de faible masse moléculaire ayant une faible capacité d'adsorption donc plus faciles à dégrader.

4.2. Décoloration de la margine traitée par *Pediococcus pentosaceus*

L'application d'un procédé intégré pour le traitement de la margine fraîche permet une importante réduction de la DCO qui peut atteindre les 90%, mais la coloration noirâtre due aux composés phénoliques récalcitrants persiste.

Pc. pentosaceus a été utilisé pour la bioconversion des composés phénoliques récalcitrants de la margine. Ce substrat est issu d'un traitement aérobie par *Geotrichum candidum*, suivi d'un traitement dans un filtre anaérobie. La sélection de *Pc. pentosaceus* parmi les différentes souches de bactéries lactiques isolées a été effectuée selon sa capacité à tolérer l'acide tannique (tanin hydrolysable) et sa capacité à dégrader la margine.

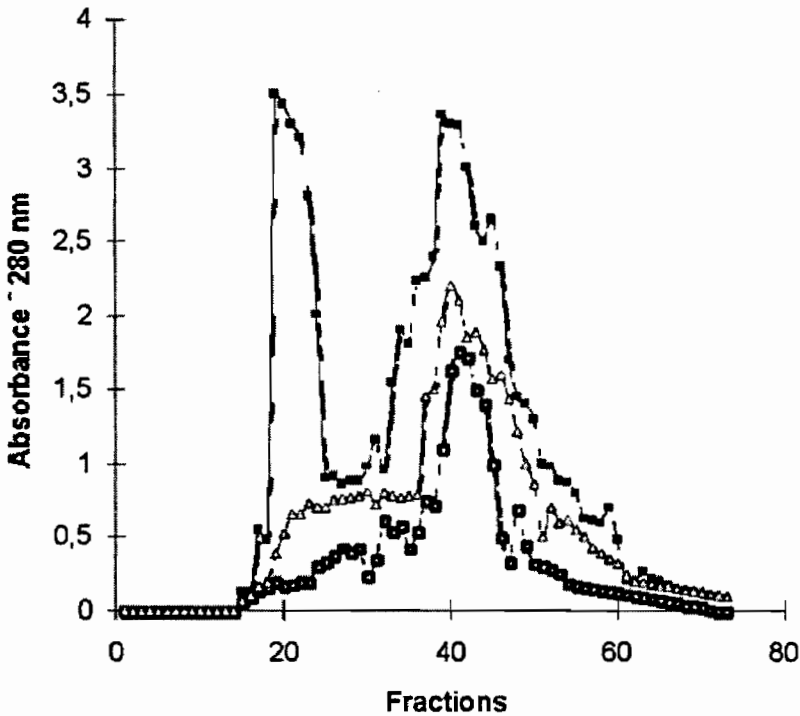


Figure 5. Profil d'éluion de la margine fraîche avant (■) et après fermentation par *Lactobacillus plantarum* à pH variable (Δ) et à pH constant (□) sur gel Sephadex G-50

Les vitesses de croissance et de décoloration ont été améliorées par la dilution des composés phénoliques de la margine (Figure 6). Cependant, en fin de culture, les pourcentages d'abattement se rapprochent pour les différentes dilutions.

La croissance en présence d'une concentration élevée en composés phénoliques est ralentie et une diminution du taux de croissance est observée. Les vitesses de décoloration sont en corrélation avec les vitesses de croissance, ce qui montre que la décoloration est associée à la multiplication cellulaire.

Malgré la richesse du milieu en composés phénoliques toxiques, la bactérie a été capable de développer des mécanismes d'adaptation qui lui ont permis de croître sur la margine et de la décolorer. La réponse de la bactérie au stress est exprimée par une production d'énergie (acide lactique) et de métabolites comme les exopolysaccharides. En effet, la production d'exopolysaccharides par *Streptococcus gallolyticus* constitue une barrière protectrice de la cellule dans une culture contenant des tanins (Donovan & Brooker, 2001).

Après 8 heures d'incubation à 30°C, on observe le dépôt d'un précipité au fond des cultures. Ceci pourrait être dû à la précipitation des composés phénoliques par les cellules bactériennes qui est favorisée par le pH du milieu (résultats non montrés).

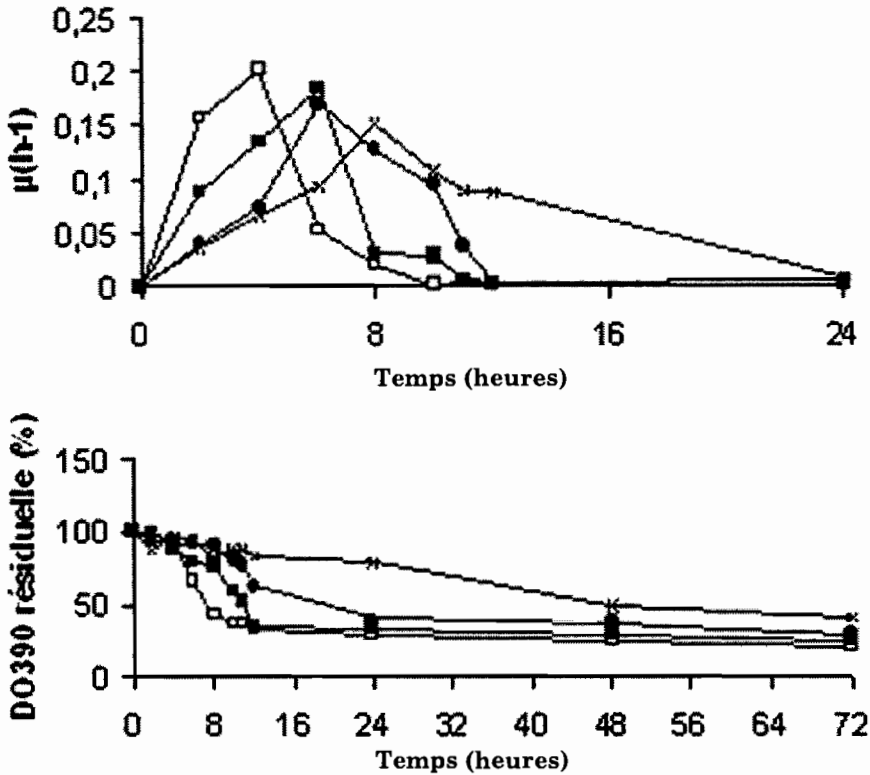


Figure 6. Effet de la dilution (□) D 1/5 (■) D 1/2 (●) D 3/4 (x) Non Dilué sur l'évolution de la croissance et la décoloration de la margine contenant 1 g/l d'extrait de levure et 2.5 g/l de glucose

Dans le but d'étudier l'effet de l'adsorption sur la décoloration, différentes concentrations de cellules de *Pc. pentosaceus* ont été mélangées avec un échantillon de margine pendant 2 heures. La concentration cellulaire passe de $2.3 \cdot 10^9$ à $1.2 \cdot 10^9$ UFC/ml (Figure 7) et la DO390 est réduite de 42.5%.

Ce pourcentage d'abattement dépend de la concentration cellulaire et il est aux alentours de 10% pour des concentrations inférieures à 10^8 UFC/ml (résultats non reportés). Le pourcentage d'abattement de la DO390 lors de la culture de *Pc. pentosaceus* sur margine atteint 77.78 % après 72 heures de culture. Ceci montre que l'abattement est dû essentiellement à une biodégradation des composés phénoliques.

Le chromatogramme sur gel Sephadex G-50 (Figure 8) de la margine traitée avant et après fermentation par *Pc. pentosaceus* montre l'élimination des composés phénoliques de haut poids moléculaire et la diminution des composés de plus faible masse moléculaire. Cette importante élimination des composés phénoliques pourrait être due aux mécanismes enzymatiques et à la précipitation des polyphénols. Ces phénomènes sont en cours d'étude.

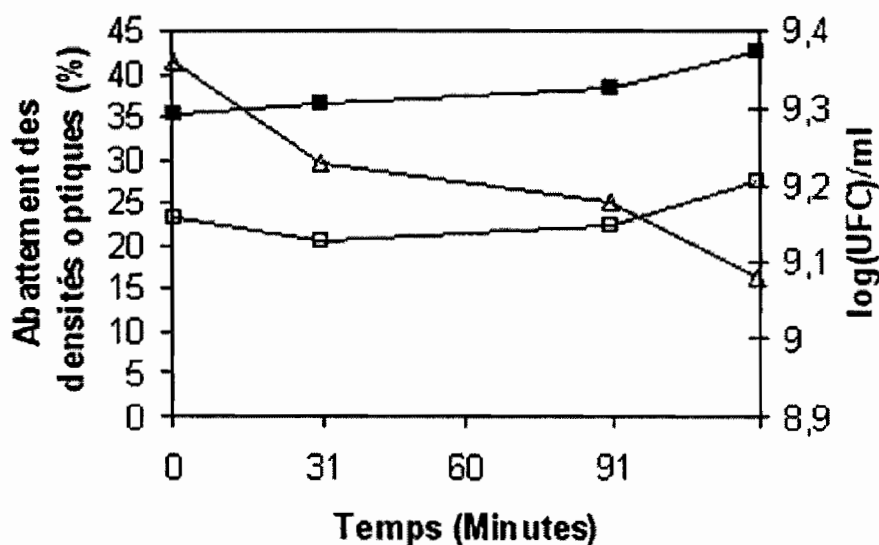


Figure 7. Évolution de la DO280 (□), DO390 (■) et de l'UFC (Δ) suite à l'addition d'une concentration cellulaire de $2.3 \cdot 10^9$ UFC/ml de *Pc. pentosaceus*

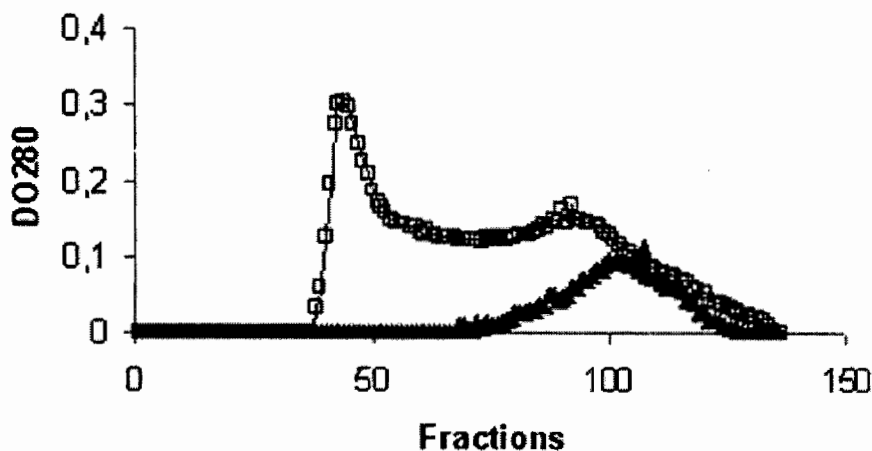


Figure 8. Profil d'éluion de la margine traitée avant (□) et après 24 h de fermentation par *Pc. pentosaceus* (Δ) sur gel Sephadex G-50

5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les bactéries lactiques sont dotées d'un pouvoir antioxydant, hydrolytique et réductif qui peuvent être utilisés pour l'amélioration et la stabilisation des produits de l'olivier (olives fermentées, huile d'olive et margine). Certains mécanismes impliqués dans la transformation des composés phénoliques ont été élucidés, d'autres sont en cours d'étude.

6. REMERCIEMENTS

Certains de ces travaux ont été effectués en collaboration avec l'ITQB (Portugal), le CWBI (Belgique), Institut de l'Olivier (Tunis), Office de l'Huile (Tunis), FST (Tunis), CBS (Sfax), Faculté de Médecine (Monastir).

7. RÉFÉRENCES CITÉES

- Assas N., Marouani L. & Hamdi M. (2000) Scale down and optimization of olive mill wastewaters decolorization by *Geotrichum candidum*. *Bioprocess Engineering*. 22: 503-507.
- Ayed L. & Hamdi M. (2002) Culture condition of tannase production by *Lactobacillus plantarum*. *Biotechnology Letters* 24: 1763-1765
- Ayed L. & Hamdi M. (2003) Fermentative decolorization of olive mill wastewater by *Lactobacillus plantarum*. *Process Biochemistry* 39: 59-65.
- Cavin J.F., Barthelmebs L. & Divies C. (1997) Molecular characterization of an inducible p-coumaric acid decarboxylase from *Lactobacillus plantarum*: gene cloning, transcriptional analysis, overexpression in *Escherichia coli*, purification and characterization. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 1939-1944.
- Chammem N., Kachouri M., Peres C., Boudabous A. & Hamdi M. (2002) Impact des conditions d'élaboration des olives de table sur les espèces du genre *Lactobacillus*. *Microbiol. Hyg. Ali*. 14(41): 31-39.
- Donovan L.O. & Brooker J.D. (2001) Effect of hydrolysable and condensed tannins on growth, morphology and metabolism of *Streptococcus gallolyticus* (*S. caprinus*) and *Streptococcus bovis*. *Microbiology* 147: 1025-1033.
- Hamdi M. (1992) Toxicity and biodegradability of olive mill wastewater in batch anaerobic digestion. *Applied Biochem. Biotechnol.* 37: 155-163.
- Hamdi M., Kachouri F., Kachouri M. & Cherif A. (2002) Biopreservation of olive by *Lactobacillus plantarum* in order to produce olive oil with high quality. Brevet d'invention SN 02034.

- Hamdi M. & Ellouz R. (1993) Treatment of detoxified Olive Mill Wastewater by anaerobic filter and aerobic fluidized bed processes. *Environmental Technology* 14: 183-188.
- Levi-Menzi R., Saviozzi A., Riffaldi R. & Falzo L (1992) L'épandage au champs des margines: effet sur les propriétés du sol. *Olivea* 40: 20-25.
- Lin M.Y. & Chang F.Y. (2000) Antioxidative effect of intestinal bacteria *Bifidobacterium longum* ATCC 15708 and *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. *Dig. Dis. Sci* 45: 1617-1622.
- Osawa R.O., Kuroiso K., Goto S. & Shimizu A. (2000) Isolation of tannin-degrading Lactobacillifrom Human and fermented foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3093-3097.
- Sayadi S. & Ellouz R. (1992) Decolorization of olive mill waste-water by the white rot fungus *Phanaerochate chrysosporium*: involvement of the linin-degrading system. *Applied Microbiology and Bioechnology* 37: 813-817.
- Servili M., Baldioli M., Maiotti F. & Montedoro G.F. (1999) Phenolic composition of olive fruit and virgin olive oil: distribution in the constitutive parts of fruit and evolution during oil mechanical extraction process. *Acta Horticulturae* 474: 609-613.

Temporal evolution of the olive mill pomaces during composting

Gonzalo MARTÍNEZ¹, Juan Vicente GIRÁLDEZ², Rafaela ORDÓÑEZ¹
& Pedro GONZÁLEZ¹

¹ Ecology and Natural Resources Area, IFAPA, CIFA Alameda del Obispo, Apdo. 3092, 14080 Cordoba, Spain

² Department of Agronomy, University of Cordoba, Apdo. 3048, 14080 Cordoba, Spain
Corresponding author; e-mail: gonzalo.martinez.ext@juntadeandalucia.es

1. INTRODUCTION

Spain is the main producer of olive oil with more than one million tonnes of olive oil per year. Andalusia represents more than half of the national oil production (AAO, 2004). This production is concentrated in a reduced period of time (approximately 3 months) which implies the environmental risk of by-products handling in the oil-extracting factories.

A changes in olive oil extraction methods, from the three phase system, oil, and solid and liquid residues to the two phases system, with the solid and liquid residues combined in a paste at the beginnings of the nineties, prompted a change in the environmental management strategy (Hermoso *et al.*, 1998; Alba, 2004). The new by-product known as olive mill pomace or, more commonly, *alperujo*, has characteristics of both the olive mill waste waters and sludge, increasing the difficulties of its disposal. The main properties of *alperujo* are its high moisture, phenolic sugars and pectin content, a high carbon to nitrogen ratio and organic matter content. Several methods have been proposed for *alperujo* treatment directed to a final use as a soil amendment with either fresh application, previous residual oil or natural antioxidants extraction, or drying with electricity cogeneration, and finally, compostage (Madejón *et al.*, 1998ab; González *et al.*, 2003; Fernández Bolaños *et al.*, 2002; Bas *et al.*, 2002; Melgar, 2003; Cegarra *et al.*, 2004). Composting is possibly the more interesting processing method from environmental, social and economical points of view.

The elevated moisture content and the high C/N ratio require the addition of a extra nitrogen source and some water absorbent (Haug, 1993). In the organic farming context adopted in some olive oil producing areas of Spain the nitrogen sources used may be manure, organic fertilizers made of animal residues as blood and feather, and compost of previous processes. In this way the final *alperujo* compost may be certified for its use in organic agriculture. One structural or water absorbent agent is the olive leaves accompanying olive fruits.

A study of the efficiency of the composting process has been carried out with different mixtures under controlled conditions in the Agriculture Experiment Station of Cordoba, Southern Spain.

2. MATERIALS AND METHODS

The relevant properties of the *alperujo* used in this work are gathered in the table 1

Table 1. Chemical characteristics of *alperujo*

Humidity	%	65.0
Organic matter	% d.w.	97.3
pH		4.93
EC	dS/m	6.54
N Kjeldahl	% d.w.	1.26
C/N	% d.w.	45.40
P ₂ O ₅	% d.w.	0.19
K ₂ O	% d.w.	2.07
Ca	% d.w.	0.33
Mg	% d.w.	0.07
Na	% d.w.	1.41
Fe	mg.kg ⁻¹ d.w.	268
Mn	mg.kg ⁻¹ d.w.	14.8
Cu	mg.kg ⁻¹ d.w.	16.9
Zn	mg.kg ⁻¹ d.w.	13.8

The mixtures were made with *alperujo* as bulking agent and different nitrogen sources and structural additives, as indicated in table 2.

The proportions of components in the mixtures were calculated according to the Cornell University organic composting rules ("getting the right mix"). Mixes were put in heaps in 12 containers (3 repetitions per mixture), of approximately 1 m². Temperature was measured with 2 thermistors located at different depths (10 and 20 cm above the bottom of the recipients). The heaps were overturned every week for aeration and better mixing. The heaps were irrigated with 5 L of tap water per heap and day during the dry months of June and July. Lixiviates were collected at the bottom of the containers.

Table 2. Proportions of the ingredients

Mixture	Fresh weight (kg)	Dry weight (kg)	C/N*	Ht*
1 A + M + L	80 / 20 / 10	28 / 6 / 11	32.2	59.1
2 A + C + L	70 / 30 / 15	25 / 18 / 9	34.4	55.2
3 A + C + M + L	60 / 15 / 15 / 20	21 / 9 / 8 / 12	30.7	54.3
4 A + O + H	80 / 3 / 17	28 / 2.7 / 10.2	27.8	59.1

* C/N calculated; Ht calculated

(A) *alperujo* (M) Manure (L) Leaves (C) Old compost (O) Organic fertilizer

The chemical composition of the compost was determined using the standard methods of Sparks (1996) and MAPA (1994). Phytotoxicity was assayed according to Zucconi *et al.* (1987), by the *Lepidium sativum* test. Significance probes were computed with Tukey test with $p < 0.05$.

3. RESULTS AND DISCUSSION.

There are two main stages of thermal evolution: a *thermophilic* stage developed as a consequence of easily degradable organic matter mainly represented by carbohydrates with temperatures above 50°C in mixtures 1, 2, 3 and 45°C in mixture 4.

The temperature (Figure 1) decreased due heap overturning and to the exhaustion of easily degradable substrates, which reduced the metabolic activity of micro organisms. After a 2 to 3 weeks period a new *thermophilic* stage in which the organic matter was degraded with a higher velocity (Figures 1 and 2) was reached with a consequent reduction in the C/N ratio. Organic matter became more stable, phytotoxicity decreased and the pH increased to 7 or higher values. This stage lasted approximately 30 days. The safe conditions of the compost were achieved due to temperatures above 55°C during at last 5h (Haug, 1993).

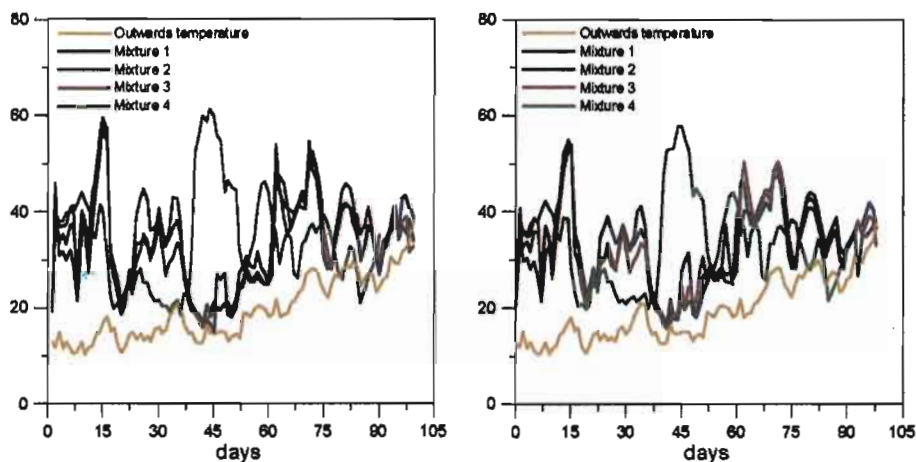


Figure 1. Temperature evolution during composting at two depths (10, 20 cm)

Temperature in the heaps did not reach the great values found in other trials like Madejón *et al.* (1998ab) or Cegarra (2004) due to overturning and to their smaller volume with a high surface/volume ratio which imply greater heat losses by conduction and radiation (Bejan, 1993).

At the end of the process heaps temperature approached the external air temperature reaching a mature stage: Germination Index (GI) was above 60 %, C/N ratio was below 16 in every mixture (Figure 2), pH was greater than 7 and compost could be considered made (Zucconi *et al.*, 1987; Haug, 1993).

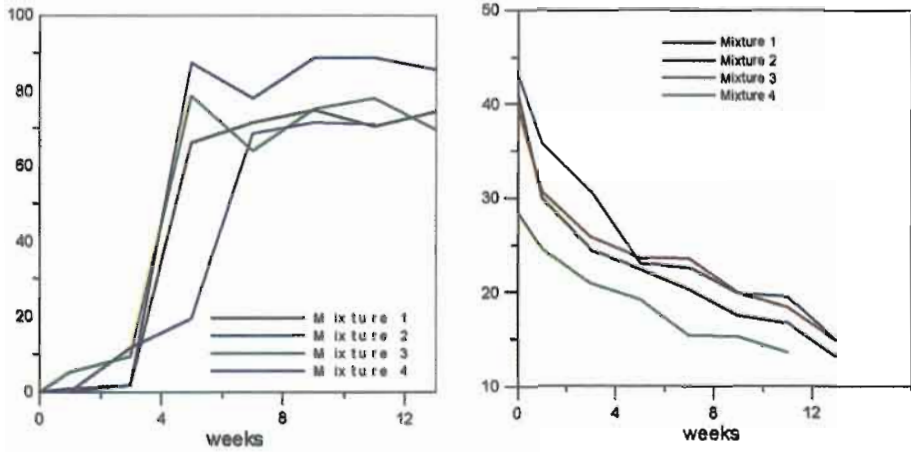


Figure 2. GI index and C/N ratio in the heaps

Final products were stable, with an earthy smell, dark colour, not being recognizable the initial ingredients. Nitrogen content in every mixture were above 1.8% (d.w.) depending on the initial value and could be regarded as a good value for organic amendments, higher than other compost products, i.e., from municipal wastes or sludge (Aguilar, 1998; Aguilar, 2003). Phosphorus levels were lower in every mixture due to the singular characteristics of *alperujo* and low values of P in manure, old compost and the organic fertilizer. Potassium concentration in composts was high and microelements had normal values (Table 3).

Table 3. Characteristics of final composts

	ttmto 1	ttmto 2	ttmto 3	ttmto 4
Humidity (%)	25.2	27.6	24.8	26.2
OM (% d.w.)	48.7 a	45.3 a	47.7 a	64.3 b
pH	8.41	8.24	8.31	7.85
EC (dS/m)	5.32 a	3.72 b	4.33 b	4.70 a
N Kjeldahl (% sms)	1.89 a	1.86 a	2.12 a	2.89 b
N-NO ₃ ⁻	0.06	0.08	0.09	0.09
C/N	15.17	14.34	13.25	13.09
P ₂ O ₃	0.40 a	0.24 b	0.33 ab	0.32 ab
K ⁺	2.46 a	1.83 b	1.86 a	2.20 ab
Na ⁺	4.88 a	1.69 b	4.64 a	2.63 b
Ca ⁺⁺	3.41	2.72	3.25	1.94
Mg ⁺⁺	0.40 a	0.17 b	0.32 a	0.16 b
Fe (mg.kg ⁻¹)	1519 a	1960 b	1363 ac	991 c
Cu (mg.kg ⁻¹)	36.3 a	31.9 a	32.2 a	126.6 b
Mn (mg.kg ⁻¹)	82.0	71.8	82.7	56.2
Zn (mg.kg ⁻¹)	300	321	242	141

Copper content in mixture 4 and Zinc content in mixture 2 exceeded the threshold values required in ecological label standards (DOCE, 1997), probably due to the precedence of the raw materials used in trials. Therefore a preliminary analysis of the ingredients is necessary to avoid possible problems with the concentration of those elements in final products and to make possible the spillage of those compost in organically grown olive orchards.

4. CONCLUSIONS

Composting process, developed in a short period of time (lower than 3 months), reduced the phytotoxic effects of *alperujo* and achieved an organic matter more stable. The resulting Composts had good fertilizing characteristics although phosphorus levels were low.

Mixture 4 achieved the maturity faster than others and is easily to prepare wherever would be necessary and also give richer compost in fertilizing elements.

It is necessary to analyse metals in the initial ingredients to avoid contamination problems not accepted in organic agriculture.

5. REFERENCES

- AAO, Agencia para el aceite de oliva. Datos de producción anual de aceite (2004) www.mapya.es/aa0/default.html
- Aguilar F.J. & González P. (1998) Utilización agrícola de compost de residuos sólidos urbanos en cultivos leñosos de la provincia de Córdoba. Comunicación I + D 26/98. Direc. Gral. de investigación y formación agraria. Junta de Andalucía, Seville.
- Aguilar M.A., Ordóñez R. & González P. (2003) Utilización de compost de lodos de depuradora en olivar. Serie olivicultura y elaiotecnía. Consejería de agricultura y pesca. Junta de Andalucía, Seville.
- Alba J. (2004) Elaboración de aceite de oliva virgen. Barranco D.; Fernández-Escobar R.; Rallo L. El cultivo del olivo 5th. ed. MundiPrensa-Junta de Andalucía, Madrid. pp. 550-587.
- Bejan A. (1993) Heat transfer. Wiley, New York.
- Bas F., Colinet M.J. & Robles S. (2002) Métodos de gestión en la eliminación de los orujos de aceituna generados en la obtención del aceite de oliva. In Jornadas de investigación y transferencia tecnología al sector oleícola. Direc. Gral. de Investigación y formación agraria Junta de Andalucía. pp: 200-202.
- Cegarra J., Alburquerque J.A., González J. & García D. (2004) Tratamiento del orujo de oliva de dos fases mediante compostaje. *Olivae* 101: 12-17.
- DOCE (1997) Reglamento (CE) n^o 1488/97 de la comisión de 29 de Julio de 1997 por el que se modifica el Reglamento (CEE) n^o 2092/91 del Consejo sobre la producción agrícola ecológica y su indicación en los productos agrarios y alimenticios. N^o L 202, July, 30, 1997.
- Fernández-Bolaños J., Felízón B. & Heredia A. (1994) Aprovechamiento de hemicelulosas en subproductos de aceitunas. En: III Congreso Internacional de química de la Anque. Vol. II. pp. 31-36.

- Getting the right mix. Cornell university. <http://compost.css.cornell.edu/calc/rightmix.html>.
- González P.; Ordóñez R.; Giráldez J.V.; García-Ortiz A.; Polo M.J. & Romero A. (2003) Aplicación agrícola de residuos de almazaras con el sistema de dos fases. En: XI Simposium Internacional del aceite de oliva. *Expoliva*. OLI-13.
- Haug R. (1993) The practical handbook of compost engineering. Lewis Publishers, Nueva York.
- Hermoso M., González J., Uceda M., García-Ortiz A., Morales J., Frías L. & Fernández A. (1998) Elaboración de aceite de oliva de calidad. Obtención por el sistema de dos fases. Informaciones técnicas 61/98 Direc. Gral. de Investigación y formación agraria Junta de Andalucía., Seville.
- Madejón E., Galli E. & Tomati U. (1998a) Composting of wastes produced by low water consuming olive mill technology. *Agrochimica* 42:173-183.
- Madejón E., Galli E. & Tomati U. (1998b) Biorremediation of olive mill pomaces for agricultural purposes. *Fresenius Environmental Bulletin* 7: 873-879.
- M.A.P.A. (1994) Métodos oficiales de análisis. Tomo III. Plantas, productos orgánicos, fertilizantes, suelos, agua, productos fitosanitarios y fertilizantes orgánicos. Publicaciones del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid.
- Melgar R. (2003) Posibilidades de valoración agrícola de subproductos generados por la agroindustria del olivar. Tesis doctoral Universidad de Granada. 221 p.
- Sparks D.L. (1996) Methods of soil analysis. Part 3 Chemical Methods. Soil. Sci. Soc. of America, monog. 5, American Society of Agronomy, Wisconsin.
- Zucconi F. & de Bertoldi M. (1987) Compost specifications for the production and characterization of compost from municipal solid waste. In: de Bertoldi, Ferranti M.P., L'Hermite P. and F. Zucconi (Eds). Compost: Production, Quality and use. Comm. of the European Communities. Elsevier Applied Science, London, pp. 30-50.

Temporal evolution of the olive mill pomaces during composting

The high production of olive oil in some regions of Spain, especially in Andalusia, generates an important mass of by-products during the oil-extraction process in the three months period of operation. A strategy is required to avoid the environmental risk of residue dispersal and, at the same time, to return of the exported nutrients to the soil. The most important by-product generated by the olive oil industries is the *alperujo* or olive mill pomaces, a paste of elevated moisture content, above 60%, with high phenolic sugar and pectin content, and C/N ratio, when fresh. With such properties the direct use of *alperujo* as a soil amendment presents some problems, which might be solved through a composting process. A composting trial has been carried out with four different mixtures of *alperujo*, N-enriched substances as manure, organic fertilizer made of blood and feathers, and old *alperujo* compost, and olive tree leaves as moisture absorbers. After two and a half months final product had good quality, high organic matter, reduced levels of heavy metals and standard concentration of nitrogen and potassium in all treatments. The composting process reduced the initial phytotoxicity of the *alperujo* and the C/N ratio. Even though there were not too significant differences among treatments, the mixture of fresh *alperujo*, organic fertilizer and olive tree leaves in the ratio 80:3:17 on a fresh weight basis yielded the best results.

Keywords: Olive mill pomaces - Composting process - Organic amendments

Powerful bio-active compounds from olive mill effluents

Noureddine ALLOUCHE¹, Mongi FEKI², Ines FKI¹ & Sami SAYADI¹

¹ Laboratoire des Bio-Procédés, Centre de Biotechnologie de Sfax, B.P. "K", 3038, Sfax, Tunisie.

² Unité de Chimie Industrielle, École Nationale d'Ingénieurs de Sfax, B.P. "W", 3038, Sfax Tunisie.

Corresponding author; e-mail: sami.sayadi@cbs.mrt.tn.

1. INTRODUCTION

There is an increased preference for natural food ingredients which are generally believed to be safer, more healthy and less subject to hazards than foods containing artificial food additives such as butylhydroxytoluene (BHT) and butylhydroxyanisole (BHA) (Tsuda *et al.*, 1993). Consequently, interest has been growing in finding naturally occurring antioxidants for use in alimentary, cosmetic and pharmaceutical industries as alternative for synthetic antioxidants (Fukumoto & Mazza, 2000). For these reasons, many studies have been carried out and some antioxidative substances have been recovered from natural sources (Duh *et al.*, 1992).

As one potential source, olive mill wastewaters (OMW) stand out as cheap natural effluents. OMW result from the olive oil extraction procedure. These wastes have a high polluting organic load due to a high content of organic substances particularly polyphenols (Sayadi *et al.*, 2000). These phenolic compounds are major contributors to the toxicity and the antibacterial activity of OMW that limits its microbial degradability (Sayadi & Ellouz, 1992). However, these polyphenols, which are present in general in olives, olive oil and olive by-products, are endowed with several biological activities such as antioxidant property (Visioli *et al.*, 1999). Among the phenolic monomers present in OMW, hydroxytyrosol (3,4-dihydroxyphenyl-ethanol) stands out as a product of high added value due to its interesting antioxidant and potential beneficial-human health properties (Visioli *et al.*, 2002). Thus, in view of the current need for upgrading OMW and producing natural antioxidants, a project supported by the European Community was undertaken to recover the active components from OMW.

In this investigation, we summarize the continuous liquid-liquid extraction process of antioxidants from OMW and the purification procedure of hydroxytyrosol published recently (Allouche *et al.*, 2004). This investigation deals also with the antioxidant activities evaluation of OMW continuous extract and purified hydroxytyrosol using the β -carotene bleaching method and by assessing the *in vitro* stabilization of refined husk oil.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Continuous-extraction procedure

Continuous counter-current extraction was conducted at ambient temperature in a polyethylene mixer-settler unit of ROBATEL design (mixer volume: 35 ml; settler volume: 200 ml). The maximum flow rate which could be fed into the battery was 5 l/h. The steady state was confirmed by phenolic monomers analysis in the organic stream and by verification of the mass flow rates balance. This parameter represents the deviation between the total mass flow fed in the battery and that of the recovered phases (raffinate and extract) (Feki *et al.*, 2001). The obtained counter-current extract was stored at 4°C.

2.2. Medium pressure liquid chromatography

The ethyl acetate extract obtained from OMW continuous extraction was evaporated under reduced pressure below 45°C. An aliquot (1 g) of the obtained residue was chromatographed on a C-18 silica gel (LiChroprep RP-18; 25-40 mm) column (2.5 x 70) cm under medium pressure (3 bars). Phenolic compounds elution was carried out with the same gradient solvent used in HPLC. The flow rate was adjusted to 0.3 ml/min and 4.5 ml fractions were collected. The absorbance of each fraction was measured spectrophotometrically at 280 nm.

2.3. Antioxidant activity determination

2.3.1. β -carotene bleaching method

Antioxidant activity was determined in emulsion by the β -carotene bleaching method of Chevolleau *et al.* (1992), consisting in a coupled oxidation of linoleic acid and β -carotene at 50°C. This method was slightly modified. Briefly, an aliquot (1 ml) from β -carotene (1 mg) dissolved in chloroform (10 ml) was pipetted into a flask containing linoleic acid (20 mg) and tween 20 (200 mg). After solvent evaporation, deionised and oxygenated water (50 ml) was then added with a determined amount of polyphenolic sample. Emulsification was performed by vigorous agitation. The mixture was incubated in a rotatory shaker at 50°C and 150 rpm. Antioxidant activity was evaluated by absorbance measurement at 470 nm against a blank containing emulsified linoleic acid without β -carotene. To avoid contamination by heavy metals, all glass equipments were previously immersed for at least 24 hour in EDTA (0.5%; w/v), rinsed several times with deionized water and dried at 150°C.

2.3.2. Antioxidant activity in refined husk oil

Weighed quantities of OMW continuous extract, purified hydroxytyrosol and butylhydroxytoluene (BHT) were dissolved in 1 ml of ethanol, to obtain the desired final molar concentration. Then, they were added to refined husk oil. The phenolic compounds were mixed with oil by stirring for 30 min. Oil samples were stored out of light at 50°C. The stability of oils was evaluated by the measurement of peroxide value.

3. RESULTS AND DISCUSSION

From the qualitative HPLC analysis, it was deduced that the obtained OMW continuous-extract is made mainly of hydroxytyrosol, 3,4-dihydroxyphenyl-acetic acid, tyrosol, para-hydroxyphenyl-acetic acid, caffeic acid, para-coumaric acid and ferulic acid. The different concentrations of the major monomers identified in crude OMW and in the ethyl acetate extract are given in table 1.

Accordingly, hydroxytyrosol is the more abundant phenolic monomer in crude OMW (3.78 g/l). Moreover, the extraction yield is maximal for ortho-diphenolic compounds and especially for hydroxytyrosol. In view of that, 3.503 g of hydroxytyrosol were extracted per liter of OMW resulting in a yield of 92.67%.

Table 1. Quantification of the major phenolic monomers in crude OMW and in the continuous counter-current ethyl acetate extract

Phenolic monomers	Concentration (mg/l)		Extraction yield (%)
	Crude (OMW)	OMW extract	
Hydroxytyrosol	3780	3503	92.67
Tyrosol	198	86	43.43
3,4-dihydroxyphenyl-acetic acid	29	21	72.41
Caffeic acid	86	60	69.76
Para-coumaric acid	35	16	45.71

In order to produce large quantities of highly purified hydroxytyrosol, a medium-pressure chromatographic system was performed using C-18 silica gel. The collected fractions were measured spectrophotometrically at 280 nm. Chromatogram representing optical density at 280 nm versus fraction number was represented (Data not shown). This chromatogram showed five separated peaks. Fractions corresponding to each peak were collected into five different lots. The phenolic monomers constitution of each lot was determined using HPLC analysis. It was noted that lot 2 contained pure hydroxytyrosol. This lot was concentrated and 3 grams of hydroxytyrosol were produced per liter of OMW.

In order to compare the antioxidative activity of the obtained products (OMW continuous extract and purified hydroxytyrosol) with commercial antioxidant BHT, coupled oxidation of β -carotene method was used. The rate of β -carotene bleaching for linoleate system in the presence of the tested samples at 200 ppm is shown in figure 1. Comparing with control sample (without phenolic compounds), all the tested samples exhibited antioxidative activities. Indeed, for the control sample, the amount of β -carotene in the model system decreased drastically and was completely removed after 120 hours. However, in the presence of polyphenols extract, BHT, and hydroxytyrosol, the rate of β -carotene bleaching was inhibited. The curves slopes β -carotene loss per time unit showed that hydroxytyrosol has the most potent effect in preventing β -carotene bleaching, then, in decreasing order: BHT, OMW extract and control.

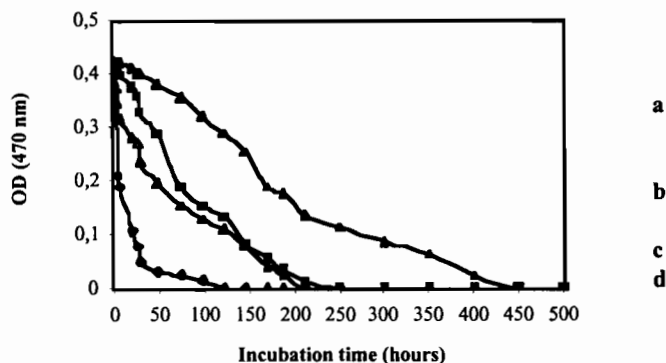


Figure 1. Time course of the B-carotene bleaching in model systems containing: hydroxytyrosol (a); ethyl acetate extract (b); BHT (c); and without added compound (control) (d)

The oxidation of refined husk oil stored at 50°C after the addition of OMW extract, hydroxytyrosol and BHT was measured by peroxide value. This parameter measures the primary product of lipid oxidation. Figure 2 showed that Oils treated with purified hydroxytyrosol and BHT exhibited the lowest peroxide values compared with the control sample. These results indicate that hydroxytyrosol had marked effect on the prevention of refined husk oil autoxidation. Moreover, the addition of the OMW continuous extract at 500 ppm and hydroxytyrosol at 200 ppm had similar effect in retarding oxidation of refined husk oil. Hence, the anti-oxidative efficacy of OMW extract could be directly related to their content in ortho-diphenols such as hydroxytyrosol and 3,4-dihydroxyphenyl-acetic acid.

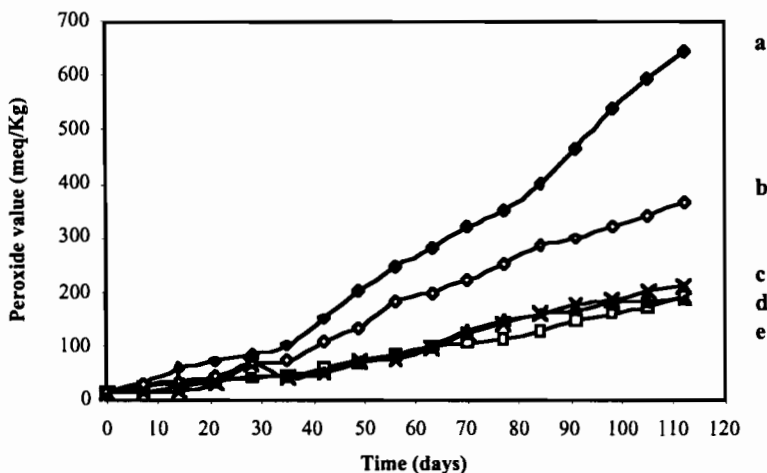


Figure 2. Peroxide values of refined husk oils with added phenolic compounds during storage at 50°C. (a) control, (b) BHT at 200 ppm, (c) extract at 200 ppm, (d) extract at 500 ppm, (e) hydroxytyrosol at 200 ppm

4. ACKNOWLEDGMENT

This research was supported by EEC contract ICA3-CT2002-10033.

5. REFERENCES

- Allouche N, Fki I, Sayadi S (2004) Towards a high yield recovery of antioxidants and purified hydroxytyrosol from olive mill wastewaters. *J. Agric. Food Chem.* 52: 267-273.
- Chevolleau S, Debal A, Ucciani E (1992). Détermination de l'activité antioxydante d'extraits végétaux. *Rev. Fr. Corps Gras* (1/2): 3-8.
- Duh P, Yeh DB, Yen GC (1992) Extraction and identification of an antioxidative component from Peanut Hulls. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 69 (8): 814-818
- Feki M, Stambouli M, Pareau DH, Ayedi F (2001) Study of the multicomponent system wet process phosphoric acid-methyl isobutyl ketone at 40°C phase equilibria and extraction performances. *Chem. Eng. J.* 3932: 1-10.
- Fukumoto LR, Mazza G (2000) Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* 48: 3597-3604
- Sayadi S, Allouche N, Jaoua M., Aloui F (2000) Detrimental effects of high molecular-mass polyphenols on olive mill waste water biotreatment. *Process Biochem.* 35: 725-735.
- Sayadi S, Ellouz R (1992) Decolourization of olive mill waste-waters by *Phanerochaete chrysosporium*, involvement of the lignin degrading system. *App. Microbiol. Biotechnol.* 37: 813-817.
- Tsuda T, Osawa T, Nakayama T, Kawakishi S, Ohshima K (1993) Antioxidant activity of Pea Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) extract. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 70 (9): 909-913
- Visioli F, Romani A, Mulinacci N, Zarini S, Conte D, Vincieri FF, Galli C (1999) Antioxidant and other biological activities of olive mill waste waters. *J. Agric. Food Chem.* 47: 3397-3401.
- Visioli F, Poli A, Galli C (2002) Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. *Medi. Res. Reviews.* 22 (1): 65-75.

Powerful bio-active compounds from olive mill effluents

In this study, particular emphasis was made to extract and purify hydroxytyrosol from olive mill wastewaters (OMW). Using optimized experimental conditions, high yield (92.67%) recovery of hydroxytyrosol was achieved from OMW using a three-staged continuous counter-current liquid-liquid extraction unit. Three gram of hydroxytyrosol per liter of OMW were then purified by means of a chromatographic system which could be adapted to a large scale production process. The antioxidative activities of the OMW ethyl acetate extract as well as the purified hydroxytyrosol were tested on refined husk oil and using the β -carotene linoleate model system. Accordingly, OMW extract exhibited appreciable antioxidant activity and hydroxytyrosol has the highest activity comparing with butylhydroxytoluene (BHT) even at low concentration. Results indicate also that hydroxytyrosol had a marked effect on the retardation of refined husk oil auto-oxidation.

Isolement d'une nouvelle espèce bactérienne du genre *Bacillus*, transformant le *p*-hydroxyphényléthanol en acide *p*-hydroxyphénylacétique à partir de saumures d'olives tunisiennes

Slim ABDELKAFI^{1,2}, Mohamed CHAMKHA¹, Laurence CASALOT²,
Jean LORQUIN², Sami SAYADI¹ & Marc LABAT²⁰

¹ Laboratoire des Bio-Procédés, Centre de Biotechnologie de Sfax, Route de Sidi Mansour Km 6, 3038 BP « K », Sfax, Tunisie

² Unité de Biotechnologie Microbienne Post-Récolte, Laboratoire de Microbiologie IRD-LMI, IFR86-IBAIM, Universités de Provence et de la Méditerranée, ESIL case 925, 163, avenue de Luminy, 13288 Marseille cedex 9, France

◊ Auteur correspondant, courriel: labat@esil.univ-mrs.fr

1. INTRODUCTION

La fermentation des olives de table peut être réalisée en présence de concentrations élevées de NaCl comprises entre 100 à 140 g/l ou en présence de concentrations moyennes de NaCl (60 à 76 g/l) (MSF) (Borcakli *et al.*, 1993; Özay & Borcakli, 1995).

De nombreuses structures phénoliques plus ou moins complexes ont été retrouvées dans les différentes parties de l'olivier et notamment l'olive fruit ou ses sous-produits (Labat *et al.*, 2000). Plusieurs composés phénoliques ont été également identifiés dans les olives de table, il s'agit de tyrosol-acétate, hydroxytyrosol-acétate, tyrosol, hydroxytyrosol, l'acide vanillique, vanilline, l'acétoxy-pinorésinol, pinorésinol, catéchol,... (Romero *et al.*, 2004a). Des modifications structurales de certains composés phénoliques sont produites durant le traitement des olives de table et affectent les propriétés organoleptiques du produit (Romero *et al.*, 2004b).

On s'est intéressés à isoler à partir du sous-produit de fermentation des olives, des bactéries halophiles et/ou halotolérantes capables de réaliser la bioconversion du *p*-hydroxyphényléthanol, un composé répandu dans les saumures d'olives (Romero *et al.*, 2004b) et d'envisager par la suite des applications biotechnologiques.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. Milieu de culture

Le milieu de culture utilisé est composé de: KH₂PO₄: 0.4 g/l; NH₄Cl: 0.5 g/l; NaCl: 50 g/l; MgCl₂·6H₂O: 0.33 g/l; CaCl₂: 0.05 g/l; extrait de levure 1 g/l; tyrosol: 5 mM; solution d'oligo-éléments (Imhoff-Stuckle et Pfenning): 1 ml. Le pH est ajusté à 7.

2.2. Isolement et conservation des souches

Les souches bactériennes ont été isolées à partir du sous-produit de fermentation des olives de table. Les enrichissements ont été réalisés en présence de 50 g/l NaCl et 5 mM de tyrosol, sur le milieu dont la composition est mentionnée ci-dessus. Des repiquages successifs sur milieu solide ont permis d'isoler neuf souches. L'ensemble des souches est conservé au laboratoire, dans le glycérol à 10% (v/v) et à -80°C.

2.3. Étude phylogénétique

L'analyse phylogénétique a été réalisée par comparaison de la séquence d'ADN codant pour la sous-unité 16S de l'ARN ribosomal (ARNr-16S). Après extraction de l'ADN génomique bactérien, une amplification de la région de l'ADN codant pour la sous-unité 16S de l'ARN ribosomal (ARNr-16S) de la bactérie a été réalisée par PCR. Le produit de la PCR est purifié et cloné dans le vecteur pGEM-T Easy Vector Systems (Promega). Les plasmides résultants sont transformés dans des cellules compétentes d'*Escherichia coli*, JM109.

La sélection des colonies d'intérêt est rapide et facile car elles présentent une coloration blanche sur le milieu de sélection LB-Amp-X-Gal-IPTG. Ces colonies sont prélevées et re-suspendues dans 20 µL d'eau stérile pour faire la PCR sur colonies. La purification des plasmides est réalisée à l'aide du kit de purification Wizard Plus SV Minipreps (Promega). Les séquençages sont effectués par la société Genome Express (Grenoble), selon la méthode de Sanger, améliorée par l'utilisation de fluorochromes (méthode Big Dye Terminators).

À partir de ces résultats, le positionnement phylogénétique est déterminé de la manière suivante: les recherches de similitudes entre les séquences d'ADN codant pour l'ARNr 16S et une banque d'ADN (Genbank) se fait par l'intermédiaire du programme BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) disponible sur le site INFOBIOGEN (<http://www.genome.infobiogen.fr/>). Le but de cette étape est d'affilier l'isolat étudié à un groupe taxonomique. À partir du fichier de séquences alignées, un arbre phylogénétique est réalisé selon la méthode de construction implémentée dans le logiciel TREECON 1.3b. (<http://www.psb.rug.ac.be/bioinformatics/psb/Userman/treeconw.html>).

2.4. Composition en (G+C)%

La composition en (G+C)% est déterminée selon la méthode HPLC (Mesbah *et al.*, 1989).

3. RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

3.1. Isolement et caractérisation physiologique

Les enrichissements réalisés sur 5 mM p-hydroxyphényléthanol en présence de 50 g/l NaCl et des repiquages successifs sur milieu solide ont permis d'isoler à partir des saumures d'olives, neuf souches distinctes, dont l'une d'elles, la souche YAS1, a été caractérisée. Cette souche YAS1 est une bactérie aérobie, halotolérante, Gram positif et sporulée. Les études physiologiques montrent que les conditions optimales de croissance de la souche YAS1 sont: une température de 37°C un pH de 7 et une concentration en NaCl de 50 g/l.

3.2. Caractérisation phylogénétique

La composition en (G+ C)% est de 49,9 mol %. Les analyses phylogénétiques, basées sur la séquence de l'ADN ribosomal de la sous-unité 16S, montrent que la souche YAS1 est phylogénétiquement reliée à des espèces du genre *Bacillus* (Figure 1).

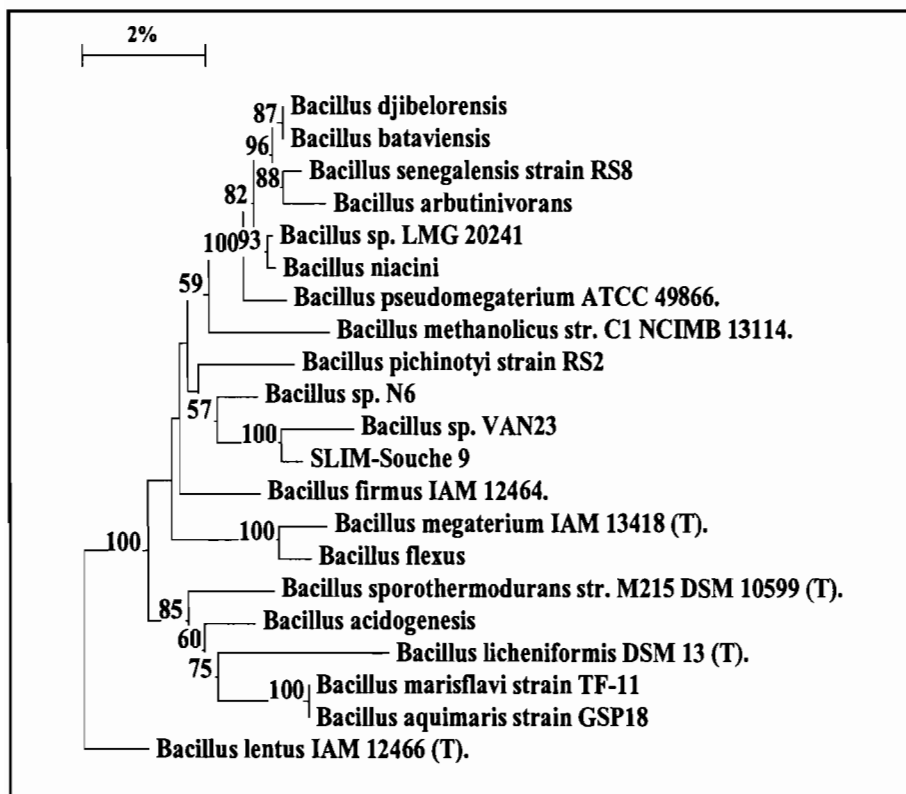


Figure 1. Dendrogramme montrant la position phylogénétique de la souche YAS1, nouvelle espèce du genre *Bacillus*

Erratum: Lire *Bacillus* YAS1 au lieu de SLIM-souche 9

L'analyse de ces séquences révèle une similitude inférieure à 97% avec les souches les plus proches. Sur la base de ces caractéristiques phénotypiques et phylogénétiques, la souche YAS1 est identifiable comme une nouvelle espèce du genre *Bacillus*.

3.3. Métabolisme du *p*-hydroxyphényléthanol

L'étude du métabolisme montre que la souche YAS1 réalise la transformation totale de 5 mM du *p*-hydroxyphényléthanol en présence de 50 g/l NaCl, après 10 heures de culture sans clivage ultérieur du cycle aromatique. Les analyses par HPLC (Chamkha *et al.*, 2001) et LC-MS en mode négatif montrent que le *p*-hydroxyphényléthanol est transformé en acide *p*-hydroxyphénylacétique (Figures non représentées).

4. CONCLUSION

La souche YAS1 isolée à partir de saumures d'olives est identifiée comme étant une nouvelle espèce du genre *Bacillus*. Elle est capable de transformer complètement en présence de 50 g/l NaCl, 5 mM de *p*-hydroxyphényléthanol en acide *p*-hydroxyphénylacétique après 10 heures de culture sans clivage ultérieur du noyau aromatique.

5. REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient l'IRD pour le soutien financier de la thèse de S. ABDELKAFI en co-tutelle entre l'IRD et le CBS.

6. RÉFÉRENCES CITÉES

- Brocakli M, Özyay G & Alperden I (1993) Fermentation of Turkish black olives with traditional and aerated systems. In "Food Flavours, Ingredients, and Composition", Charalambous, Ed., Elsevier Science Publisher, B.V. pp. 265-277
- Chamkha M, Labat M, Patel BKC & Garcia JL (2001) Isolation of a cinnamic acid metabolizing *Clostridium glycolicum* from oil mill wastewaters and emendation of the species description. *Int J. Syst. Evol. Microbiol* 51: 2049-2054
- Labat M, Augur C, Perraud-Gaime I, Rio B, Roussos S & Sayadi S (2000) Biotechnological potentialities of polyphenolic compounds of coffee and comparison with olives. In: Sera T, Soccol C, Pandey A, Roussos S (Eds) « Coffee Biotechnology and Quality » pages 517-531, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Mesbah M, Premachandran U & Whitman WB (1989) Precise measurement of the G+C content liquid chromatography. *Int J. Syst. Bacteriol.* 39: 159-167
- Özyay G & Brocakli M (1995) Effect of brine replacement and salt concentration on the fermentation of naturally black olives. *Food Res. International.* 28: 553-559
- Romero C, Brenes M, Yousfi K, Garcia P, Garcia A & Garrido A (2004a) Effect of cultivar and processing method on the contents of polyphenols in table olives. *J. Agric. Food Chem.* 52: 479-484
- Romero C, Brenes M, Yousfi K, Garcia P, Garcia A & Garrido A (2004b) Polyphenol changes during fermentation of naturally black. *J. Agric. Food Chem.* 52: 1973-1979

Isolement d'une nouvelle espèce bactérienne du genre *Bacillus*, transformant le *p*-hydroxyphényléthanol en acide *p*-hydroxyphénylacétique à partir de saumures d'olives tunisiennes

Une bactérie halotolérante, aérobie, Gram positif et sporulée (souche YAS1) a été isolée à partir du sous-produit de fermentation des olives de table (Industrie Chawatt, Tunisie), après des enrichissements sur 5 mM de *p*-hydroxyphényléthanol en présence de 50 g/l de NaCl. Les analyses physiologiques et phylogénétiques montrent que la souche YAS1 est une nouvelle espèce du genre *Bacillus*. L'originalité de cette souche YAS1 concerne sa capacité à réaliser la bioconversion d'au moins un des composés aromatiques présents dans les fûts de saumures d'olives, et ceci malgré la présence de teneur élevée en NaCl (150 g/l). En effet, cette souche YAS1 est capable de réaliser une bioconversion totale du *p*-hydroxyphényléthanol (5 mM) en acide *p*-hydroxyphénylacétique, après 10 heures de culture, mais sans dégradation ultérieure du noyau aromatique.

Conversion des tanins par *Lactobacillus plantarum*

Lamia AYED¹, Nada BEN OTHMAN¹, Nedra ASSAS¹, Mohamed HAMMAMI²
& Moktar HAMDİ¹°

¹ UR-Procédés Microbiologiques et Alimentaires, Institut National des Sciences Appliquées et de la Technologie (INSAT), BP 676, 1080 Tunis, Tunisie

² Laboratoire de Biochimie et de Spectrophotométrie de Masse, Faculté de Médecine, 5019 Monastir-Tunisie

° Auteur correspondant, courriel: moktar.hamdi@insat.rnu.tn

1. INTRODUCTION

La dégradation des tanins a été tout d'abord étudiée chez les champignons surtout chez *Aspergillus niger* et *Penicillium*. Plus tard, les chercheurs ont commencé à s'intéresser à la dégradation des tanins par les bactéries (Deschamps *et al.*, 1980). Osawa *et al.* (2000) ont été les premiers à isoler des lactobacilles à partir des aliments fermentés dégradant les tanins. Cavin *et al.* (1997) ont montré que *Lactobacillus plantarum* est capable de décarboxyler les acides p-coumariques et feruliques en dérivés 4-vinyles.

Quand les composés phénoliques sont présents dans les aliments et les intestins, les bactéries lactiques semblent jouer un rôle important parce qu'elles permettent leur hydrolyse et diminuent ainsi leur adsorption aux cellules. Au cours de ce travail, on a essayé d'élucider l'action de *Lactobacillus plantarum* sur les tanins. L'effet des différentes concentrations de chaque tanin sur la croissance de *Lb. plantarum* ainsi que l'action de la bactérie sur ces composés ont été déterminés.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. Matériel biologique

Lb. plantarum a été isolé à partir des olives fermentées. Les colonies obtenues après 24 heures de culture sur LAPTg, sont conservées dans le même milieu mais liquide en présence de glycérol 20% (v/v) à - 40°C.

2.2. Culture de *Lb. plantarum* sur milieux synthétiques supplémentés en tanins

Des cultures de *Lactobacillus plantarum* sont réalisées sur des milieux synthétiques contenant chacun un tanin de nature différente: un tanin hydrolysable (l'acide tannique), un tanin condensé (la catéchine) et une anthocyane (la quercétine).

Le milieu de culture utilisé pour étudier la capacité de ce lactobacille à dégrader les tanins est réparti dans des flacons bouchés et stérilisés par autoclavage après avoir ajusté le pH à 6 à l'aide d'une solution de NaOH (1 N).

Les tanins sont mélangés avec une solution de tampon citrate (0,05 M, pH 6), stérilisés par filtration à l'aide de seringues millipores (0,45 µm) et ajoutés aux milieux pour obtenir les concentrations recherchées. Les solutions obtenues sont ensemencées avec des colonies âgées de 18 heures et incubés à 37°C pendant une semaine.

2.3. Analyse des polyphénols par chromatographie en phase gazeuse (CPG) couplée à un spectromètre de masse (SM)

L'extraction des polyphénols est réalisée à l'acétate d'éthyle. Après extraction, 200 µl d'échantillons sont mélangés avec 50 µl de bis-(triméthylsilyl)-trifluoroacétamide (BSTFA) et 50 µl de triméthylsilyl (TMS). Ensuite, le mélange obtenu est chauffé pendant une heure à 60°C et évaporé sous azote.

L'analyse des polyphénols par CPG - SM a été effectuée au moyen d'un appareil du type HP 5872 A, équipé d'une colonne capillaire HP5MS de 30 cm de long, 0,32 mm de diamètre interne et de 0,32 µm d'épaisseur. Le gaz vecteur est l'hélium (He) avec un débit de 1,7 ml/min. Le programme de température adopté est le suivant: 1 mn à 100°C, de 100 à 260°C à 4°C/min et 10 min à 160°C.

3. RÉSULTATS ET DISCUSSION

Lactobacillus plantarum est cultivé sur des milieux synthétiques contenant chacun une concentration variant de 1 à 5 g/l de chaque composé phénolique.

Les résultats obtenus montrent que l'effet de la concentration des tanins sur la croissance de *Lactobacillus plantarum* varie selon leur nature (Tableau 1). La bactérie n'a pas été inhibée par les concentrations d'acide tannique utilisées et elle a supporté la présence de 2 g/l de quercétine dans le milieu. Cependant, elle a été inhibée en présence de 1 g/l de catéchine.

Tableau 1. Effet des différentes concentrations des composés phénoliques sur la croissance de *Lactobacillus plantarum*

Croissance bactérienne (DO à 600 nm).....					
Tanin (g/l)	0	1	2	3	4	5
Acide tannique	0.6	0.59	0.57	0.53	0.48	0.42
Catéchine	0.6	-	-	-	-	-
Quercétine	0.6	0.41	0.28	-	-	-

L'analyse par CPG-SM des extraits d'acétate d'éthyle du milieu inoculé contenant initialement 5 g/l d'acide tannique et de celui contenant initialement 2 g/l de quercétine après six jours d'incubation sont représentés respectivement par les figures 1 et 2.

L'acide tannique a été hydrolysé en glucose et en acide gallique grâce à la libération dans le milieu de l'enzyme extracellulaire: la tannase (Ayed & Hamdi, 2002). L'acide gallique a été ensuite décarboxylé en pyrogallol sous l'action de la gallate décarboxylase.

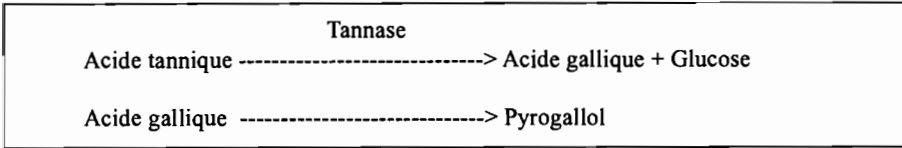


Figure 1. Mécanisme de dégradation de l'acide tannique par *Lactobacillus plantarum*

La quercétine a été transformée en catéchol, pyrogallol et 3-4 dihydroxyphényl acétate comme suit :

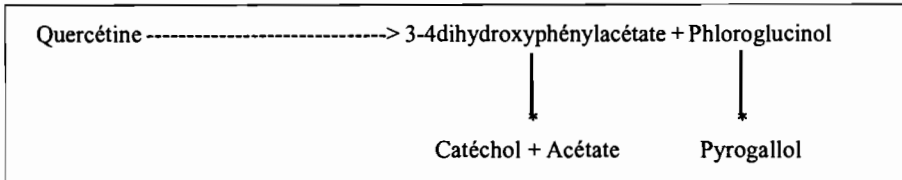


Figure 2. Mécanisme de dégradation de la quercétine par *Lactobacillus plantarum*

La biodégradation des composés phénoliques par *Lactobacillus plantarum* a été exploitée pour la décoloration des margines (Ayed & Hamdi, 2003).

4. CONCLUSION

Lactobacillus plantarum a supporté de fortes concentrations d'acide tannique. La biodégradation de l'acide tannique a impliqué la biosynthèse d'une enzyme extracellulaire appelée tannase. La décarboxylation de l'acide gallique est le résultat de la production de la gallate décarboxylase. La quercétine a été hydrolysée, mais les enzymes impliquées n'ont pas été identifiées.

5. RÉFÉRENCES CITÉES

- Ayed L, Hamdi M (2002) Culture conditions of tannase production by *Lactobacillus plantarum*. *Biotechnol. Lett.* 24(21): 1763-1765.
- Ayed L, Hamdi M (2003) Fermentative decolorization of Olive Mill Wastewater by *Lactobacillus plantarum*. *Process Biochem.* 39: 59-65.
- Cavin JF, Barthelmebs L, Diviès C (1997) Molecular characterization of an inducible p-coumaric acid decarboxylase from *Lactobacillus plantarum*: gene cloning, transcriptional analysis, over expression in *Escherichia coli*, purification and characterization. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 1939-1944.

Deschamps AM, Mohudeau G, Conti M, Lebeault JM (1980) Bacteria degrading tannic acid and related compounds. *J. Ferment. Technol.* 58: 93-97.

Osawa R, Kuroiso K, Goto S, Shimizu A (2000) Isolation of tannin-degrading lactobacilli from humans and fermented foods. *App. Environ. Microbiol.* 66: 3093-3097

Contribution à l'étude des effets protecteur et conservateur de quelques extraits d'olive et de composés phénoliques purifiés des margines

Ines FKI¹ & Sami SAYADI^{1*}

¹ Laboratoire des Bio-procédés, Centre de Biotechnologie de Sfax (CBS), BP: « K », 3038, Sfax, Tunisie

* Auteur correspondant, e-mail: sami.sayadi@cbs.rnrt.tn

1. INTRODUCTION

La consommation mondiale d'huile d'olive augmente régulièrement chaque année du fait de la popularité croissante des aliments de bonne qualité diététique (Delplanque *et al.*, 1999). L'augmentation de la production d'huile d'olive entraîne une augmentation des effluents parmi lesquels on distingue les margines. Celles-ci sont fortement chargées en matières organiques et très riches en composés phénoliques (Allouche *et al.*, 2004). La faible biodégradabilité des polyphénols fait des margines un effluent très polluant pour l'environnement. Toutefois, il est à noter que certains composés phénoliques contenus dans ces margines sont dotés de plusieurs activités biologiques et surtout l'activité antioxydante (Galli & Visioli, 1999).

L'oxydation des lipides est un des principaux problèmes auxquels l'industrie alimentaire doit faire face. Plusieurs précautions peuvent être prises afin de réduire la dégradation oxydative des aliments, comme, par exemple, le stockage à basse température, la conservation sous vide et en absence de lumière. Cependant, l'utilisation d'antioxydants s'avère presque toujours nécessaire (Loliger, 1991).

Les produits de synthèse comme le Butyl-hydroxyanisole (BHA) et le Butyl-hydroxytoluène (BHT), couramment employés en industrie alimentaire, sont très efficaces en tant qu'antioxydants. Ils présentent, cependant, des risques de toxicité et/ou de cancérogénicité, et leur utilisation est réglementée de façon très stricte dans plusieurs pays (Wanasundara & Shahidi, 1998). Le consommateur est à la recherche d'une alimentation saine et naturelle et préfère les aliments ne contenant pas d'additifs de synthèse. Les extraits végétaux qui présentent un pouvoir antioxydant intéressant sont, pour la plupart, riches en flavonoïdes. Or, ces substances ont une activité antiradicalaire libre qui s'exprime aussi bien au niveau de la protection d'un aliment contre l'oxydation qu'au niveau de la protection des cellules animales contre le vieillissement et le cancer. L'intérêt de ces extraits est donc double et la recherche de sources d'antioxydants naturels s'est développée de façon importante ces dernières années (Moure *et al.*, 2001). Les margines représentent une source potentielle de composés phénoliques naturels.

Dans ce travail, on s'est proposé de déterminer le pouvoir antioxydant de certaines molécules phénoliques présentes dans ce rejet. La capacité antioxydante de chaque composé a été déterminée soit par le biais de tests rapides comme celui qui est basé sur l'utilisation de l'acide linoléique et du bêta-carotène en milieu aqueux, soit en suivant l'oxydation des huiles raffinées.

2. RÉSULTATS ET DISCUSSION

2.1. Extraction et identification de la fraction monomérique des margines

La perméation sur gel P-6 des margines brutes montre qu'elle renferme trois familles de composés phénoliques:

- Les polyphénols ayant une masse moléculaire supérieure à 6 kDa.
- Les oligomères ayant une masse moléculaire comprise entre 6 kDa et 152 Da.
- Les monomères ayant une masse moléculaire de l'ordre de 152 Da.

Afin d'extraire la fraction monomérique, trois volumes d'acétate d'éthyle ont été utilisés pour un volume de margine brute. L'extrait obtenu est concentré par rotavapor et analysé par HPLC (Figure 1).

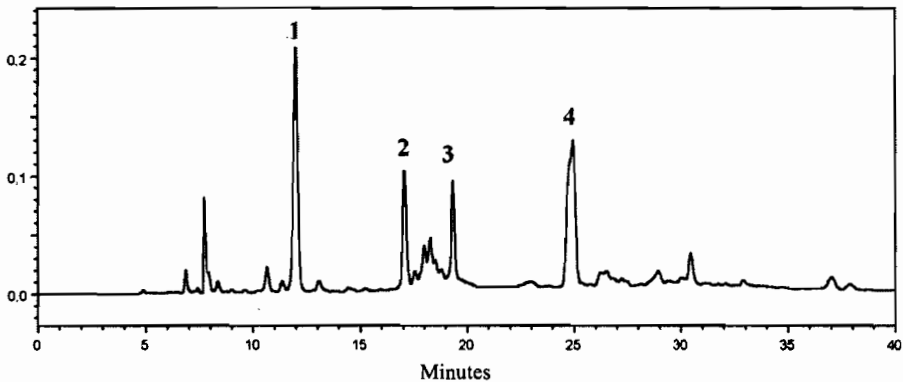


Figure 1. Analyse par HPLC de la fraction monomérique des margines

1. Hydroxytyrosol; 2. Tyrosol; 3. Acide para-hydroxyphénylacétique; 4. Acide para-coumarique; 5. Acide férulique

L'analyse par HPLC de l'extrait des margines montre la présence de plusieurs monomères phénoliques. L'hydroxytyrosol et l'acide *p*-hydroxyphénylacétique sont présents en forte concentration, alors que le tyrosol, l'acide *p*-coumarique, l'acide férulique et l'acide 3,4-dihydroxyphénylacétique sont présents à des concentrations plus faibles (Tableau 1).

Tableau 1. Concentration des composés phénoliques dans l'extrait de margines

Monomères phénoliques	Concentration mg / l
Hydroxytyrosol	1225,33
Tyrosol	198,56
Acide 3,4-dihydroxyphénylacétique	70,22
Acide <i>p</i> -hydroxyphénylacétique	467,331
Acide <i>p</i> -coumarique	70,22
Acide férulique	169,40

2.2. Mesure de l'activité antiradicalaire des composés phénoliques extraits des margines ¹⁰

L'activité antiradicalaire a été évaluée grâce au test au DPPH (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl). Ce composé, stable sous forme radicalaire, se décolore sous l'action de produits détruisant les radicaux libres, permettant ainsi d'évaluer une activité antiradicalaire grâce à une simple mesure colorimétrique. Les résultats sont reportés dans le tableau 2.

Tableau 2. Activité antiradicalaire des composés phénoliques

Composés phénoliques	IC ₅₀ µg/ml
Hydroxytyrosol	0,57
Extrait des margines	1,20
Acide férulique	1,21
Tyrosol	10,85
Acide 3,4-dihydroxyphénylacétique	12,20
Acide <i>p</i> -coumarique	9,50
BHA	0,89
BHT	0,91

La comparaison des valeurs IC₅₀ obtenus montre une forte activité antiradicalaire de l'hydroxytyrosol par rapport à celle du BHA et BHT, alors que le tyrosol représente une activité très faible. Le pouvoir antiradicalaire important de l'extrait (IC₅₀ = 1,2) peut être attribué à la présence de l'hydroxytyrosol.

2.3. Étude du pouvoir antioxydant des composés phénoliques en milieu aqueux

Le pouvoir antioxydant des composés phénoliques a été étudié selon la technique basée sur l'oxydation du β-carotène par le radical peroxylinoléique. En effet, en milieu aqueux et en présence d'oxygène, l'acide linoléique génère des radicaux libres. Ces derniers attaquent le β-carotène. Il s'ensuit une déconjugaison et une décoloration de ce dernier qu'on peut suivre via la mesure de l'absorbance à 460 nm et à 232 nm.

Le suivi de la décoloration du β -carotène faite via l'absorbance à 460 nm (Figure 2a) montre une stabilité parfaite dans le cas de l'hydroxytyrosol, équivalente à celle du BHT. Par contre, dans le cas de l'extrait, la déconjugaison du β -carotène est plus ou moins lente. Cependant, la diminution de l'absorbance est très rapide pour le témoin et le tyrosol.

Le suivi de l'apparition des diènes conjuguées à 232 nm (Figure 2b) montre que l'absorbance est constamment stable en présence d'hydroxytyrosol, de BHA, de BHT et d'extrait. Ceci reflète bien le pouvoir antioxydant de ces composés. Cette activité n'est pas vérifiée pour le témoin et le tyrosol.

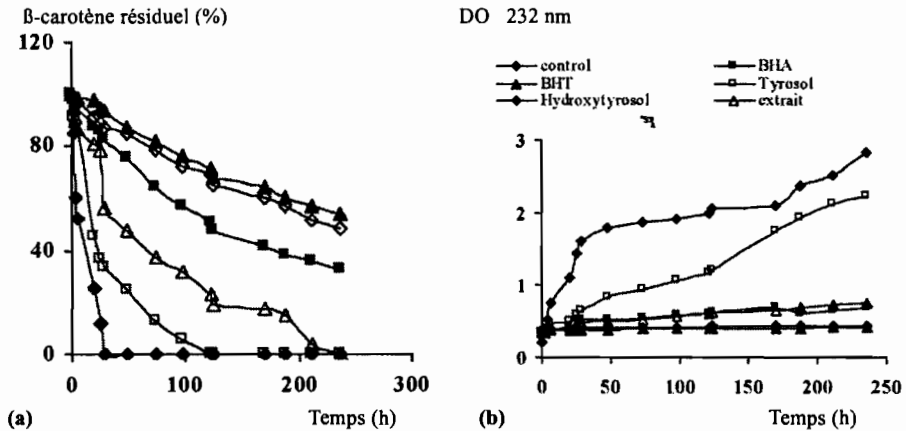


Figure 2. Évolution de l'absorbance à 460 nm (a) et à 232 nm (b) au cours de l'oxydation de l'acide linoléique/ β -carotène en présence de différents composés phénoliques

La formation lente des diènes conjugués et en conséquence les produits secondaires dans le cas d'hydroxytyrosol, BHT, BHA et l'extrait indiquent que ces composés agissent comme des donneurs d'hydrogène au radical peroxy, d'où le retard de l'oxydation de l'acide linoléique par terminaison de la chaîne radicalaire.

Les tests accélérés du pouvoir antioxydant montrent que l'hydroxytyrosol présent dans les margines est doté d'une activité antioxydante et antiradicalaire égale et même supérieure à celle des antioxydants de synthèse (BHA et BHT). Au vu de ces premiers résultats, il apparaît intéressant de vérifier un tel pouvoir sur le retardement d'oxydation des huiles raffinées.

2.4. Étude de la stabilité des huiles raffinées par les composés phénoliques

Le suivi du degré d'oxydation des huiles est effectué en mesurant, au cours du temps, l'indice de peroxyde et l'extinction spécifique à 232 nm et 270 nm.

2.4.1. Étude de la stabilité des huiles raffinées par l'extrait des margines

Le suivi de l'indice de peroxyde des huiles d'olives et de grignons raffinées (Figure 3) montre qu'à l'extrait présent à une concentration de 200 ppm correspond

un indice de peroxyde équivalent à celui du témoin alors qu'à une concentration de 500 ppm, l'extrait permet de réduire l'indice de peroxyde de l'ordre de 70%. Ceci prouve que l'augmentation de la concentration des composés phénoliques permet le retardement oxydatif des huiles raffinées.

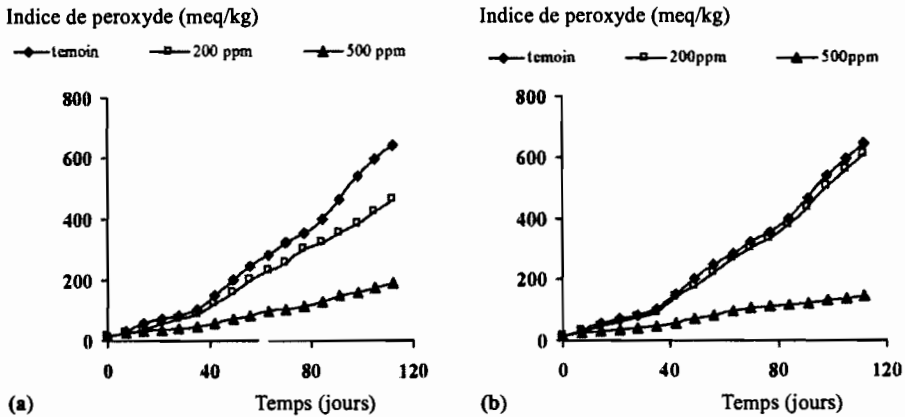


Figure 3. Suivi de l'Indice de peroxyde des huiles de grignon (a) et d'olive (b) raffinées à 50°C

2.4.2. Étude de la stabilité des huiles raffinées par les composés phénoliques

L'étude de la stabilité des huiles raffinées a permis de comparer l'effet des différents monomères phénoliques sur le retardement de l'oxydation des huiles de grignons et d'olives raffinées.

L'évolution de l'indice de peroxyde (Figure 4) permet de classer les molécules testées en 3 groupes:

- Les antioxydants qui conduisent à un indice de peroxyde équivalent au témoin après 16 semaines d'oxydation: il s'agit du tyrosol. Ces molécules ne présentent pas d'intérêt d'emploi dans les huiles raffinées.
- Les antioxydants qui permettent de réduire l'indice de peroxyde de 10% par rapport au témoin. Ce groupe renferme le BHA.
- Les antioxydants les plus efficaces qui permettent de réduire l'indice de peroxyde de 65 à 70% par rapport au témoin: par ordre décroissant, on trouve l'hydroxytyrosol et le BHT.

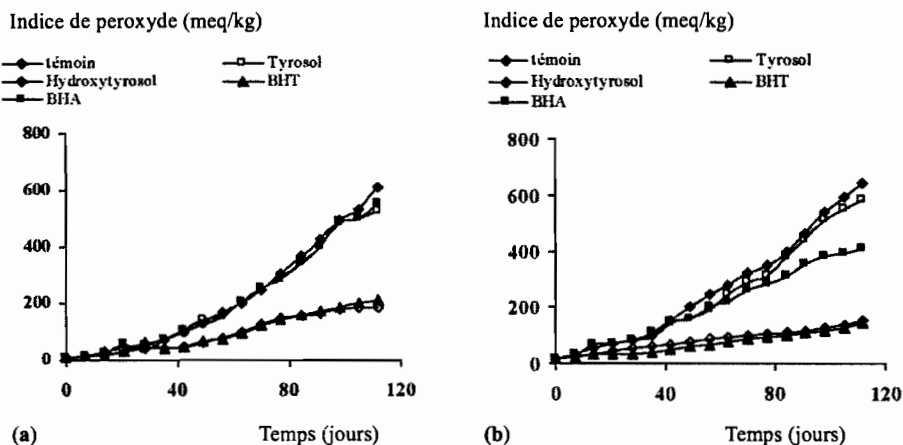


Figure 4. Suivi de l'Indice de peroxyde des huiles de grignon (a) et d'olive (b) raffinées à 50°C

3. REMERCIEMENTS

Ce travail a été financé par le projet Inco-med NewtechOMW contrat: ICA3-CT2002-10033 et Contrats Programmes SERST (Tunisie).

4. RÉFÉRENCES CITÉES

- Allouche N., Fki I. & Sayadi S. (2004) Toward a high yield recovery of antioxidants and purified hydroxytyrosol from olive mill wastewaters. *J. Agri. Food Chem.* 52: 267-273
- Delplanque B., Jusselin I., Le Roy B. & Motta C. (1999) Intérêt nutritionnel des huiles d'olive. *Oléagineux corps gras lipides.* 6: 86-93
- Galli C. & Visioli F. (1999) Antioxidant and other properties of phenolics in olives/olive oil, typical compounds of the Mediterranean diet. *Lipids.* 34: S23-S26
- Loliger J. (1991) Use of antioxidants in food. In *Free radicals and Food Additives*. Edited by O.I. Arouma and B. Halliwell, pp. 121-150. Taylor Francis, London
- Moure A., Cruz J.M., Franco D., Dominguez M., Sineiro J., Dominguez H., Nunez M.J., Parajo J.C. (2001) Natural antioxidants from residual sources. *Food Chem.* 72: 145-171
- Wanasundara U. N. & Shahidi F. (1998) Antioxidant and pro-oxidant activity of green tea extracts in marine oils. *Food Chem.* 335-342

Headspace extraction and identification of Tunisian virgin olive oil aroma components

Wissal DHIFI¹, Ibtissem HAMROUNI¹, Ibrahima OUMAR³,
Franca ANGEROSA², Arnaldo SERRAIOCCO², Samih ESHIMI¹,
Amor BELLILA¹, Mohamed Elyes KCHOUK¹ & Brahim MARZOUK¹

¹ Unité des Plantes Aromatiques et Médicinales, Institut National de Recherche Scientifique et Technique (INRST), B.P.95, 2050, Hammam-lif, Tunisie.

² Istituto Sperimentale per La Elaiotecnica, Viale Petruzzi 75, Città S. Angelo, 65013 Pescara, Italie

³ Laboratoire de Biochimie, Faculté des Sciences, Tunis-El Manar, Tunisie

1. INTRODUCTION

Virgin olive oil, a typical Mediterranean product is unique among vegetable oils. It is consumed in its crude state without any refining step thus retaining its minor components. There was a large increase in demand for virgin olive oil of good quality thanks to its health virtues and also to its organoleptic properties (Luaces *et al.*, 2003). When properly extracted from fresh and good quality fruits, olive oil provides a peculiar delicate and unique aroma highly appreciated by consumers (Angerosa *et al.*, 1997; Angerosa *et al.*, 2000).

This aroma results of a complex mixture of volatile compounds (Flath *et al.*, 1973; Fedeli *et al.*, 1973; Olias *et al.*, 1978; 1993). This complex mixture includes aldehydes, alcohols and esters (Ridolfi *et al.*, 2002). It is well established that aliphatic C6 compounds (aldehydes, alcohols and their corresponding esters) are the most abundant compounds of virgin olive oil aroma (Angerosa *et al.*, 1999; Angerosa *et al.*, 2000). They mainly contribute to its green odour notes (Guth & Grosh, 1993; Morales *et al.*, 1996).

Olive oil aroma compounds or volatiles are produced enzymatically from polyunsaturated fatty acids C18:2 and C18:3 through the so-called lipoxygenase (LOX) pathway (Vick & Zimmermann, 1987; Hatanaka, 1993) during the crushing and malaxation steps of oil production (Sanchez & Harwood, 2002). The qualitative and quantitative composition of virgin olive oil aroma depends on several factors. It is tightly dependent on the levels and the activities of enzymes involved in the LOX pathway (Angerosa *et al.*, 1999), these enzyme levels and activities being genetically determined (Angerosa, 2002). It is also closely related to ripening degree, storage time of fruits and to the operative conditions used during olive oil extraction (Angerosa *et al.*, 1995; 1998).

The aim of this work is to ascertain the aroma composition of a Tunisian virgin olive oil: Chetoui.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Oil extraction

Chetoui fruits (*Olea europaea* L.) characterized by healthy state were handpicked at a known ripening degree. Oil was obtained by a cold extraction process using a laboratory mill equipped with a metal crusher, a mixer and a basket centrifuge.

2.2. Volatile compounds extraction

50 g of oil was put into 120 ml Drechsel gas washing bottle with a porous distributor. Volatiles were stripped with nitrogen ($1.2 \text{ dm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$, 37°C) for 2 h, trapped on 50 mg of activated charcoal (0.5-0.85 mm, 20-35 mesh ASTM) from E. Merck (Schuchardt, Germany) and eluted with 1 ml of diethyl ether.

2.3. GC analysis

Gas chromatography was carried out with a HP 6890 chromatograph equipped with a flame ionization detector (FID), an EPC injector and fitted with a polyethylene glycol fused silica capillary column (30 m length; 0.25 mm i.d.; 0.25 μm film thickness). Carrier gas was N_2 and flow rate was $1.6 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. The oven temperature was run at 35°C for 10 min, varied at $3^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ to 205°C holding it there for 10 min. Injector and detector temperatures were held respectively at 250°C and 300°C .

2.4. GC-MS analysis

The identification of volatile compounds was done by GC-MS using a HP model 5890 A, equipped with an on-column injection system, and coupled with a mass selective detector model HP 5970B. Volatile compounds were identified by comparison of their mass spectra with those of authentic reference compounds. This identification was also confirmed by calculation of Kovats indexes of aroma compounds. All analyzes were done in three triplicates and results were expressed as means \pm s.d.

3. RESULTS

In Chetoui oil, the most important aroma components are C6 compounds (aldehydes, alcohols, esters) arising from enzymatic oxidation of linoleic and linolenic acids via the enzymatic pathway called lipoxygenase (LOX) (Figure 1). These compounds also called pleasant volatiles are responsible of the green notes of virgin olive oil (Ranalli *et al.*, 2001; Angerosa *et al.*, 1998). They are formed during crushing and malaxation steps (Sanchez & Harwood, 2002; Angerosa, 2002).

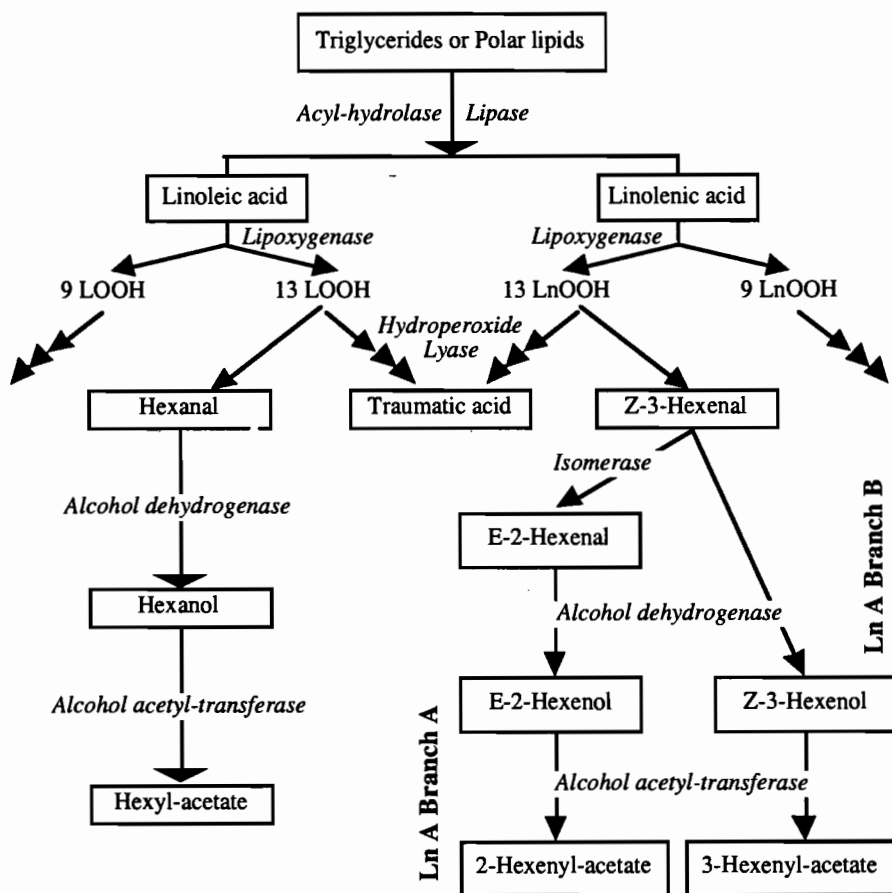


Figure 1. Lipoxygenase pathway in olive

The most representative C6 compounds in Chetoui oil are aldehydes which accounted for 50% of the whole C6 fraction (Figure 2) whereas C6 alcohols and C6 esters accounted respectively for 43 and 7%.

It is important to mention that, the amount of compounds enzymatically produced from the oxidation of linolenic acid (LnA) C18:3 is greater than the amount of those biogenerated from the oxidation of linoleic acid (LA) C18:2 (Table 1).

The LOX LnA part predominates over LA one. Furthermore, the LOX part having LnA as precursor is divided into branches: A and B. So, a particular interest was accorded to metabolites deriving from the former. The compounds generated from the branch A accounted for 77.6% of the totality of C6 compounds from LnA in Chetoui oil (Table 1).

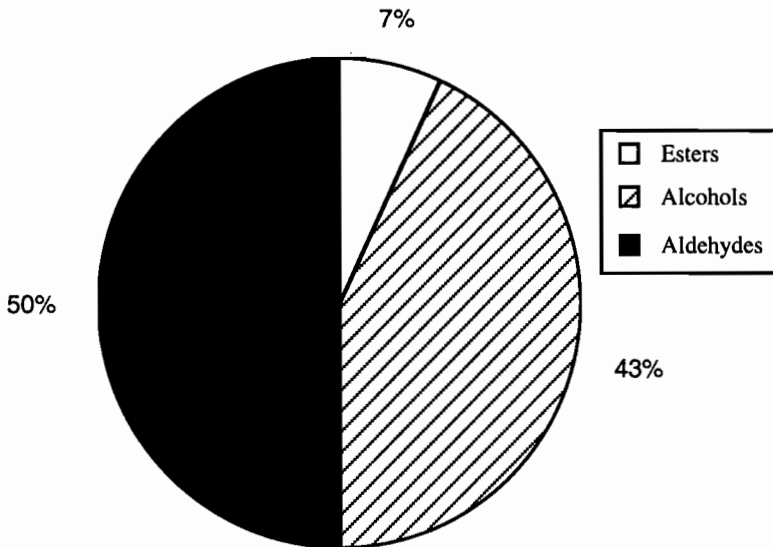


Figure 2. Chetoui virgin olive oil aroma composition

Table 1. Chetoui virgin olive oil whole C₆ fraction composition

Aroma compounds	% of total C ₆ compounds
C6 LA	23.9
C6 LnA	76.1

These compounds are trans-2-hexenal and trans-2-hexenol. Trans-2-hexenal accumulated over trans-2-hexenol in Chetoui cultivar. This puted in evidence the predominance of the isomerization of cis-3-enal forms to trans-2-enal ones in the branch A (Angerosa *et al.*, 1999). Higher level of alcohol acyl transferase (AAT) was evidenced in Chetoui cultivar since the quantity of cis-3-hexenyl acetate is relatively important (Table 2).

Table 2. Amounts of C₆ compounds (ppm of nonan-1-ol) from LOX pathway of Chetoui virgin olive oil

Aroma compounds	Amount (ppm)	Kovats index
Hexanal	19.80 ± 4.0	1099
Hexan-1-ol	19.68 ± 3.51	1358
Hexyl acetate	6.30 ± 1.82	1273
• C6 from LA	45.78 ± 9.27	
Trans-2-hexenal	77.24 ± 6.02	1213
Trans-2-hexenol	35.64 ± 5.54	1411
Cis-3-hexen-1-ol	26.8 ± 2.54	1387
Cis-3-hexenyl acetate	6.3 ± 1.93	1317
• C6 from LnA	145.98 ± 11.05	

4. REFERENCES

- Angerosa F. & Di Giacinto L. (1995) Caratteristiche di qualità dell'olio di oliva vergine in relazione ai metodi di frangitura. Nota II. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse* 72: 1-4
- Angerosa F. (2002) Influence of volatile compounds on virgin olive oil quality evaluated by analytical approaches and sensor panels. *European Journal of Lipid Science and Technology* 104: 639-660
- Angerosa F., Basti C. & Vito R. (1999) Virgin olive oil volatile compounds from lipoxygenase pathway and characterization of some Italian cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 836-839
- Angerosa F., D'Alessandro N., Basti C. & Vito R. (1998) Biogenesis of volatile compounds in virgin olive oil: their evolution in relation to malaxation time. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 2940-2944
- Angerosa F., Di Giacinto L. & D'Alessandro N. (1997) Quantitation of some flavor components responsible for the «green» attributes in virgin olive oils. *Journal of High Resolution Chromatography* 20: 507-510
- Angerosa F., Mostallino R., Basti C. & Vito R. (2000) Virgin olive oil odour notes: their relationships with volatile compounds from the lipoxygenase pathway and secoiridoid compounds. *Food Chemistry* 68: 283-287
- Fedeli E., Baroni D. & Jacini G. (1973) Flavored components of olive oil. Note III. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse* 50: 38-44
- Flath R.A., Forrey R.R. & Guadagni D.G. (1973) Aroma components of olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 21: 948-951
- Guth H. & Grosch W. (1993) A comparative study of the potent odorants of different virgin olive oils. *Fat Science and Technology* 93: 335-339.
- Hatanaka A. (1993) The biogenesis of green odour by green leaves. *Phytochemistry* 34: 1201-1218
- Luaces P., Pérez A.G. & Sanz C. (2003) Role of olive seed in the biogenesis of virgin olive oil aroma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 4741-4745.
- Morales M.T., Calvente J.J. & Aparicio R. (1996) Influence of olive ripeness on the concentration of green aroma compounds in virgin olive oil. *Flavour and Fragrance Journal* 11: 171-178
- Olias J.M., Dobarganes M.C., Guttierrez F. & Guttierrez R. (1978) Volatile components in the aroma of virgin olive oil. II: identification and sensorial analysis of chromatographic eluents. *Grasas y Aceites* 29: 211-218
- Olias J.M., Pérez A.G., Rios J.J. & Sanz L.C. (1993) Aroma of virgin olive oil: biogenesis of the «green» odour notes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41, 2368-2373

- Ranalli A., Contento S., Schiavone C. & Simone N. (2001) Malaxing temperature affects volatile and phenol composition as well as other analytical feature of virgin olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology* 103: 228-238
- Ridolfi M., Terenziani S., Patumi M. & Fontanazza G. (2002) Characterization of the lipoxigenases in some olive cultivars and determination of their role in volatile compounds formation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 835-839
- Sanchez J & Harwood J.L. (2002) Biosynthesis of triacylglycerols and volatiles in olives. *European Journal of Lipid Science and Technology* 104: 564-573
- Vick B.A. & Zimmerman D.C. (1987) Oxidative systems for modification of fatty acids: the lipoxigenase pathway. In PK Stumpf, EE Conn, eds, *The Biochemistry of Plants: A Comprehensive Treatise*, Vol 9. Academic Press, New York, pp. 53-91

Headspace extraction and identification of Tunisian virgin olive oil aroma components

Fruits from a Tunisian cultivar of *Olea europaea* L: Chetoui grown in the North of Tunisia were handpicked and processed with a laboratory mill. The oil was submitted to dynamic headspace and its volatile composition was determined. The results showed that the most important components of Chetoui olive oil aroma are C₆ aldehydes, alcohols, and esters. These compounds are biogenerated from polyunsaturated fatty acids through the lipoxigenase (LOX) pathway. Furthermore, they pointed out the predominance of the oxidation of linolenic (LnA) acid over linoleic (LA) acid. Among aroma compounds, aldehydes are the most abundant. In the predominant part of LOX which is the LnA one, the branch A giving rise to trans-2-hexenal, trans-2-hexenol is more important than the branch B giving rise to cis-3-hexenol and cis-3-hexenyl acetate. This pointed out that the isomerisation of cis-3-enals forms to trans-2-enal ones is the dominant process of the branch B. Trans-2-hexenal is the most important aroma compound of Chetoui virgin olive oil.

Keywords: Virgin olive oil - Aroma - Lipoxigenase (LOX) pathway - C₆ compounds - Aldehydes - Alcohols - Esters

High value compounds from olive mill wastes

Umberto TOMATI, Francesca DI MARIO, Emanuela GALLI
& Pompilio RAPANÀ

Istituto di Biologia Agroambientale e Forestale- CNR, Area della Ricerca di Roma, Via
Salaria Km 29.300, Monterotondo Scalo (Rm), Italy
Corresponding author; e-mail: umberto.tomati@ibaf.cnr.it

1. INTRODUCTION

To prevent or reduce pollution, there is a growing interest in technologies aimed at using recyclable and economically feasible products, such as those obtained from agriculture, as an alternative to mineral and synthetic products. This new approach should develop strategies economically viable for designing environmentally friendly processes for the production of safe products. In this contest, agricultural waste represents an important source of renewable products of great economic and social value that can be considered as a basic material for the extraction of natural compounds and a growth substrate for micro-organisms. Using suitable innovating technologies, these products could represent an economic way to exploit agricultural waste and produce not only soil conditioners but high value chemicals to be used in the fine chemical and food industry.

Olive mill waste is one of the best examples of a complete and profitable exploitation of agricultural waste. The waste produced by the olive mill industry has been considered either as a polluting stream or a resource to be recycled. If considered as a polluting waste, OMW must undergo cleaning before its release in the environment; if considered as a resource, it can be usefully recycled as a soil conditioner, a product to be used in co-combustion processes, and/or a basic material to obtain high value products such as phenols, tocopherols, squalene, extracellular enzymes (polygalacturonase, lipase, laccase, Mn-dependent peroxidase) and polysaccharides from fungal mycelia (Figure 1).

Several National and European research programmes have increasingly focused their attention on OMW recovery. Although land application, composting and co-combustion are the most suitable ways to solve the problem, technologies aimed at obtaining high added value compounds by extraction processes and/or biosynthesis are a very promising field of research.

This paper deals in particular with biotechnologies involving basidiomycetes and their ability to grow on olive mill wastes.

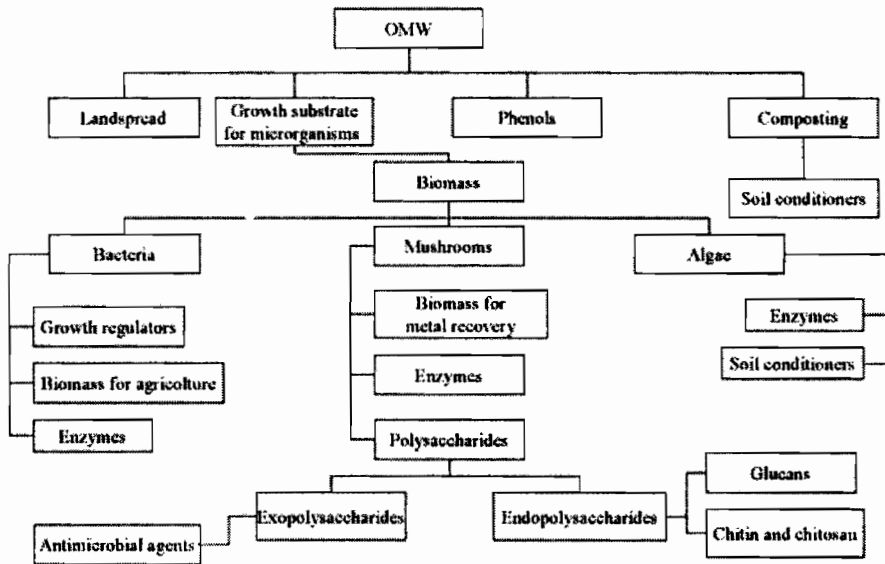


Figure 1. Olive Mill Waste as a resource

2. BASIDIOMYCETE BIOPOTENTIALITIES AND BIOTECHNOLOGIES

The lignocellulose matrix of agricultural by-products and waste represents the natural substrate for saprophytic mushroom growth. Basidiomycete ability to grow on vegetable material has been especially used in mushroom cultivation which is actually their main biotechnological application. Considering Basidiomycetes only as a source of food means underestimating their potentiality in view of recent advances in experimental mycology and mushroom biotechnology. In this field higher Basidiomycetes are even considered as a natural source of valuable biologically active metabolites (Figure 2).

The fungal potentialities are summarised in Figure 3. Obtaining polysaccharides from agro-industrial waste is a valuable perspective. Two main classes of these compounds are here considered: β -glucans, chitin and chitosan. Moreover, the use of mycelial polysaccharides *in toto* is also discussed.

β -D-glucans are a class of particular interest because of their recognised pharmacological properties. These compounds have a common main structure consisting of (1-3) linked glucopyranosyl units (Shida *et al.*, 1978; Mizuno *et al.*, 1998). This particular chemical structure seems to be responsible for the immunomodulating capacity, resulting in antitumor, antibacterial, antiviral, anticoagulatory and wound healing activities (Wagner *et al.*, 1988; Kraus & Franz, 1991; Bohn & BeMiller, 1995).

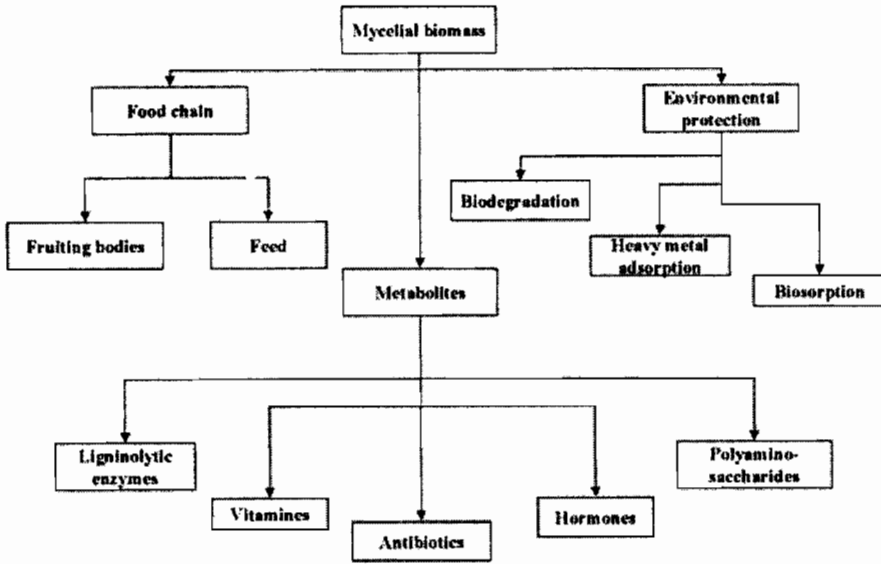


Figure 2. Mycelial biomass as a source of valuable products

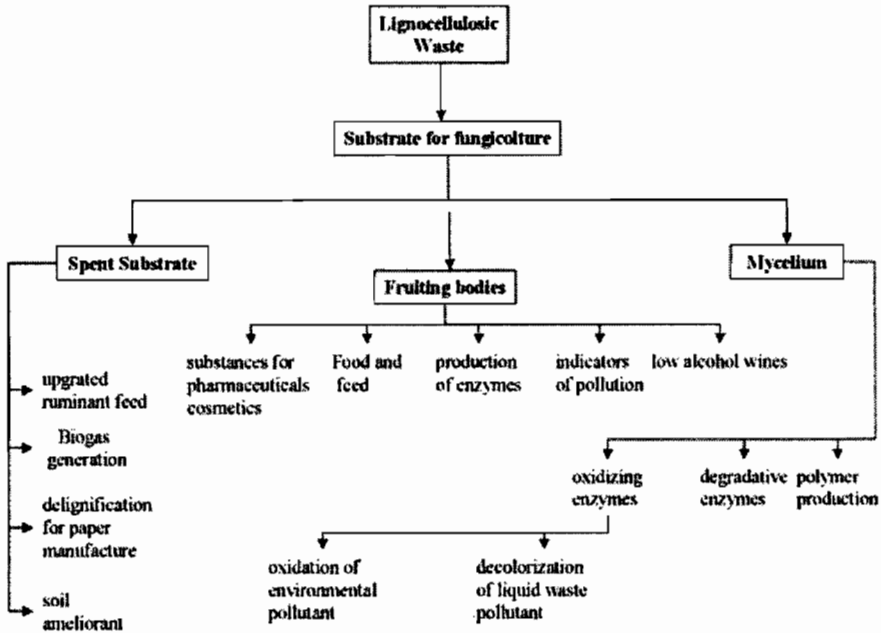


Figure 3. Application of Basidiomycetes to lignocellulose waste recycle

Chitin, a biopolymer composed of -1,4-linked 2-acetamido-2-deoxy-D-glucose residues, and chitosan, the deacetylated chitin, are used in a variety of applications, i.e. cosmetics, pharmaceuticals, agriculture (Hirano, 1996). Today, many Companies

are producing chitin, chitosan and chitosan products on a commercial scale starting from the shells of crustaceans. Basidiomycetes can be proposed as a possible alternative source of chitin and chitosan due to the high content of chitin that varies from 5 to 20% in the cell walls of their mycelia and carpophores (Bartnicki-Garcia, 1989; Bartnicki-Garcia & Nickerson, 1962).

Mycelial polysaccharides are a mixture of different compounds able to adsorb metal cations. That makes them suitable to be used in technologies involving water cleaning and heavy metal recovery (Gadd, 1993; Kalac *et al.*, 1999; Shumate & Strandberg, 1985).

2.1. Mycelial growth on OMW

Oil industry wastes are a suitable source of nutrients for mushroom growth, since they contain lipids, mainly oleic and palmitic acids, that stimulate mycelium growth (Song *et al.*, 1989). Moreover, an increased induction of many enzymes, probably linked to phenols, has been observed. The best yield is obtained inoculating the mycelia into Olive Mill Waste Waters (dry weight = 4.85 % and organic matter = 89.0 % dry weight) at pH 5.8. Consequently, OMW are a growth substrate for the growing organisms that produce a greater biomass in comparison to usual substrates. Moreover, they enhance the activity of some enzymes, i.e. β -1,3-glucan synthase involved in glucan biosynthesis (Reverberi *et al.*, 2004). Highlighting the mechanism of enzyme induction can help us to drive the process towards the synthesis of a particular compound.

2.2. Extraction process

The extraction process is summarised in the following flow-chart (Figure 4).

2.3. β -D-glucans

In view of recent advances in experimental mycology and mushroom biotechnology, interest in higher Basidiomycetes as a natural source of valuable biologically active metabolites has significantly increased. The U.S. National Cancer Institute classified many of them as antitumor chemicals with immuno-modulating activity. The therapeutic properties are mainly related to polysaccharides and protein-bound polysaccharides (Wasser & Weiss, 1999). Several antitumoral polysaccharides with different chemical structures such as α -glucan, (1,2) α -heterogalactan, (Shida *et al.*, 1975) and α -glucanprotein (Mizuno *et al.*, 1995) have been isolated from different mushrooms.

β -D-glucans, present in fungal cell walls, are a class of polysaccharides of particular interest because of their recognised pharmacological properties depending on their structure consisting of (1-3) linked-glucoopyranosyl units. Along this chain, single β -D-glucoopyranosyl units attached by 1-6 linkages are randomly dispersed (Kraus & Franz, 1991; Wagner *et al.*, 1988; Bohn & BeMiller, 1995). Most of the (1-3)- β -D-glucans having biological activity have been isolated from Basidiomycetes such as *Grifola frondosa*, *Ganoderma lucidum*, *Trametes versicolor*, *Schizophyllum commune*,

Lentinula edodes, *Flammulina velutipes* (Wasser, 2001). The possibility of producing mycelial biomasses from agricultural wastes is an attractive perspective which allows waste to be recycled into “nutraceutical” products. In a recent study an increase of β -glucansynthase activity was recorded for *L. edodes* cultivated on OMW (Reverberi *et al.*, 2004), the induction depending on phenols present in them. The possibility of increasing the glucan yield is an interesting trend for the recovery of vegetable oil containing waste.

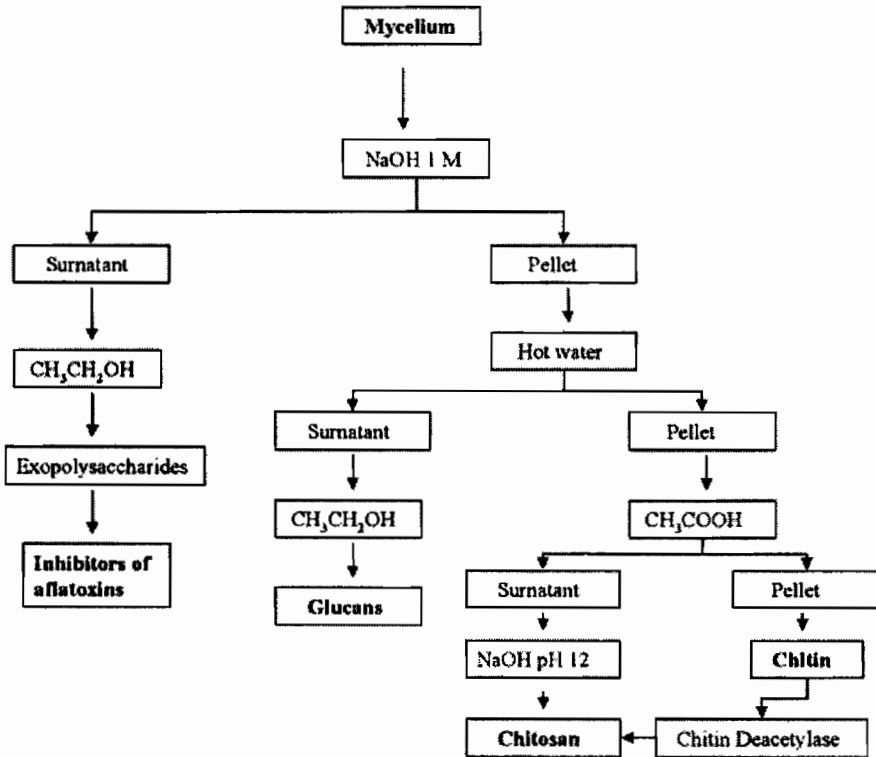


Figure 4. Extraction process of polysaccharides

A lentinan-like β -D-glucan was extracted from the mycelial biomass of *Lentinula edodes*. When grown on OMW, the yield of the mycelial biomass was about two fold greater in comparison with the compound obtained by the usual cultural broths.

The structure of the polysaccharide isolated from *L. edodes* mycelium grown on olive mill wastewaters is reported in Figure 5, 6, 7, 8. Antitumor and immunomodulatory activities of a polysaccharide can be affected by the degree of branching and conformation. Consequently, the structure of the fraction extracted by *L. edodes* has been studied using 1D and 2D NMR experiments (COSY, TOCSY and HSQC) together with ^1H -detected Diffusion Ordered Spectroscopy (DOSY) (Tomati *et al.*, 2004).

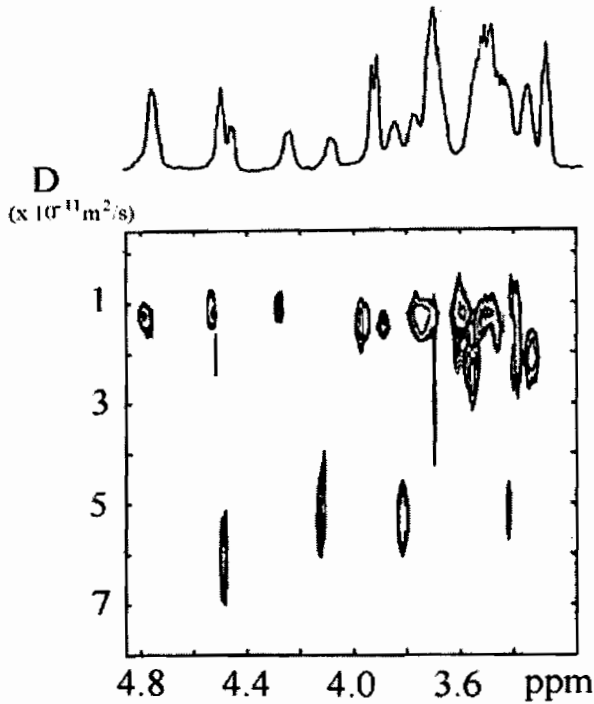


Figure 5. ^1H -detected DOSY spectrum of the purified polysaccharide fraction in 0.5 M NaOD at 300 K. The 600.13 MHz ^1H spectrum of the sample is also reported.

2.4. Chitin and chitosan

Chitin, a biopolymer composed of -1,4-linked 2-acetamido-2-deoxy-D-glucose residues, exists in a wide variety of animal and vegetable species, from fungi to lower animals. Basidiomycetes contain great quantities of chitin that constitute the structure of both mycelia and carpophores, so obtaining chitin from mushrooms could be an advantageous alternative to shrimp shells. Because of its high crystallinity, chitin is insoluble in aqueous solutions and organic solvents (Hirano, 1996) so, before being utilised, chitin must be transformed into chitosan, its water soluble deacetylated derivative.

Presently, chitosan is prepared submitting chitin to a harsh thermo-chemical procedure not easy to control and damaging to the environment since it generates a broad range of products (Chang, 1997). Converting chitin into chitosan using strong acid/basic treatment not only increases the processing costs but also affects the quality of chitosan. In addition, a large quantity of polluting liquid is produced. Therefore, the possibility of transforming chitin into chitosan biologically is a way that would eliminate most of these drawbacks. Basidiomycetes possess chitin deacetylase (CDA: E.C. 3.5.1.41), the enzyme that catalyses the conversion of chitin to chitosan by the deacetylation of N-acetylglucosamine residues. CDA can be easily extracted from fungal mycelia and successfully used for chitin deacetylation.

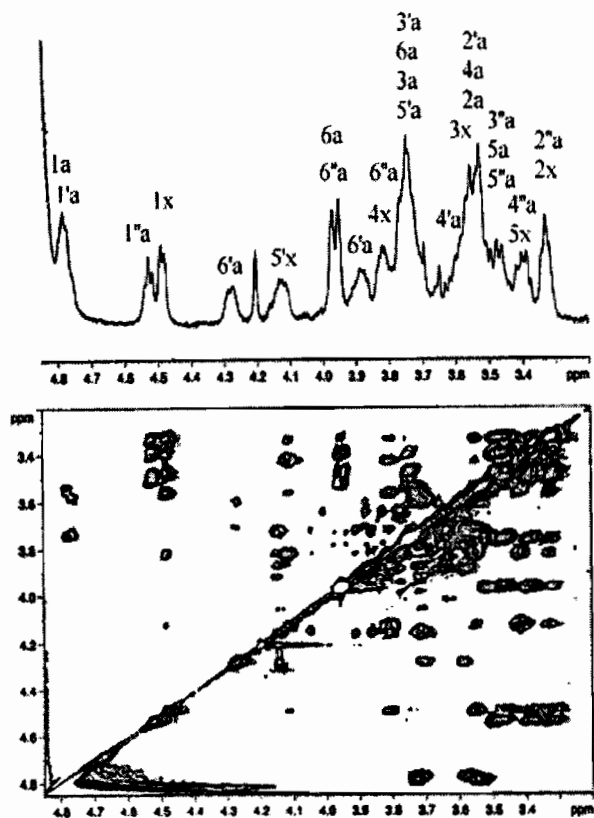


Figure 6. ^1H - ^1H TOCSY map of the purified polysaccharide fraction in NaOD at 300K. The 600.13 MHz ^1H spectrum of the sample with the corresponding assignment is also reported.

CDA is an inducible enzyme; its value lies between 0.1 and 0.6 $\mu\text{moles. mg protein}^{-1} \text{min}^{-1}$.

Chitin was purified from *Auricularia auricula-judae* (SMR 0054), *Lentinula edodes* (SMR 0090), *Trametes versicolor* (SMR 0117), *Pleurotus sajor-caju* (SMR 0121), *Pleurotus ostreatus* (SMR 0136), *Pleurotus eryngii* (SMR 0141), *Pleurotus eryngii* (SMR 0171), *Stropharia aeruginosa* (SMR 0181), *Armillaria mellea* (SMR 0439), *Pleurotus ostreatus* (SMR 0684), *Pleurotus eryngii ferulae* (SMR 0785), stored in the International Bank of Edible Saprophytic Mushrooms (IBAF - CNR) (Table1).

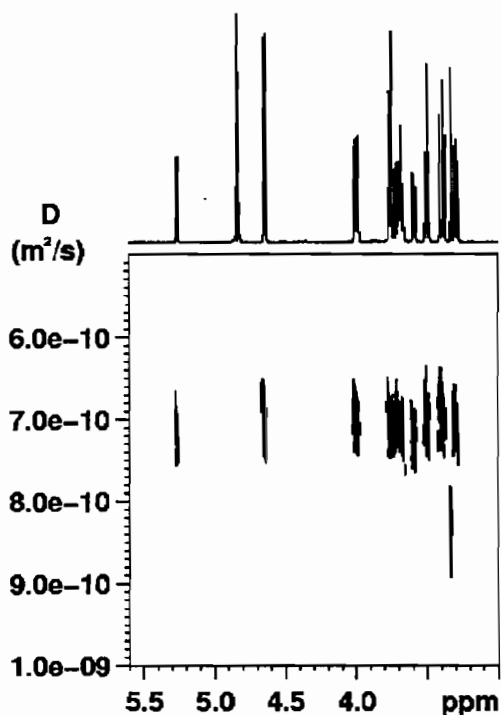


Figure 7. ^1H -detected DOSY spectrum of a xylose sample in NaOD at 300 K. The 600.13 MHz, ^1H spectrum of the xylose sample is also reported.

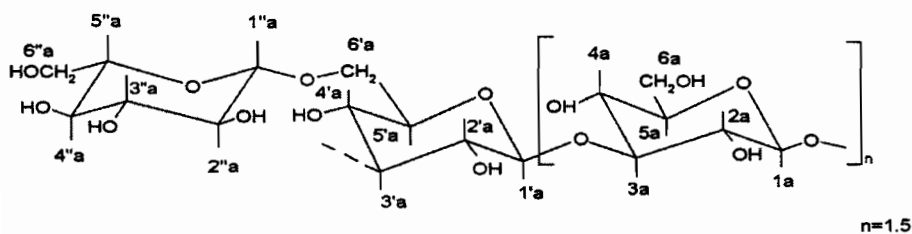
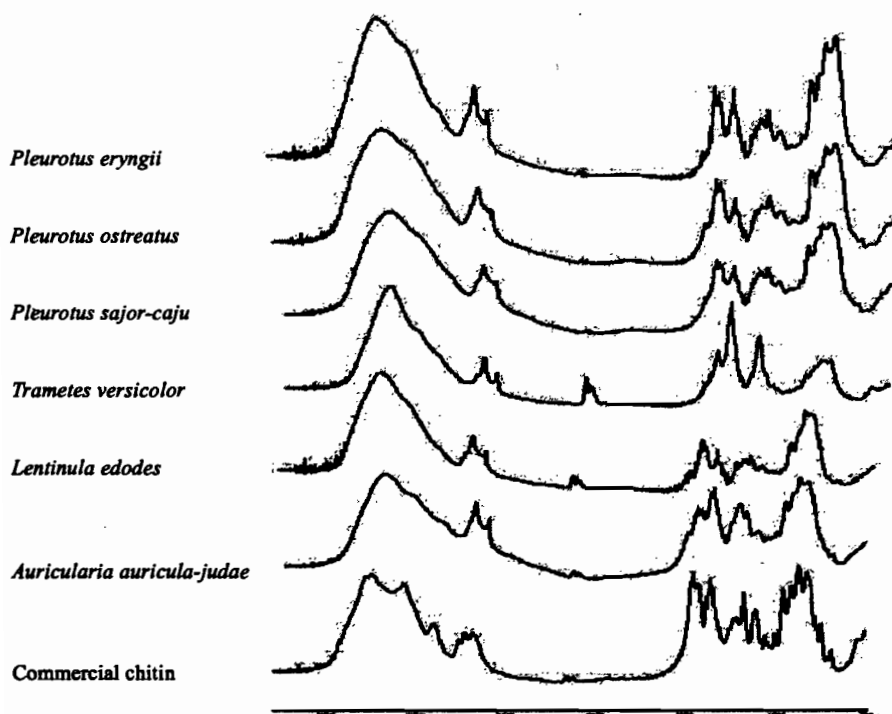


Figure 8. Structure of (1->3)-D-glucan containing 1-6 glucopyranosyl branch points

The properties of chitin, as well as of chitosan, depend on the extent of acetylation that is one of the most important factors for characterising these compounds. The FT IR spectra of mycelial chitin are very similar to each other and are characterised by the amide bonds at approximately 1655, 1555 and 1313 cm^{-1} . A high degree of similarity is recorded when IR fungal spectra are compared with that of the shrimps (Figure 9).

Table 1. Chitin extracted from the different mycelia

Items	Chitin (% dry weight)
<i>Auricularia auricula-judae</i> (SMR 0054)	19.6 ± 3.1
<i>Lentinula edodes</i> (SMR 0090)	10.1 ± 4.0
<i>Trametes versicolor</i> (SMR 0117)	13.1 ± 4.7
<i>Pleurotus sajor-caju</i> (SMR 0121)	12.8 ± 3.2
<i>Pleurotus ostreatus</i> (SMR 0136)	9.8 ± 2.5
<i>Pleurotus eryngii</i> (SMR 0141)	7.5 ± 3.1
<i>Pleurotus eryngii</i> (SMR 0171)	6.2 ± 2.3
<i>Stropharia aeruginosa</i> (SMR 0181)	5.1 ± 1.4
<i>Armillaria mellea</i> (SMR 0439)	11.1 ± 3.3
<i>Pleurotus ostreatus</i> (SMR 0684)	15.3 ± 4.2
<i>Pleurotus eryngii ferulae</i> (SMR 0785)	6.6 ± 2.0

**Figure 9. FT-IR spectra of commercial and fungal chitin**

The Degree of acetylation (DA) values for chitin isolated from fungal mycelia ranged from 30 to 47% (Table 2). These values are significantly lower than the DA recorded from shrimp chitin. From this point of view, fungal chitins can be considered a more suitable source to obtain chitosan.

Table 2. Degree of acetylation of fungal chitins compared to commercial chitin (Sigma)

Items	DA%
Commercial Chitin (Sigma)	70.2 ± 5.2
<i>Auricularia auricula-judae</i> (SMR 0054)	39.2 ± 4.0
<i>Lentinula edodes</i> (SMR 0090)	31.9 ± 5.1
<i>Trametes versicolor</i> (SMR 0117)	46.7 ± 4.4
<i>Pleurotus sajor-caju</i> (SMR 0121)	34.5 ± 4.2
<i>Pleurotus ostreatus</i> (SMR 0136)	36.5 ± 5.3
<i>Pleurotus eryngii</i> (SMR 0141)	30.9 ± 5.6
<i>Pleurotus eryngii</i> (SMR 0171)	37.2 ± 5.7
<i>Stropharia aeruginosa</i> (SMR 0181)	44.9 ± 4.3
<i>Armillaria mellea</i> (SMR 0439)	35.6 ± 3.4
<i>Pleurotus ostreatus</i> (SMR 0684)	36.0 ± 3.6
<i>Pleurotus eryngii ferulae</i> (SMR 0785)	38.2 ± 4.1

Commercial chitin was deacetylated by the CDA of each fungal strain (Table 3). The efficiency of enzymatic deacetylation is comparable with the thermochemical treatment which reduced DA of commercial chitin of about 60-70%. Based on these results, the use of CDA can be proposed as an alternative in the preparation of chitosan.

Table 3. Degree of acetylation of commercial chitin (Sigma) after enzymatic deacetylation

Chitin deacetylase extracted from:	DA %
<i>Auricularia auricula-judae</i> (SMR 54)	17.2 ± 2.8
<i>Lentinula edodes</i> (SMR 90)	17.6 ± 2.6
<i>Trametes versicolor</i> (SMR 117)	20.5 ± 3.1
<i>Pleurotus sajor-caju</i> (SMR 121)	18.7 ± 3.3
<i>Pleurotus ostreatus</i> (SMR 136)	18.8 ± 4.2
<i>Pleurotus eryngii</i> (SMR 141)	26.4 ± 2.9
<i>Stropharia aeruginosa</i> (SMR 181)	17.3 ± 2.6
<i>Armillaria mellea</i> (SMR 439)	22.2 ± 3.2
<i>Pleurotus ostreatus</i> (SMR 684)	27.8 ± 4.5
<i>Pleurotus eryngii ferulae</i> (SMR 785)	20.4 ± 3.8

2.5. Fungal biomasses for biosorption

Polysaccharides, usually present in association with lipid and protein fractions, represent the main constituents (up to 90% in weight) of fungal walls. This matrix supports potential metal binding ligands that include amine, phosphate, carboxylate, hydroxyl and sulphhydryl groups.

Among the polysaccharides, chitin and chitosan have received attention as significant metal-biosorbing agents. "Biosorption" is a term frequently used to describe non-directed physico-chemical interactions between metal species and biomass, particularly in a biotechnological context.

This process is of increasing interest since it results in the detoxification of contaminated effluents before their environmental discharge especially when chemical or physical methods are not efficient or are not economically viable.

Metals are adsorbed in different quantities both by mycelium and polysaccharides extracted from different strains and can be easily immobilised on an inert matrix (Di Mario *et al.*, 2002).

As an example, the elution curves of Cu ions from columns containing *Auricularia polytricha* biomass loaded on polyvinyl alcohol (PVA) is reported (Figure 10). Metal absorption rapidly occurred in the presence of mycelium biomass. A high efficiency (about 90%) was observed (Galli *et al.*, 2003).

Effluent Cu Concentration

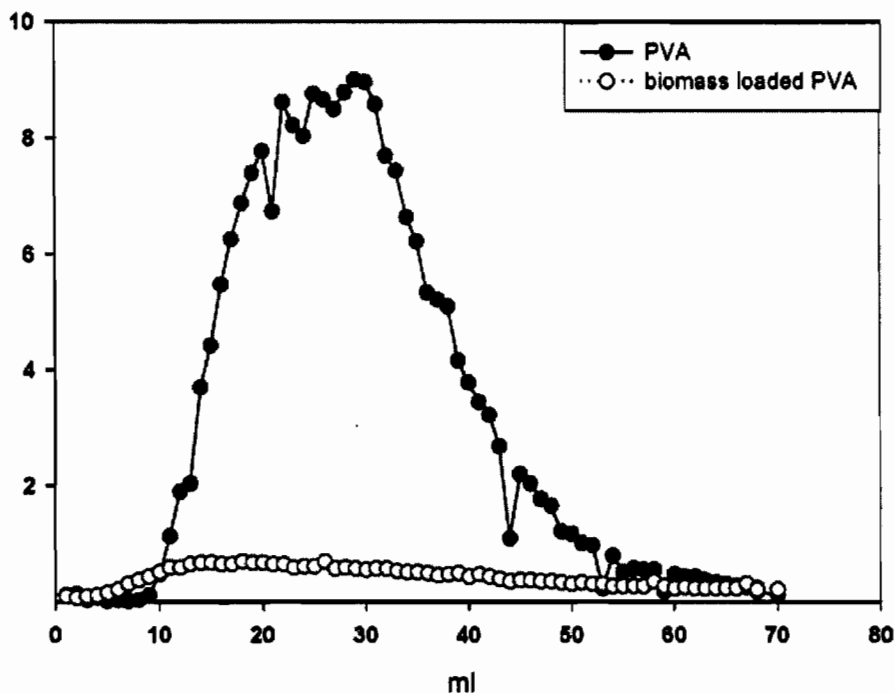


Figure 10. Elution curves of columns containing by biomass-loaded Polyvinyl Alcohol (PVA) and PVA alone loaded with 10 mg L^{-1} of Cu (II)

3. CONCLUSIONS

OMW is a suitable basic material to obtaining high value compounds either by extractive processes, i.e. phenols, or by biotechnologies involving a large variety of micro-organisms. Basidiomycetes have been used to produce polysaccharides that

can be used in a wide range of applications, i.e. cosmetics, pharmaceuticals, agriculture, food and feed industry. Of course, the same compounds can be obtained using the conventional substrates. What makes OMW interesting in this field is:

- the possibility of using a waste as a substrate. This is important from an economical standpoint;
- obtaining a greater biomass compared with conventional substrates;
- in some cases, obtaining a greater yield of valuable compounds when the induction of specific enzymes occurs.

4. ACKNOWLEDGEMENTS

These results were financed by the Italian National Research Programmes CNR-MIUR: "Riciclo dei reflui del sistema agroindustriale - sottoprogetto:Reflui oleari" and "Prodotti agroalimentari- Settore tecnologico ortofrutta: Ricerca avanzata per il riciclo dei sottoprodotti dell'industria olearia - Cluster C08-A.

5. REFERENCES

- Bartnicki-Garcia S. & Nickerson W.J. (1962) Nutrition, growth and morphogenesis of *Mucor rouxii*. *J. Bacteriol.* 84: 841-854
- Bartnicki-Garcia S. (1989) In: *Chitin and chitosan, sources, chemistry, biochemistry, physical properties and applications*. (G.Skjark-Braek, T. Anthonen, P. Sandford Eds) Elsevier, Essex, pp.23-35
- Bohn J.A. & BeMiller J.N. (1995) (1 \rightarrow 3)-b-D-glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. *Carbohydr. Polym.* 28: 3-14
- Chang K.L. (1997) Heterogeneous N-deacetylation of chitin in alkaline solution. *Carbohydr. Res.* 303: 327-332
- Di Mario F., Galli E., Rapanà P., Lorenzoni P. & Angelini R. (2002) I funghi saprofiti come accumulatori di metalli pesanti. *Micologia italiana XXXI* (1): 60-65
- Gadd G.M. (1993) Interaction of fungi with toxic metals. *New Phytol.* 124: 25-60
- Galli E., Di Mario F., Rapanà P., Lorenzoni P. & Angelini R. (2003) Copper biosorption by *Auricularia polythrica*. *Letters in Appl. Microbiol.* 37: 133-137
- Hirano S. (1996) Chitin biotechnology application. *Biotechol. Annual Rev.* 2: 237-258
- Kalac P., Niznanska M., Bevilaqua D. & Istaskova I. (1999) Concentration of Hg, Cu; Cd and Pb in fruiting bodies of edible mushrooms in the vicinity of a Hg smelter and Cu smelter. *The Science of the Total Environment* 177: 251-258

- Kraus J. & Franz G. (1991) In *Fungal Cell Wall and Immune Response* (Latgé, J.P., Boucias, D. Eds) NATO ASI Series H53, Springer, Berlin, pp. 431-444
- lipid synthesis in *Lentinula edodes*. *Mycologia* 81: 514-522
- Mizuno M., Morimoto M., Minato K. & Tsuchida H. (1998) Polysaccharides from *Agaricus blazei* stimulate T-cell subset in mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62: 434-437
- Mizuno T., Saito H., Nishitoba T. & Kawagishi H. (1995) Antitumor- active substances from mushrooms. *Food Rev. Intern.* 11: 23-61
- Reverberi M., Di Mario F. & Tomati U. (2004) β -glucan synthase induction in mushrooms grown on olive mill wastewaters. *Appl. Microbiol. and Biotechnol.* 253: 1662-1670
- Shida M., Hargu K. & Matsuda K. (1975) On the water-soluble heterogalactan isolated from the fruit bodies of *Lentinula edodes*. *Carbohydr. Res.* 41: 211-218
- Shida M., Uchida T. & Matsuda K. (1978) A (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan isolated from the fruit bodies of *Lentinula edodes*. *Carbohydr. Res.* 60: 117-127
- Shumate S.E. & Strandberg G.W. (1985) Accumulation of metals by microbial cells In: *Comprehensive Biotechnology* (Moo-Young, M., Robinson, C.N. and Howell, J.A. ed.) Oxford Pergamon Press. pp. 235-247
- Song C.H., Cho K.Y., Nair N.G. & Vine J. (1989) Growth stimulation and
- Tomati U., Belardinelli M., Galli E., Iori V., Capitani D., Mannina L., Viel S. & Segre AL. (2004) Characterisation of a polysaccharide fraction from *Lentinula edodes* grown on olive mill wastewaters. *Carbohydr. Res.* 339: 1129-1134
- Wagner H., Stuppner H., Schafer W. & Zenk M. (1988) Immunologically active polysaccharides of *Echinacea purpurea* cell culture. *Phytochemistry* 27: 119-126
- Wasser S. (2002) Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 60(3): 258 - 274
- Wasser S.P. & Weiss A.L. (1999) Medicinal properties of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: current perspectives (review). *Int. J. Med. Mush.* 1: 31-62

High value compounds from olive mill wastes

The waste produced by the olive mill industry has been considered either as a polluting stream or a resource to be recycled. This double aspect of olive mill wastes (OMW) often generated disagreement among the various political groups, mainly involved in the agriculture and environment field, because of their different points of view on this topic. Several National and European research programmes aimed at OMW recovery have been built up. Although land application, composting and co-combustion are the most suitable ways to solve the problem, interest in technologies aimed at obtaining high added value compounds by extracting processes and/or biosynthesis is increasing. The possibility of obtaining polysaccharides from agro-industrial wastes is a valuable perspective in view of recent advances in experimental mycology and mushroom biotechnology. In these fields higher Basidiomycetes are even considered as a natural source of valuable biologically active metabolites, i.e glucans, chitin and chitosan. β -D-glucans are a class of polysaccharides particularly interesting because of their recognised pharmacological properties. These compounds have a common main structure consisting of (1-3) linked -glucopyranosyl units. This particular chemical structure seems to be responsible for the immunomodulating capacity, resulting in antitumor, antibacterial, antiviral, anticoagulatory and wound healing activities. The structure and properties of a new β -D-glucan extracted from a soluble polysaccharide fraction obtained from *Lentinula edodes* mycelium has been investigated by high field NMR Spectroscopy. Chitin and chitosan are used in a variety of applications, i.e. cosmetics, pharmaceuticals, agriculture. Today, many companies are producing chitin, chitosan and chitosan products on a commercial scale starting from the shells of crustaceans: Basidiomycetes can be proposed as a possible alternative source of chitin and chitosan due to the high content of chitin that varies from 5 to 20% in the cell walls of their mycelia and carpophores. Moreover, fungal polysaccharides have been used in technologies involving water cleaning and heavy metal recovery.

Keywords: Edible mushroom - Olive mill waste - Polysaccharides - High value compounds

A common policy to face the problem of olive oil mill wastes

Umberto TOMATI & Emanuela GALLI

Istituto di Biologia Agroambientale e Forestale- CNR, Area della Ricerca di Roma, via Salaria Km 29.300, Monterotondo Scalo (Rm), Italy
Corresponding author, e-mail umberto.tomati@ibaf.cnr.it

1. INTRODUCTION

The disposal of olive oil waste is a typical problem in the Mediterranean area where the cultivation of olive trees has been an established feature since more than 6000 years ago. Olive trees grow in fact in rather arid areas, where protect soils against desertification and erosion, and help to regulate water cycle.

The extraction and use of olive oil is linked to the Mediterranean culture and history. Besides its use in cosmetics, olive oil has always been an essential component of the Mediterranean diet for its high dietetic and nutritional quality.

The worldwide olive oil production is estimated at about 2 million tons per year, 78 % of which in the European Union. Other main producers are Tunisia (170,000 tons), Turkey (190,000 tons), Syria (110,000 tons) and Morocco (70,000 tons). In the Mediterranean region more than 95 % of the world's olives are harvested; the highest yield is achieved in Spain, Italy and Greece (Figure 1).

As a consequence, most of the liquid and solid waste (OMW) resulting yearly from the olive industry is produced in the Mediterranean area (Table 1).

Although the official data estimate waste production at about 8 ML tons, nobody knows the amount of waste actually produced, and doubtlessly its production is underestimated. Their quantities and composition vary considerably according to the type of production process, type of olives, area under cultivation or arable soil, use of pesticides and fertilisers, harvesting time, stage of maturity and climatic conditions. Although they can differ greatly, the importance of the olive oil sector and the magnitude of the problem related to the huge amounts of waste and by-products generated by olive mill industry clearly appear.

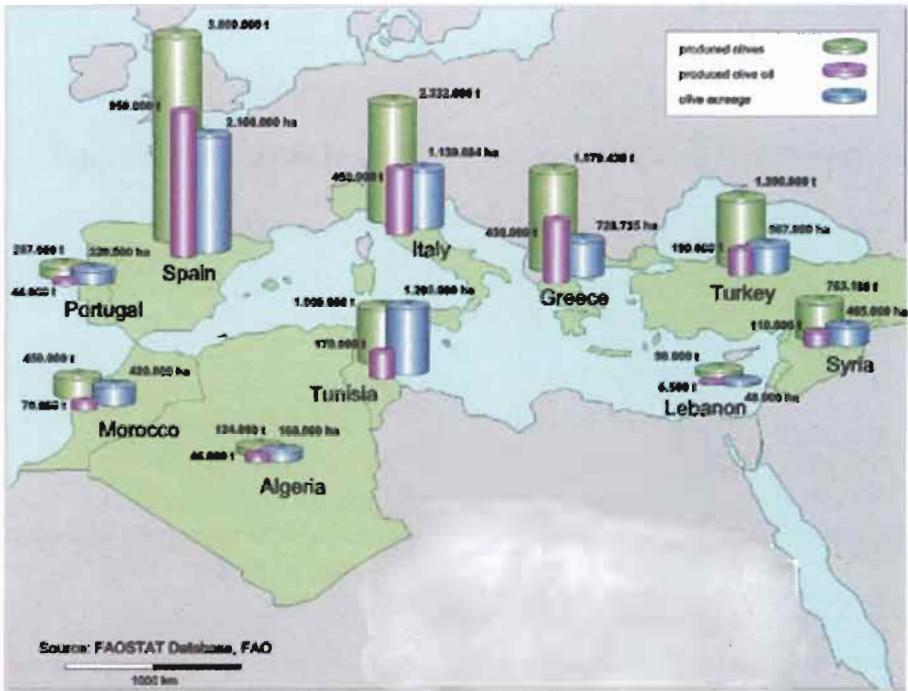


Figure 1. Olives and olive oil production in the Mediterranean area during 1998

Table 1. Olive industry in the Mediterranean area

	Produced olives (t)	Produced olive oil (t)	Olive acreage (ha)
Egypt	210 000	-	24 000
France	13 500	2000	14 000
Israel	18 700	23	13 000
Libya	58 000	10 400	56 000
Cyprus	5 000	1 200	6 000

2. WASTE PRODUCTION

The traditional methods of extraction and the continuous three-phase decanting process generate olive oil and two kinds of waste (liquid and wet solid). Nowadays, a new low water consuming water extraction method (two-phase decanting process), extensively used in Spain and in expansion in Italy and Greece, produces oil and wet solid waste. The component of waste produced during the extraction process are:

- vegetation water (fruit water content);
- milled pulp;
- ground stones;
- water added during the extraction process.

The waste from olive extraction is characterised by the following features and components:

- intensive violet-dark brown colour
- strong specific olive oil smell that rapidly turn bad due to anaerobic processes
- high degree of organic pollution (COD up to 220 g/l and a COD/BOD₅ ratio between 2.5 and 5, difficult to be degraded)
- pH between 3 and 5.9
- high organic matter load and salt
- high content of polyphenols.

3. OLIVE OIL BY-PRODUCTS: WASTE OR RESOURCES?

The wastes produced by the olive mill industry can be considered either as a pollutant or as a resource to be recycled. Regarding the former, the olive mill industry produces a polluting waste that must undergo cleaning before its release into environment to avoid surface and ground waters and soil pollution, whereas in the latter case OMW are a resource that can be usefully used as a soil conditioner. This double aspect of olive waste often generated disagreement among the various political groups, mainly involved in the agriculture and environment field, because of their different points of view on this topic. Weighing the advantages and disadvantages posed by these two aspects of the problem is not easy. Therefore, there is a strong need of a common regulation based on scientific information capable of considering the question in its entirety

4. ENVIRONMENTAL IMPACT

It is not easy to evaluate the percentage of the olive mill waste illegally disposed in the environment despite the existing laws rightly worried about the serious problems caused when OMW are poured into rivers, seas and onto the ground. The waste water contains a high organic load and many complex coloured organic substances which are very resistant to biodegradation. The harmful effects can be summarised as follows.

4.1. Discolouring of natural waters

This is the most visible effects of the pollution so often observed in the Mediterranean countries and it is due to tannins that come from the olive skin and remain in the waste water.

4.2. Threat to aquatic life

The OMW is characterised by a high COD and BOD₅ and a considerable quantity of reduced sugar. When discharged directly into natural waters, the number of micro-organisms that utilise sugars as a growth substrate increase. The greater consumption of oxygen dissolved in the water reduces the share available for other living organisms. This may cause an imbalance of the whole ecosystem. A similar process can result from the high phosphorus content that encourages and accelerates the growth of algae and increases the eutrophisation, destroying the whole ecological balance in natural

waters. The presence of the large quantity of nutrients supplied by the waste water can also provides a growth medium for pathogens with severe consequences for the local aquatic life. Moreover, the lipids in the wastewaters may form an impenetrable film on the surface of water, worsening the aeration conditions.

4.3. Surface and ground water pollution

When disposed on sloping land, the runoff of waste can provoke pollution of surface waters. Ground water can be endangered by water leaching when the soil pedomorphology is not suitable to accept them.

4.4. Soil quality and plant growth

The uncontrolled waste disposal can harm soil properties (decrease of the cation exchange capacity, increase of salinity, alteration of microbial population, alteration of the soil-air and the air-water balance). Moreover, it can affect seed germination and plant growth by the phytotoxicity due to the fresh organic matter and to some compounds, i.e. phenols and organic acids.

4.5. Odours

Odours are due to the anaerobic fermentation of the waste water. This leads to considerable odour pollution which cover a greater distance especially when such a waste is stored in ponds .

5. THE USE OF OMW AS A SOIL CONDITIONER

The purpose of olive tree cultivation is the production of olive oil that chemically consists in C, H, and O. All the other elements are present in the olive tree pruning and in the olive oil industry waste. Therefore, when considered for its content in organic matter and nutrients, olive waste is a great energetic resource that, when supplied to soil, increases cropland fertility and plant production.

The landspread of OMW has often been considered, sometimes with prejudice, both concerning its fertility value and its toxic effect on plants and the dangerous consequences for the environment. Generally, the use of any organic waste is limited because of the possible presence of pathogens (i.e. bacteria and viruses), minerals and organic polluting substances. From this point of view, OMW has to be supposed as a healthy material because of its matrix consisting of the pulp of drupes and the inherent or added water. Yet, only recently the possibility of using such a waste as a fertiliser has been taken into consideration.

It is worth noting that the Italian regulation admits the OMW landfill in amounts of 80 or 40 ton/ha according to the extraction process used (law 576/96). There is in fact a great body of literature confirming the beneficial effect of OMW on soil fertility. Spreading on land apt to receive OMW could be a suitable solution to olive mill industry problems. As an alternative, composting is an attractive prospective in a policy of waste recycling to produce humus-like compounds that can be used for soil improvement and plant growth. As regards waste recycle in agriculture, the question

at issue is to produce “quality” composts and define standards for composts that meet the requirements for agricultural exploitation. Composting and co-composting of olive mill waste have been thoroughly studied from the theoretical point of view and many pilot plants have demonstrated the feasibility of the process. Nowadays, building composting plants is no longer a perspective but a real possibility.

6. REGULATION

Because of the possible harmful effects, Authorities in every Country have tried to develop regulations that often differ greatly one from the other with a consequent non uniform application of even generally accepted guidelines. Due to the insufficient regulation, there is a need of a normative that impose a common behaviour among the EU countries. It would be desirable that such a regulation also involve the needs and interests of all the producer countries with the view of safeguarding the Mediterranean area.

6.1. The E.U. regulation

At the present, no regulation has been established for the OMW by EU, but only guidelines and standards aimed at evaluating the quality of industrial and agricultural waters with the view of safeguarding the aquatic environment. In this optic, the quality of waters to be released into the environment is evaluated on pollutants (grouped and listed according their toxicity), and organic load. The selection of pollutants is based on the following criteria:

- human exposure and health effect;
- pollutants uptake by plant;
- phytotoxicity;
- effect on soils and terrestrial ecosystems;
- effect on domestic animals and wildlife;
- effect on aquatic ecosystems;
- bioaccumulation.

The organic load, expressed as COD and BOD₅, is one of the quality parameters taken into consideration. Because of their organic load, thousand times greater than legal limits, OMW must be cleaned before their release into the environment.

The main EU directives are:

- Council Directive 76/464/EEC, Council Directive 88/347/EEC and Council Directive 90/415/EEC related to the pollution caused by certain harmful substances. They are aimed at eliminating or reducing the contamination caused in the waters by harmful substances grouped in two main lists according to their toxicity (the list I includes the most dangerous compounds). Limit value for their emission is fixed. The possibility of imposing a pouring canon is also contemplated. The canon is imposed considering the wastewater concentration in pollutants, their toxicity, persistence, bioaccumulation, the industrial sector from which they derive and the type of product. These directive will be able to be modified depending on the different national legislation.

Moreover, a directive aimed at preserving water from pollution caused by nitrates used in agriculture has been promulgated (Council Directive 91/676/EEC).

6.2. National regulation

In the EU Countries, regulations, guidelines and standards have been established for water protection according to EU directives.

6.2.1. Spain

In general, Spain has not developed a specific regulation about OMW, the disposal of which is then regulated by EU directives and national laws on water quality. Nowadays, the trends are to use OMW as a co-combustible according to the national plan aimed at recovering all possible energetic resources (RD 2818/98). Moreover, the possibility of using the solid residues of olive mill industry as soil conditioner has also been taken into consideration. Pollution is considered and defined as the action and the effect of introducing matters or energy forms, or inducing conditions in the water that, in a direct or indirect way, imply a harmful alteration of their quality in connection with the later uses or with their ecological function. Based on that, it is forbidden any activity causing pollution or degradation of country's natural and national water network or to perform actions which constitute or can constitute a danger of contamination or degradation.

6.2.2. Italy

The problem of olive mill wastewater arose in Italy in 1976, as a consequence of the *law 319/76* "Water protection against pollution", usually called "Legge Merli", that classified olive mills as industrial areas. The level of depuration was evaluated based on pollutants present in the effluents. Pollutants were grouped in three lists according to their toxicity. Because of the organic load, expressed as COD and BOD₅, was thousand times greater than the legal limits (COD = 500), olive wastewater had to be cleaned before their release. The difficulty of reaching such a limit and the high cost of cleaning, caused a crisis in the olive mill industry.

To avoid the economical and social problems due to olive mill industry crisis, several provisory legislative and ministerial decrees were afterwards promulgated to allow wastewater landsread, at least under controlled conditions. In the meantime, many cleaning plants were proposed but they failed because of the high costs and incapacity to solve the problem. According to many studies and research performed especially in Spain and Italy that demonstrated the high fertilising value of olive oil wastewaters and the possibility of using them as a soil conditioner, a regulation about olive waste disposal and/or recycle was promulgated (*law 574/96* "New regulation about the agronomical re-use of olive mill wastewaters").

It must be underlined that the Italian regulation encourages the agronomical use of olive wastewaters as appears from the *law 574/96* and the *D.L. 152/1999* as modified by the *L.D. 258/2000*.

6.2.3. Portugal

There is not a specific law on olive mill waste. There is only a general so called "Water Law", D.L 236/98 that recalls the European regulation.

In September 2000, permission was promulgate to allow wastewater landspread under certain conditions at a maximum of 80 m³ per hectare .

6.2.4. Greece

At the present, European regulation is in force, although some local administrations are going to impose stricter environmental requirements.

7. THE STONES FOR A COMMON AND RATIONAL REGULATION

There is a lack of a common policy among the olive producer Countries. This drawback affects both the oil quality and the fate of OMW produced. The oil quality is the most important factor for the commercialisation of the product; the fate of OMW and its correct disposal/recycle is a sign of civilisation in view of the safeguard of the environment. Since till now there is not a law, it is necessary promulgate a regulation based on rational premises. Such a regulation could be the first step for a common policy that would contribute to safeguard the Mediterranean basin. The future legislator(s) should consider the following points.

7.1. Knowledge of the state of the olive mill industry

There is a lack of reliable data concerning the olive mill industry so, at present, nobody knows the quantity of waste actually produced, and where it is produced. A knowledge of:

- olive mills dislocation and working potentiality;
- oil extraction technologies;
- waste production and management,

So that the census of the olive mill industry in the whole Mediterranean basin, is the starting point to promulgate a regulation.

7.2. Environmental knowledge

The possibility of a correct land spread of wastes depends on the suitability of soils to accept them, and the nutritional need of the cultures. That can help the environmentally compatible disposal of wastes. Therefore pedomorphological, hydrological and climatic situation agricultural practices are important parameters to consider.

7.3. Choice of technologies proposed for waste disposal and the possibility of using them in an efficient and economic way

The introduction of innovative milling technologies can greatly reduce the quantity of waste. Moreover, the already tested composting processes can transform the waste into a resource useful for agricultural purposes. The knowledge of available technologies should take into consideration the specific interest of any Country.

7.4. National regulation and ecopolicy

Every Country has its own regulations that often differ one from the other. The new regulation should take into consideration and harmonise the specific interests of every Country concerning the:

- protection of resources
- reduction of waste
- disposal of waste compatible with the environment.

8. CONCLUSIONS

Because of the lack of a specific regulation about OMW, the best thing to do is that Countries and oil producer Organisations submit to legislator(s) a detailed report on the actual problems of the sector also indicating remedies, technologies and initiatives capable of resolving the question. There is a need of an *ad hoc* law since the E.U. regulation considered OMW a noxious waste like many others produced by anthropic activities. This negatively influences the oliviculture and create a crisis in the olive mill industry. As many European and National projects confirm, the possibility of a direct recycling of OMW as a soil conditioner is an agricultural practice that could be widely applied when soil morphology and climatic conditions allow it. Composting and co-composting of olive mill waste has also been thoroughly studied from the theoretical point of view and many pilot plants demonstrated the feasibility of the process. Nowadays, composting plants is no longer a perspective but a real possibility. Moreover, the introduction of new milling technologies allows to reduce significantly the amount of waste and to modify its characteristics. The right application of these technologies requires a deep knowledge of the environment where olive mills operate.

A common policy to face the problem of olive oil mill wastes

The environmental pollution posed by olive oil waste (OMW) is a typical problem in the Mediterranean area where more than 30 million m³ of waste is produced yearly. OMW contains a high organic load and many complex coloured organic substances which are very resistant to biodegradation. When disposed into environment, it can provoke dangerous effects that can be summarised as follows: discolouring of natural waters, threat to aquatic life, pollution of surface and ground water, alteration of soil quality, phytotoxicity and odours. Every Country has its own rules that often differ greatly one from the others with a consequent non-uniform application of generally accepted guidelines. There is a need of a normative that imposes a common behaviour among the EU countries and, possibly, among all olive oil producer Countries. Such a regulation could be the first step to a common policy that could contribute to safeguard the Mediterranean basin. To achieve this aim the fundamental stones are the census of the olive mill industry, a knowledge of the pedomorphological, hydrological and climatic situation, and a knowledge of technologies proposed in waste disposal or recycle.

Keywords: Olive mill waste - Recycle - Regulation

Use of a selected strain of *Lactobacillus pentosus* in the production of black- (*Itrana and Leccino Cv.*) table olives at pilot plant-scale

Maurizio SERVILI ¹°, Gian Francesco MONTEDORO ¹, Gianluca VENEZIANI ¹,
Sonia ESPOSTO ¹, Ombretta MASSITTI ¹, Agnese TATICCHI ¹,
Stefania URBANI ¹ & Aldo CORSETTI ²

¹ Dept. Scienze Economico-Estimative E Degli Alimenti-Sezione Tecnologie E Biotecnologie Degli Alimenti, Perugia, Italy

² Dept. Scienze Degli Alimenti, Sezione Di Microbiologia Agro-Alimentare Ed Ambientale, Teramo, Italy.

° Corresponding author: servimau@unipg.it

1. INTRODUCTION

Table olives are the most popular fermented food in Europe, and Spain, Italy and Greece represent the most important producers (IOOC, 1999; Tassou *et al.*, 2002). Two main methods are used to prepare fermented table olives: the Spanish method (De Castro *et al.*, 2002), for green olives and the Greek method for black olives (Tassou *et al.*, 2002). In both the cases the fruits become eatable after a spontaneous, «natural» fermentation performed by a mixed population of indigenous microorganisms (Nychas *et al.*, 2002). Just for Spanish-style green olives, the fermentation step is preceded by a preliminary treatment with sodium hydroxyde (lye) (De Castro *et al.*, 2002), needed to hydrolyse the bitter-tasting secoiridoid glucosides such as oleuropein and demethyloleuropein to glucose plus aglycon and to convert the latter in non bitter compounds such as elenolic acid and 3,4-dihydroxy-phenylethyl alcohol (Ciafardini *et al.*, 1994). Otherwise the olives are debittered during a period of fermentation in brines (Tassou *et al.*, 2002).

The olive drupe, contains high concentrations of phenolic compounds that can range between 1 - 3% of the fresh pulp weight (Garrido Fernández *et al.*, 1997). The main classes of phenols in olive fruit are phenolic acids, phenolic alcohols, flavonoids and secoiridoids (Table 1).

The (3,4-dihydroxyphenyl)ethanol (3,4-DHPEA) and (*p*-hydroxyphenyl)ethanol (*p*-HPEA) are the most abundant phenolic alcohols in the olive fruit (Garrido Fernández *et al.*, 1997; Vasquez Roncero *et al.*, 1974). The flavonoids include flavonol glycosides such as luteolin-7-glucoside and rutin (Vasquez Roncero *et al.*, 1974) and anthocyanins, cyanidin and delphinidin glycosides, in particular (Maestro Durán & Vasquez Roncero, 1976; Mazza Miniati, 1993); Marekow, 1984). While the phenolic acids, phenolic alcohols and flavonoids occur in many fruits and vegetables belonging to various botanical families, secoiridoids, on the contrary, are exclusively present in the Family

of *Oleaceae* that includes *Olea europaea* L. The phenolic compounds classified as secoiridoid are characterized by the presence of either elenolic acid or elenolic acid derivatives in their molecular structure (Garrido Fernández *et al.*, 1997). Oleuropein, demethyloleuropein, ligstroside and nüzhenide are the most abundant secoiridoids glucoside in olive fruit (Garrido Fernández *et al.*, 1997; Gariboldi *et al.*, 1986) (Figure 1).

Table 1. The main phenolic compounds in olive fruit

Anthocyanins

Cyanidin- 3- glucoside
 Cyanidin- 3- rutinoside
 Cyanidin- 3- caffeylglucoside
 Cyanidin- 3- caffeylrutinoside
 Delphinidin-3- rhamosylglucoside-7-xyloside

Flavonols

Quercetin-3-rutinoside

Flavones

Luteolin-7-glucoside
 Luteolin-5- glucoside
 Apigenin-7- glucoside

Phenolic acids

Chlorogenic acid
 Caffeic acid
 p-Hydroxybenzoic acid
 Protocatechuic acid
 Vanillic acid
 Syringic acid
 p-Coumaric acid
 o-Coumaric acid
 Ferulic acid
 Sinapic acid
 Benzoic acid
 Cinnamic acid
 Gallic acid

Phenolic alcohols

3,4-Dihydroxyphenyl-ethanol (3,4-DHPEA)
 p-Hydroxyphenyl-ethanol (p-HPEA)

Secoiridoids

Oleuropein
 Demethyloleuropein
 Ligstroside
 Nüzhenide

Hydroxycinnamic acid derivatives

Verbascoside

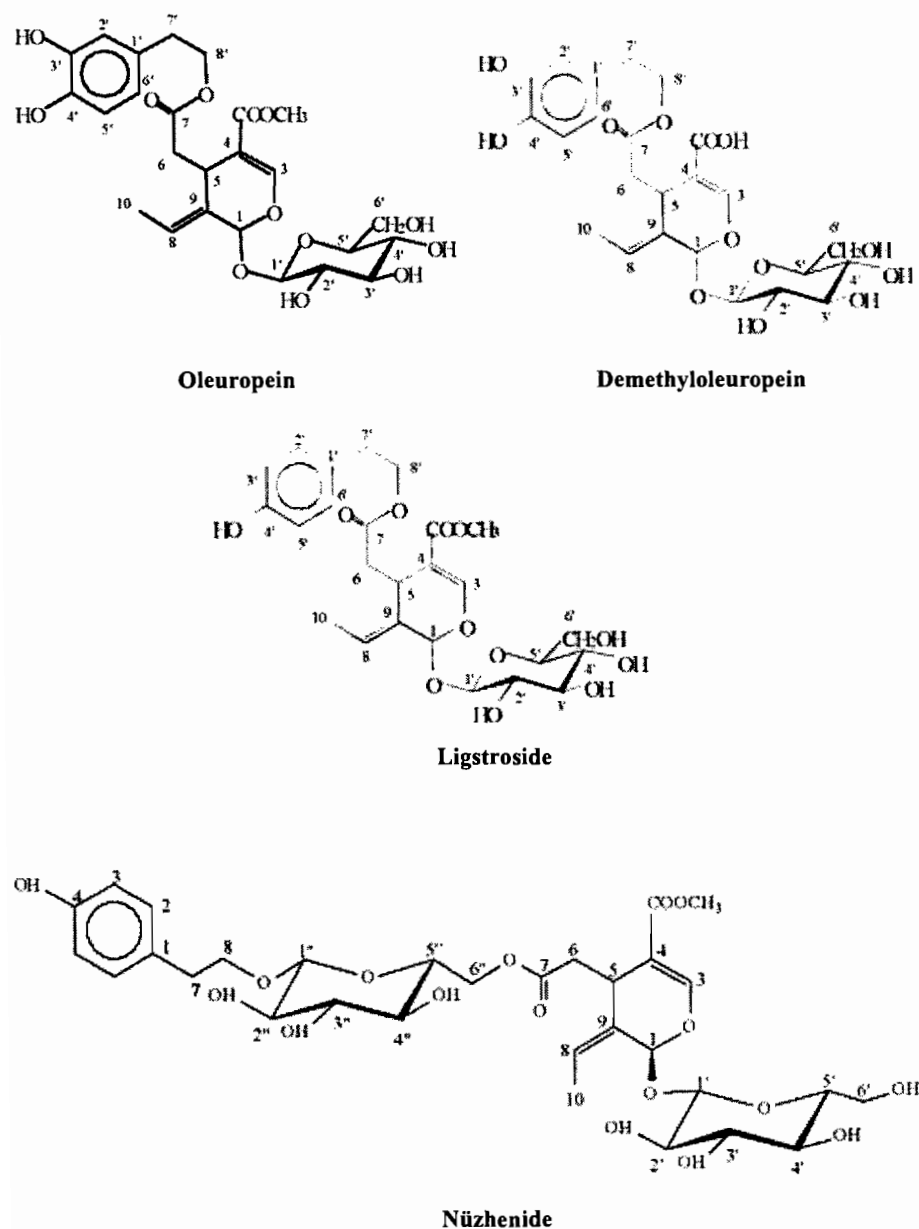


Figure 1. Chemical structures of the secoiridoids glucosides of olive fruit

A derivative of the hydroxycinnamic acid, is the verbascoside (Andary *et al.*, 1982) and its structure was confirmed by Servili *et al.*, (1999a) (Figure 2).

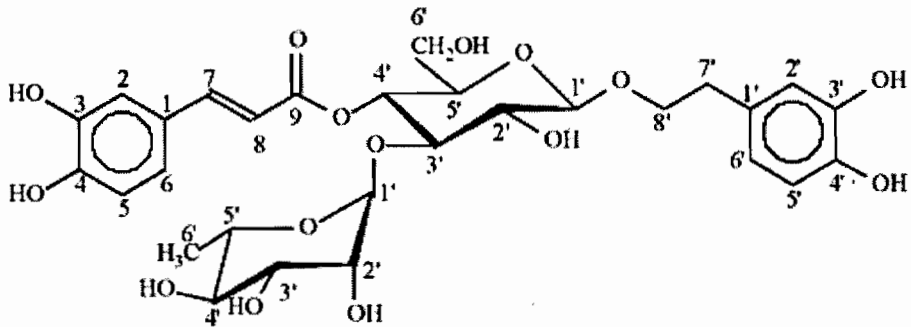


Figure 2. Chemical structures of verbascoside (hydroxycinnamic derivative found in olive fruit)

Oleuropein, demethyloleuropein and verbascoside were found in all the constitutive parts of fruit such as peel, pulp and seed but mainly in the pulp, whereas nüzhenide, as characterized by *Servili et al.* (1999b) (Figure 1), was found only in the seed. Several aglycon derivatives of oleuropein and demethyloleuropein such as the dialdehydic form of decarboxymethyl elenolic acid linked to 3,4-DHPEA (3,4-DHPEA-EDA) an isomer of the oleuropein aglycon (3,4-DHPEA-EA), were also found in olive pulp (*Romani et al.*, 1999; *Servili et al.*, 1999b; *Ryan et al.*, 2003) (Figure 3).

Phenolic acids with the basic chemical structure of C6-C1 (benzoic acids) and C6-C3 (cinnamic acid) were found in olive fruit by different authors (*Garrido Fernández et al.*, 1997) while the (+)-1-acetoxypinoresinol was found in a range of 2 and 95 mg/kg. (*Brenes et al.*, 2002).

The antioxidant activity of olive fruit components received an increasing attention in the last years since it has been related to the protection for important chronic and degenerative diseases as coronary heart diseases (CHD), ageing neuro-degenerative diseases and tumours of different localizations. Natural antioxidants compounds are therefore important to prevent severe diseases which, as it is well known, have the highest incidence in the late age classes (*Berliner et al.*, 1995; *Nakae et al.*, 1997; *Orlando*, 2002; *Rocca & Fitzgerald*, 2002).

Sensory proprieties of VOO are largely affected by phenolic composition. In particular these compounds were associated to the bitter and pungent sensory notes of oil. Several study were, in fact, performed to show the relationships between the "bitter" and the "pungent" taste of VOO and the total phenols concentration (*Gutiérrez et al.*, 1992; *Montedoro et al.*, 1992; *Tsimidou*, 1998).

Rodríguez de la Borbolla et al. (*Rodríguez de la Borbolla y Alcalá et al.*, 1969; *Rodríguez de la Borbolla y Alcalá et al.*, 1971) referred that the spontaneous fermentation of Spanish-style green olives mainly depend on *Lactobacillus plantarum*, while lactic acid bacteria (LAB) and yeasts dominate the brines of naturally ripened olives brined directly after harvesting. Nevertheless, it is commonly recognized that, frequently, the natural style process lead to unpredictable fermentation and low quality products (*Sánchez et al.*, 2001; *Piga et al.*, 2002) with variable sensory characteristics.

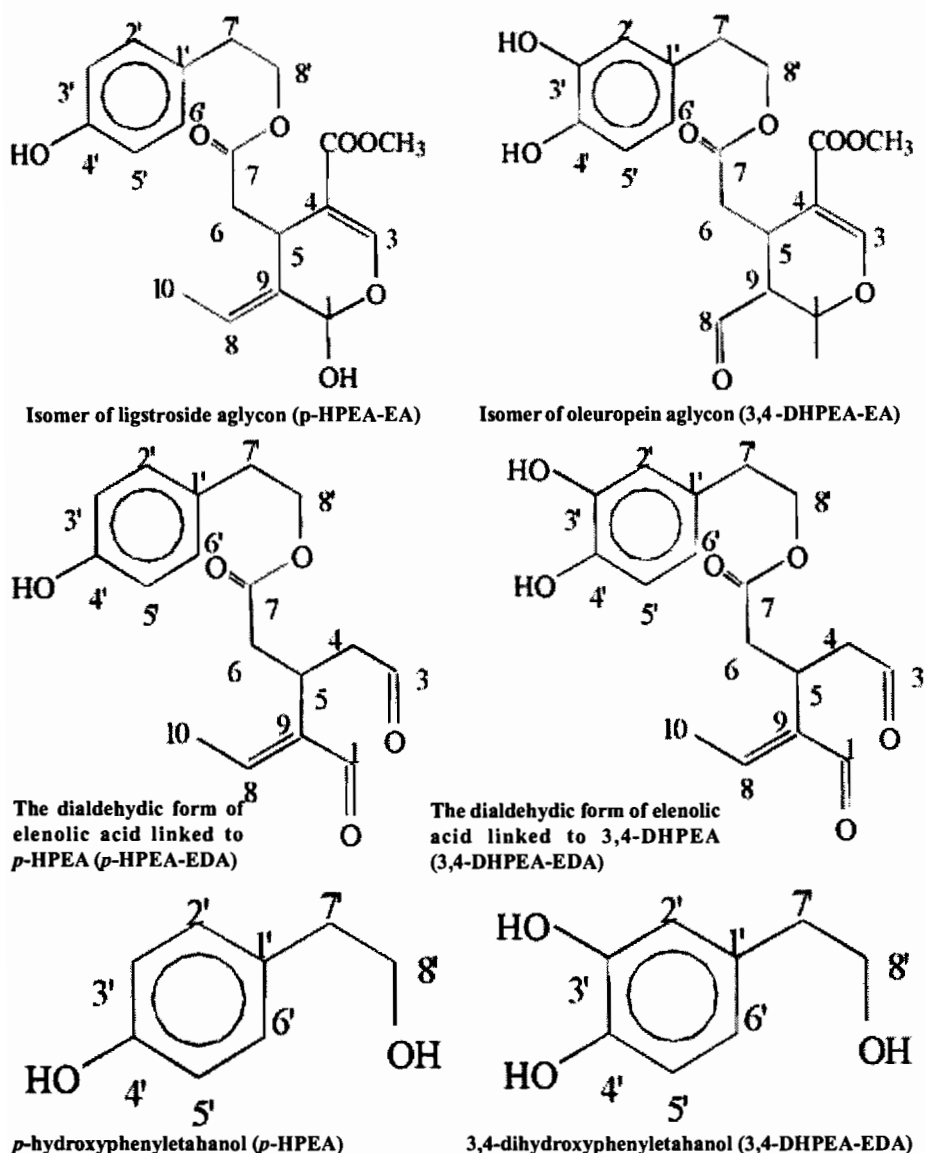


Figure 3. Chemical structures of the secoiridoids derivatives and phenolic alcohols of brined olives

In order to standardize the quality of the products and to reduce the probability of spoilage many studies have considered the selection of starter cultures (Comi *et al.*, 2000) and/or the modification of physicochemical process parameters (Sánchez *et al.*, 2001; Durán Quintana *et al.*, 1999). The essential characteristics of a starter culture for table olive fermentation, as reported by Ruiz-Barba *et al.*, 1993) include a rapid and predominant growth, homofermentative metabolism, tolerance to salt, acid, and

polyphenols, and few growth factor requirements. Based on the above considerations, the aims of the present study were:

- to isolate and identify the prevailing LAB present in brines of naturally fermented table olives;
- to select a strain to be used as a starter in fermentation of black- table olives;
- to perform a pilot plant fermentation of black table olives by using the selected strain.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. LAB isolation and preliminary identification assays

LAB were isolated from brines of ripe, naturally fermented table olives of black (*Itrana* and *Leccino*) Cv. after decimal dilution of the sample and plating on MRS Agar (Difco Laboratories, Detroit, USA). Pure cultures of the isolates were checked for catalase and Gram reactions, examined microscopically and preliminarily differentiated as reported by Corsetti *et al.* (2001).

2.2. Physiological characterization of LAB

Fifty strains of LAB were characterized on the basis of NaCl tolerance [evaluated in MRS broth with added NaCl at concentrations between 0 and 8% (wt/vol)]; resistance to oleuropein and verbascoside (in MRS broth with added, separately, 0.5 and 0.1% of the above compounds); and growth in modified brines (containing 6% NaCl, 0.05% oleuropein, 0.15% verbascoside and added of 0.3% glucose (Difco), 0.05 yeast extract (Difco), adjusted to pH 6.0 with NaOH (1 M) and sterilized by filtration.

2.3. Phenotypic and genotypic identification of LAB

Unidentified Gram-positive and catalase-negative bacteria showing positive results after the characterization tests were subjected to phenotypic identification by API 50 CHL System (bioMérieux, Lyon, France) and to genotypic identification by 16SrRNA gene sequencing as described by Corsetti *et al.* (2004).

2.4. Olive samples

Olive samples of black (*Itrana* and *Leccino*) Cv. were supplied from «Madama Oliva» - Carsoli - L'Aquila, Italy. Black olives were collected at the black stage of ripeness. After discarding of damaged olives and washing of the remaining with water, fruits were immediately transferred in plastic vessels, containing freshly prepared brine (8% NaCl) and transported to the DSEEA-Sezione di Tecnologie e Biotecnologie degli Alimenti (University of Perugia), where the olives were stored at +4°C until the start of the fermentation trials.

2.5. Inoculation and pilot plant-scale fermentation

For the inoculation, a strain of *Lactobacillus pentosus* selected in this work was used. Freeze-dried culture of the above strain, at concentration of 1×10^{11} cfu/g, were prepared by T.H.T.S.A., Gembloux (Isnes) - Belgium. Inoculation was carried out by adding an appropriate quantity of freeze-dried culture to brines in order to have an

initial cell concentration of about 10^8 cfu/ml. Fermentations were performed at pilot plant-scale both for *Itraia* and *Leccino Cv* at 28°C in fermenters containing 100 kg of olives and 100 l of modified brine. One hundred kg of olives in 100 l of brine (6% NaCl), i.e. fermentation with indigenous microflora, were used as control for each trial.

2.6. Microbiological analyses

Microbiological analyses of brine samples were performed by viable counts on specific media. Mesophilic lactobacilli under microaerophilic conditions at 30°C for 48h (MRS Agar, Difco, containing cycloheximide at a concentration of 170 mg/l) and coliforms (Violet Red Bile Agar, Difco) at 37°C for 18h, were enumerated before and during pilot plant-scale fermentations, at defined intervals of time.

2.7. Physicochemical analyses

At the same time of microbiological analyses, brine samples were assayed for pH using a Corning 140 pH meter (Corning, Halstead, Essex; England) and for glucose as well as D- and L- lactic acid and acetic acid concentration by enzymatic methods (Boehringer-Mannheim, Milan, Italy).

2.8. Phenolic compounds analysis

The HPLC evaluation of phenolic compounds was carried out according to the method reported in a previous paper (Montedoro *et al.*, 1992) but using an *Inertsil ODS-3* column (150 x 4,6 mm i.d.) from *Alltech Italia* S.r.l. (Sedriano, Milan).

2.9. Sensory analysis

Descriptive-quantitative analysis of sensory attributes was carried out by a panel of eight people trained to perform virgin olive oil sensory analysis, after a training to familiarize with the specific descriptor for the bitter evaluation on table olives, using the analytical procedure reported in previous paper (Servili *et al.*, 1995).

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. LAB isolation, preliminary identification and physiological characterization

Based on preliminary assays (data not shown), microorganisms isolated from brines by using MRS Agar medium were included in *Lactobacillus* and *Enterococcus* genus. All the 50 isolates were assayed for resistance to NaCl by evaluating their kinetics of growth in MRS broth containing various concentration of salt. Figure 4 shows the growth in MRS with 8% NaCl of 3 strains representatives of 3 different group of LAB with similar behaviour. The upper line (control) represents the growth of a strain (similar results were obtained for the other 49) in MRS broth without NaCl. Overall, 23 strains showed a growth similar to that of the control, thus demonstrating high resistance to 8% NaCl; 12 strains was partially inhibited by the presence of NaCl; and the growth of 15 strains was totally stopped by the presence of salt.

The 23 strains not inhibited by 8% NaCl were further investigated for resistance to oleuropein and verbascoside. These compounds are recognized as potent inhibitors of bacterial growth.

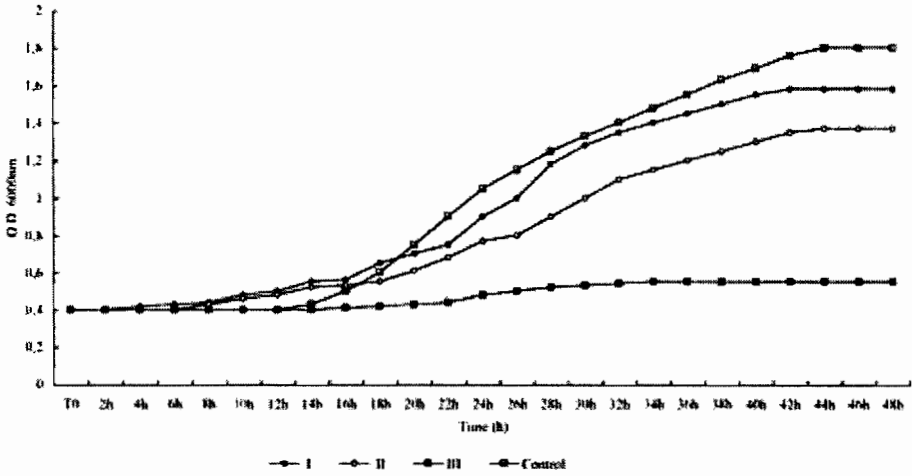


Figure 4. Growth in MRS broth (8% NaCl) at 28°C, during 48h, of 3 strains representatives of 3 different group of lactic acid bacteria (I: 23 strains;II: 12 strains;III: 15 strains).Growth of the control strain in MRS broth without NaCl.

The growth of only 4 strains was not significantly influenced by the presence of the inhibitory substances (Figure 5A and 5B).

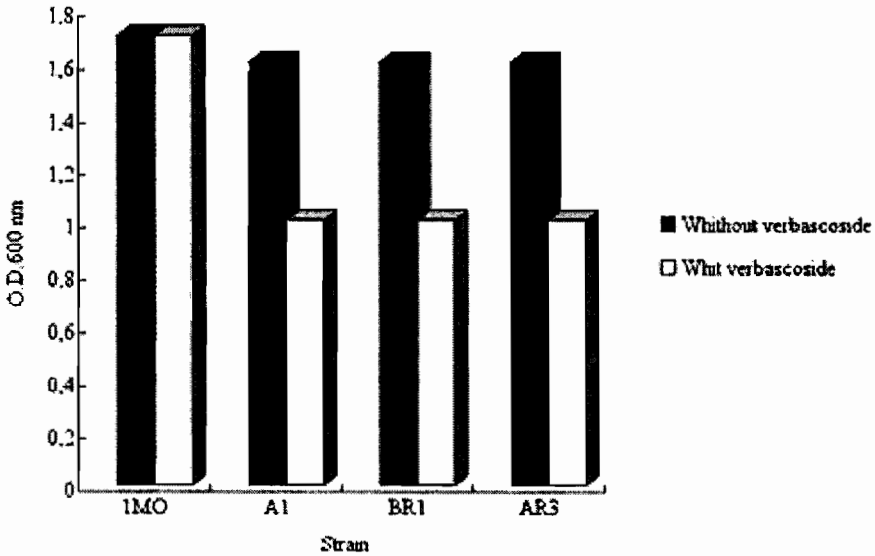


Figure 5A. Growth of lactic acid bacteria in MRS containing verbascoside (0.5%)

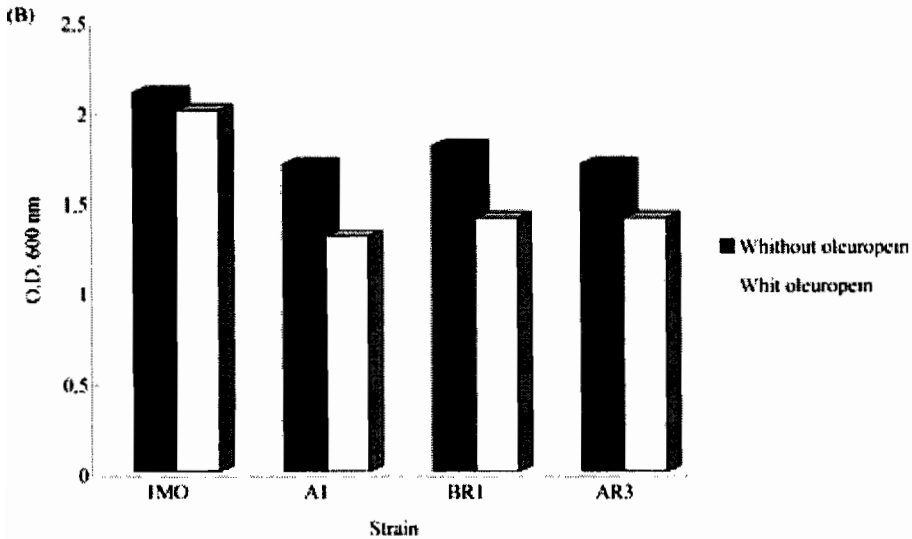


Figure 5B. Growth of lactic acid bacteria in MRS containing oleuropein (0.1%)

The resistance of the above strains could rely on their ability to hydrolyse phenolic compounds, contributing partially to the debittering process (Nychas *et al.*, 2002). It has been reported that the most important factors that could limit the adaptation of LAB to the brine environment are:

- the initial salt concentration,
- nutrient availability,
- presence of natural inhibitory compounds (Panagou *et al.*, 2002).

Based on this consideration, and in order to approach the real conditions of brine fermentation, we evaluated the growth of the previous 4 strains in a brine containing 6% NaCl, 0.05% oleuropein, 0.15% verbascoside, added of 0.3% glucose and 0.05 yeast extract, adjusted to pH 6 and filter-sterilized. The addition of carbohydrates and growth factors was performed in order to selectively enhance the growth of selected LAB in view of their use as starter cultures. Results shown in Figure 6 demonstrate the greater aptitude of the strain IMO to growth in modified brine with respect to the other strains studied.

Overall, the results of LAB characterization indicated that the strain IMO was the most resistant to high NaCl, oleuropein and verbascoside concentration as well as the best strain growing in modified brine. Based on phenotypic and genotypic analysis, the strain IMO was identified as *Lb. pentosus*.

On the basis of the above results *Lb. pentosus* IMO was selected to be used as starter for controlled fermentation, at pilot plant-scale, in the production of black table olive of *Leccino* and *Itrana* Cv. All the results showed here refers to 8 days of fermentation, since at this time, as indicated below, the chemical data indicated the end of the debittering process.

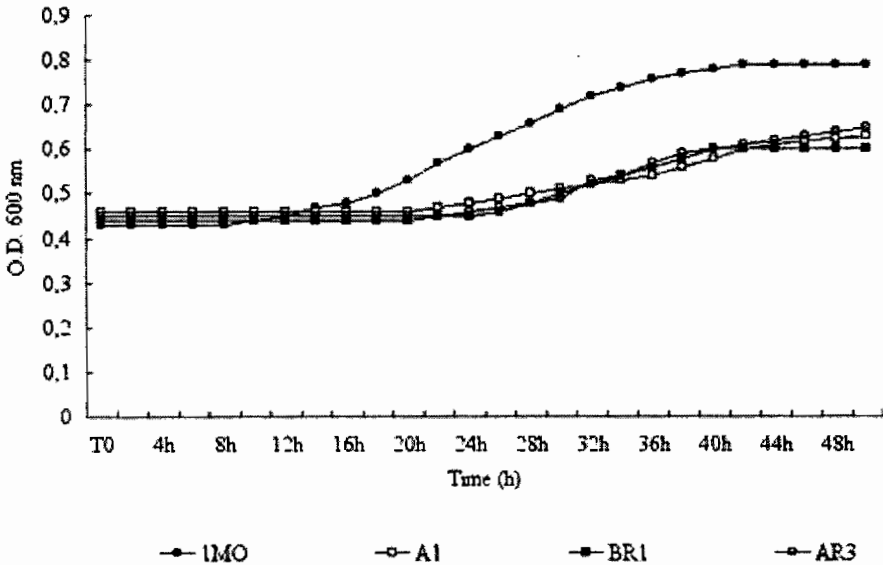


Figure 6. Growth of lactic acid bacteria in filter-sterilized brine (pH 6) containing 6% NaCl, 0.05% oleuropein, 0.15% verbascoside and added of 0.3% glucose and 0.05% yeast extract

Moreover, only the data for LAB and coliforms are reported with reference to the microbial population of black olives of *Itrana* and *Leccino* Cv. (Figure 7). After washing and prior to brining different values of microbial count characterized the two varieties, indicating a different degree of fruit contamination. In particular values of \log_{10} 3 cfu/ml and \log_{10} 5 cfu/ml coliforms, and of \log_{10} 2 cfu/ml and \log_{10} 6 cfu/ml LAB were found for *Itrana* and *Leccino* Cv., respectively (Figure 7A and 7C). In both the cases the brines inoculated with *Lb. pentosus* IMO presented a marked increase (\log_{10} 8 cfu/ml) in the number of LAB from the beginning of fermentation (Figure 7B and 7D). *Lb. pentosus* remained stable at the above value and dominated the fermentation until the end of fermentation (8 days) (Figure 7B and 7D). In control brine of *Itrana* Cv., indigenous LAB, probably due to the low initial level, reached a value near \log_{10} 3 cfu/ml after 8 days of fermentation (Figure 7A). On the contrary, in the most contaminated *Leccino* Cv. control brine, the indigenous LAB reached a value of about \log_{10} 8 cfu/ml after 8 days of fermentation (Figure 7C) and equaled, at this time, the number of *Lb. pentosus* in started brine (Figure 7D). In control brines the coliforms showed a little initial increase but rapidly decreased thereafter (see *Leccino* Cv.) when LAB growth started (Figure 7C). The significant decrease of coliforms was particularly evident from the beginning of fermentation in inoculated brines of both olive Cv. (Figure 7B and 7D). As reported by other authors (De Castro *et al.*, 2002), it is during the first days of fermentation that the risk of spoilage, because of growth of non-LAB, is highest. Thus inoculation with starter cultures of lactobacilli during these first days can improve the fermentation process since the achievement of lactic acid fermentation as soon as possible can reduce the likelihood of spoilage. In our study

the pH value was used to monitor the fermentation process. The evolution of this fundamental parameter suggest a higher rate of fermentation when inoculation was carried out. As reported in Figure 8, the pH of both inoculated processes dropped from pH 6.0 at the beginning of fermentation to values lower than 4 after two days of fermentation and reached a pH near to 3.6 after 8 days. Despite the high level of LAB throughout the control process of *Leccino* Cv. (Figure 7C), the final pH values did not exceed the values of 4.8 (Figure 8B), depending on a lower content of glucose and absence of yeast extract, lesser acidifying activity of indigenous LAB with respect to the selected *Lb. pentosus* strain and/or major competition for carbon sources with indigenous lactic acid-consuming yeasts in the non inoculated process.

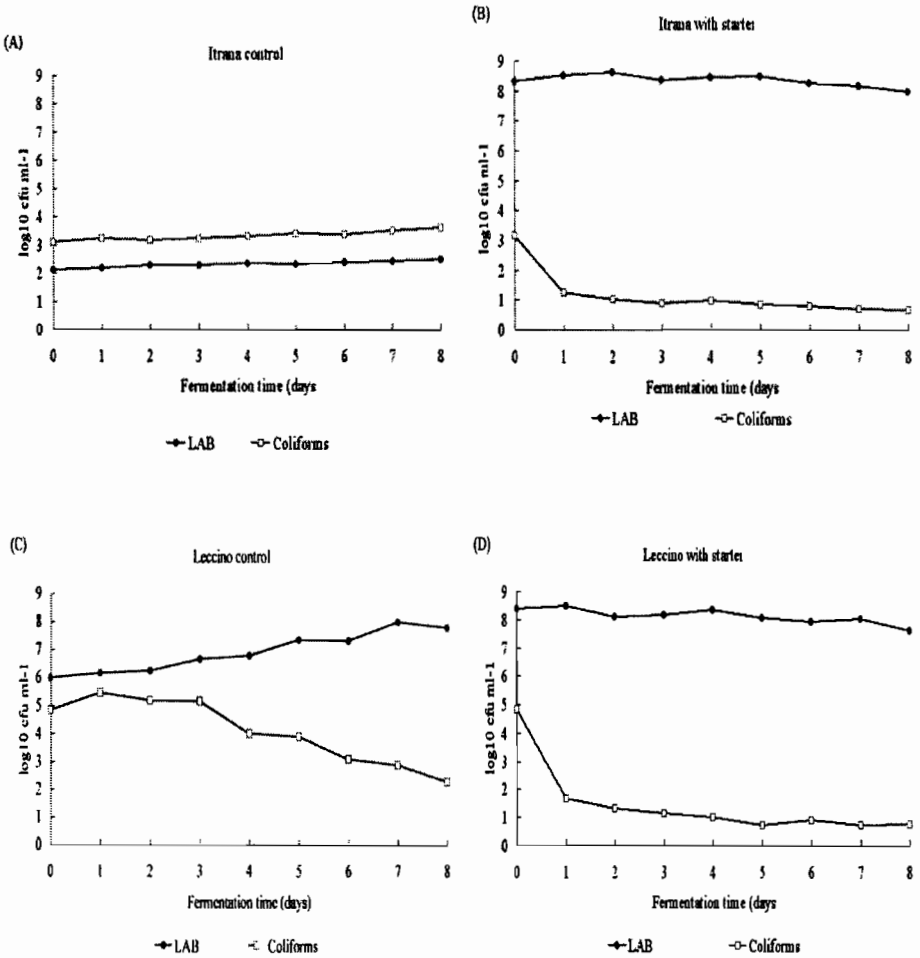


Figure 7. Changes in lactic acid bacteria and coliforms during the fermentation of *Itrana* and *Leccino* olives with the indigenous flora (Control) or with *Lactobacillus pentosus* starter culture

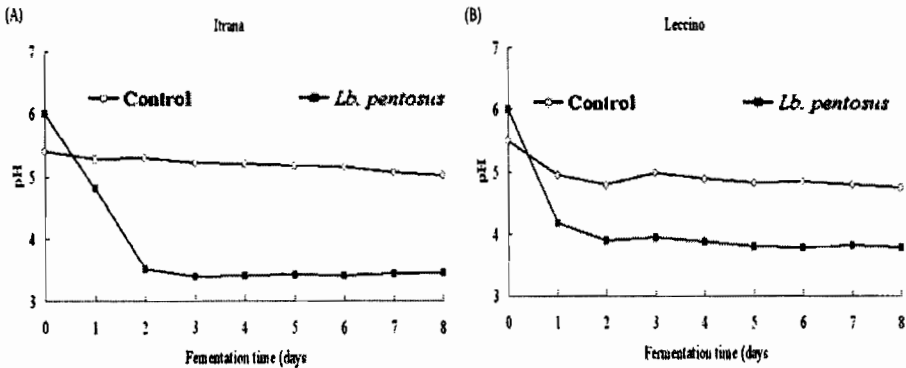


Figure 8. Changes in pH during the fermentation of black olives with the indigenous flora (Control) or with *Lactobacillus pentosus* starter culture

In order to have a better understanding of the role of the selected starter on the fermentation process and to eliminate the interference of indigenous lactic acid bacteria, only the data referred to the *Itrana* Cv. (showing a low number of contaminating LAB) fermentation process are reported below. Nevertheless, similar results were obtained with *Leccino* Cv. (data not shown). The fast fermentation process by *Lb. pentosus* in the inoculated brine is reflected by a fast consumption of the added glucose (Figure 9). According to the pH decrease, all the glucose was almost completely depleted within the 2nd day of fermentation. In control brine there was a very low initial concentration of glucose which remained unchanged thereafter probably due to limited microbial activity. In order to monitor the main product of LAB metabolism, lactic and acetic acids were measured during the fermentation process in both inoculated and non inoculated brines (Figure 10). Lactic acid, the main product of glucose fermentation by *Lb. pentosus*, showed a fast increase within 3 days of fermentation according to the rapid growth and fermentative activity of the inoculated starter (Figure 10A). At the end of the fermentation 6g/l of lactic acid were produced in brine by *Lb. pentosus* while no lactic acid was detected in the control brine. An accelerated production of acetic acid was also observed with less significant differences between inoculated and control process (Figure 10B).

3.2. Phenolic composition of olives and sensory analysis

As shown in Figure 11 and 12 the fermentation of brined olives with *Lb. pentosus* strongly modify phenolic composition of olives. In fact Figure 11 and 12 show that oleuropein and the aglycon derivatives of oleuropein (3,4-DHPEA-EDA) strongly decrease in the olives after fermentation in *Itrana* and *Leccino* Cv., while 3,4-dihydroxyphenylethanol increases. The concentration of verbascoside, on the contrary shows a low modification, that prove the selective activity of hydrolytic enzymes produced by *Lb. Pentosus* during fermentation for the secoiridoid compounds. The 3,4-dihydroxyphenylethanol and 3,4-DHPEA-EDA in the brine improve, reducing the phenolic concentration of fermented olives.

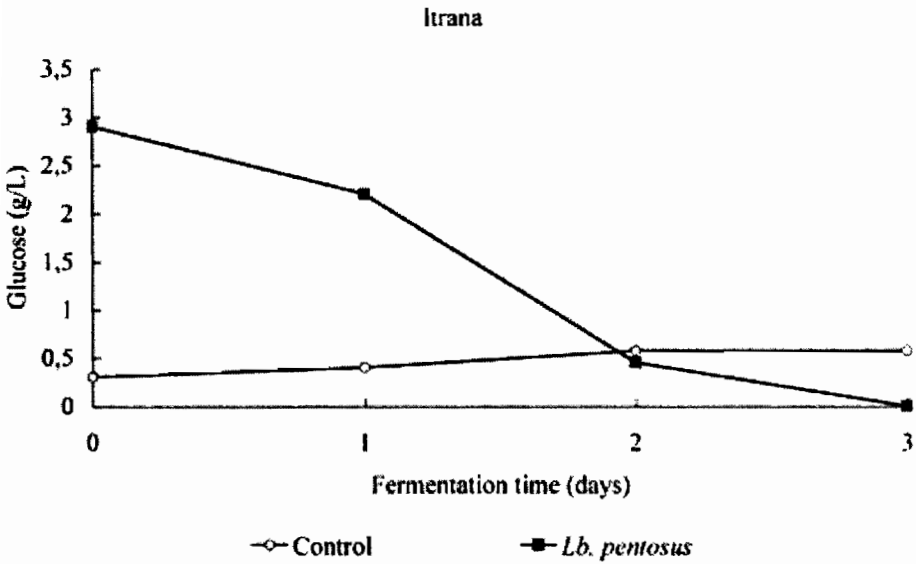


Figure 9. Changes in glucose during the fermentation of *Itrana* Cv. with the indigenous flora (Control) or with *Lactobacillus pentosus* starter culture

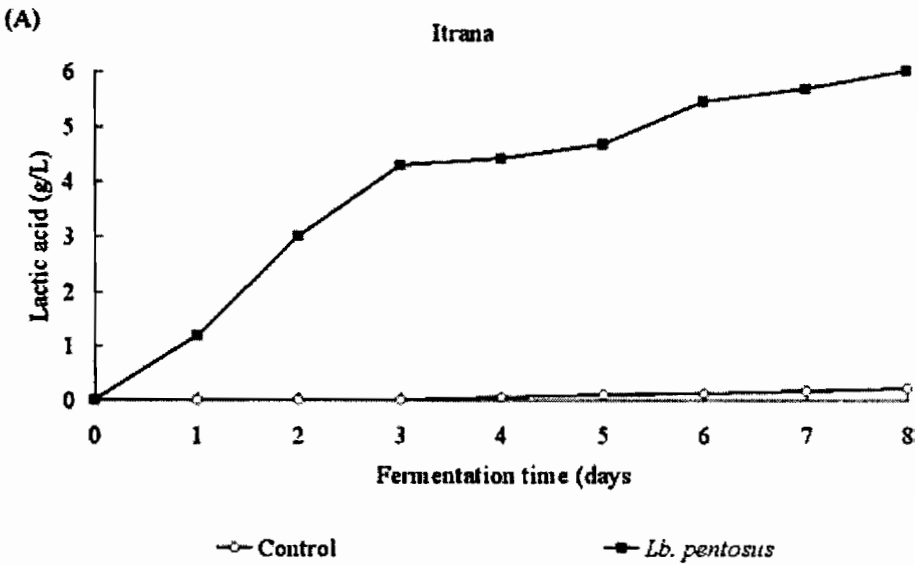


Figure 10A. Changes in lactic and acetic acid during fermentation of *Itrana* olives with the indigenous flora (Control)

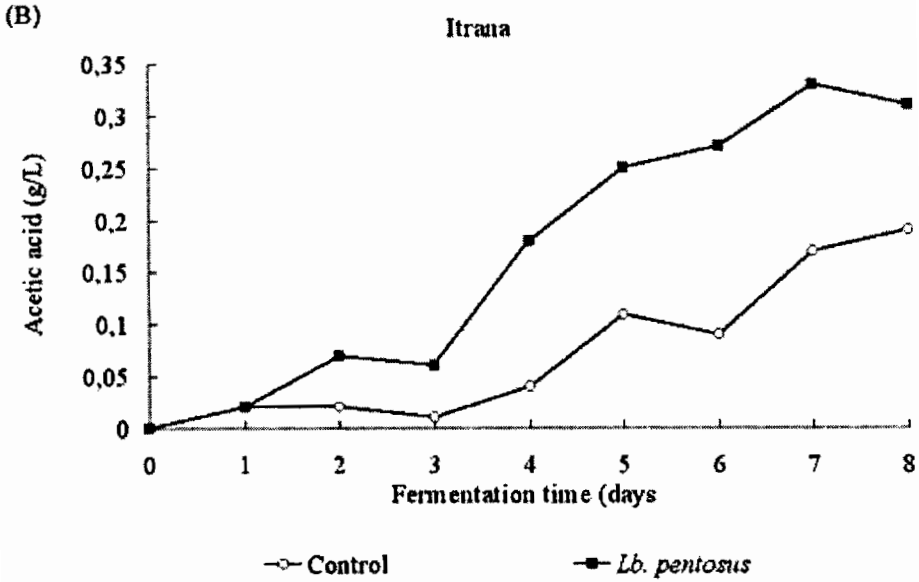


Figure 10B. Changes in lactic and acetic acid during fermentation of *Itrana* olives with *Lactobacillus pentosus* starter culture

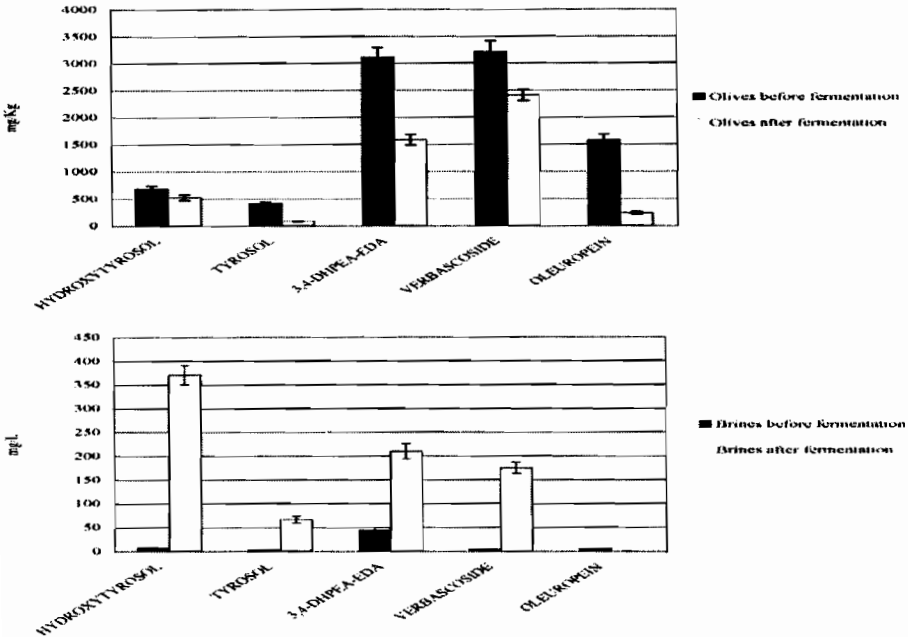


Figure 11. Phenolic content of *Itrana* Cv. in olives (mg/kg) and brines (mg/L)

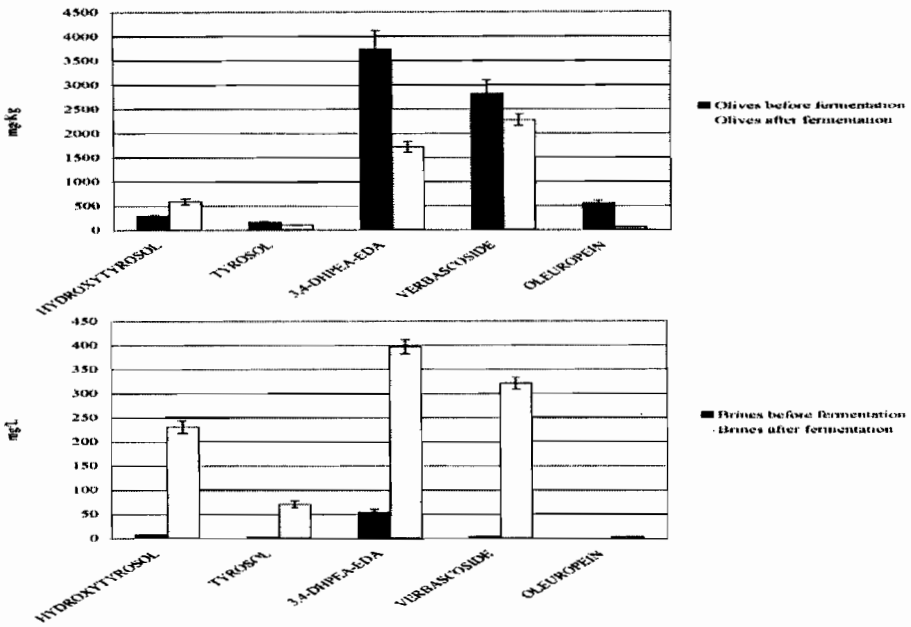


Figure 12. Phenolic content of *Leccino Cv.* in olives (mg/kg) and brines (mg/L)

The release of hydrolyzed phenolic compounds in the brine, after fermentation gives, a significant reduction of bitter taste of brined olives as shown by the sensory analysis results reported in figure 13.

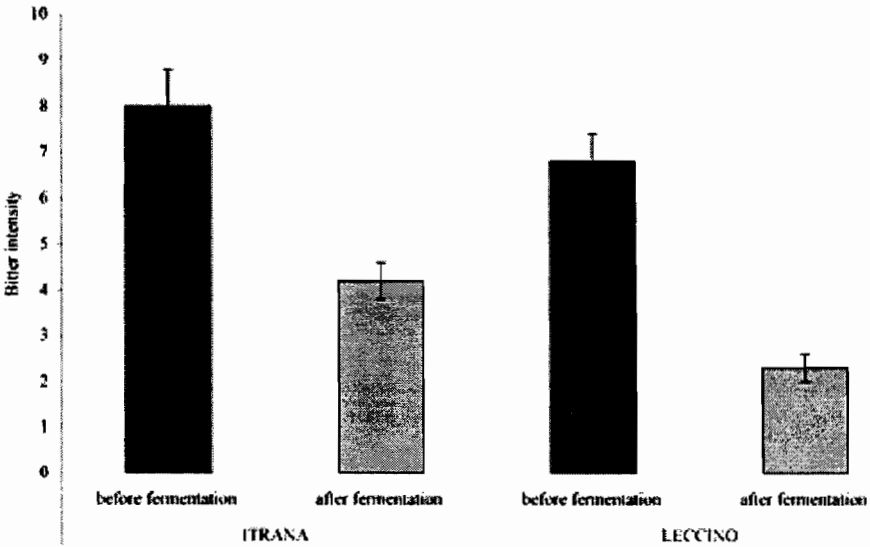


Figure 13. Bitter sensation of *Itrana* and *Leccino Cv.* brined olives tasted before and after fermentation

4. CONCLUSIONS

Four main conclusions can be drawn from the present work:

- The addition of *Lb. pentosus* represents an useful tool to decrease the possibility of spoilage and justifies the use LAB as starter cultures in order to improve the safety and quality of black table olives.
- The growth of LAB and the levels of the most important fermentation parameters (lactic acid production and pH) was better in the brines supplemented with glucose and yeast extract and inoculated with selected strain.
- The pilot plant-scale trials showed that a rapid controlled fermentation process can be obtained by using brine modified for pH value, carbohydrate and growth-factor concentration in presence of carefully selected LAB.
- *Lb. Pentosus* hydrolyzed oleuropein and 3,4-DHAEA-EDA while verbascoside was not affected by the hydrolytic activity. The release of 3,4-dihydroxyphenylethanol and 3,4-DHPEA-EDA, in the brine, after hydrolysis reduced the phenolic concentration in fermented olives and, as consequence, their bitter taste.

5. ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank the Factory "Madama Oliva" (Carsoli - L'Aquila, Italy) for supplying olive samples.

6. REFERENCES

- Andary C., Wylde R., Laffite C., Privat G. & Winternitz F. (1982) Structure of verbascoside and orobanchoside, caffeic acid sugar esters from *Orobanche rapum-genistae*. *Phytochem.* 21: 1123
- Berliner J.A., Navab M., Fogelman A.M., Frank J.S., Demer L.L., Edwards P.A., Watson A.D. & Luiss Aj. (1995) Atherosclerosis: Basic Mechanisms. *Circulation* 91(9): 2488
- Brenes M., García A., Rios J.J., García P. & Garrido A. (2002) Use of 1-acetoxypinoresinol to authenticate Picual olive oils. *J. Food Sci. Tech.* 37: 615
- Ciafardini G., Marsilio V., Lanza B. & Pozzi N. (1994) Hydrolysis of oleuropein by *Lactobacillus plantarum* strains associated with olive fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 4142-4147
- Comi G., Manzano M., Cocolin L., Vailanti P., Cantoni C. & Giomo A. (2000) Valutazione dell'attività di starters microbici nella preparazione delle olive da mensa. *Industrie Alimentari* 39: 1258-1265
- Corsetti A., Lavermicocca P., Morea M., Baruzzi F., Tosti N. & Gobbetti M. (2001) Phenotypic and molecular identification and clustering of lactic acid bacteria and yeast from wheat (species *Triticum durum* and *Triticum aestivum*) sourdoughs of Southern Italy. *Int. J. of Food Microbiol.* 64: 95-104
- Corsetti A., Settanni L. & Van Sinderen D. (2004) Characterization of bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) from sourdough lactic acid bacteria and evaluation of their *in vitro* and *in situ* activity. *J. Appl. Microbiol.* 96: 521-534
- de Castro A., Montañó A., Casado F.-J., Sánchez A.-H. & Rejano L. (2002) Utilization of *Enterococcus casseliflavus* and *Lactobacillus pentosus* as starter culture for Spanish style green olive fermentation. *Food Microbiol.* 19: 637-644

- Durán Quintana M.C., García García P. & Garrido Fernández A. (1999) Establishment of conditions for green table olive fermentation at low temperature. *Int. J. Food Microbiol.* 51: 133–143
- Gariboldi P., Jommi G. & Verotta L. (1986) Secoiridoids from *Olea europea*. *Phytochem.* 25: 865–869
- Garrido Fernández A., Díez M.J. & Adamos, M.R. (1997) *In Table olives: production and processing*; Chapman & Hall, London, 67–109.
- Gutiérrez F., Rosales S., Perdiguero R., Gutiérrez J. & Olias M. (1992) Evaluation of bitter taste in virgin olive oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 69: 394
- IOOC Reunión del Consejo Oleícola Internacional. (1999) Informe sobre los asuntos relativos a las aceitunas de mesa. *International Olive Oil Council* COI. COT/R.61/Doc. 2, 1–10. 81st meeting, Jaen, Spain
- Maestro Durán R. & Vasquez Roncero A. (1976) Colorantes antocianicos de las aceitunas manzanillas maduras. *Graças y Aceites* 27: 237
- Marekow N.L. (1984) Polyphenols Research in Bulgaria. *Bull Liaison Groupe Polyphenols*, 12–31
- Mazza J. & Miniati E. (1993) Anthocyanins in fruits, vegetables and grains CRC Press, Boca Raton, Florida (USA), 64–67
- Montedoro G.F., Baldioli M. & Servili M. (1992) I composti fenolici dell'olio di oliva e la loro importanza sensoriale, nutrizionale e merceologica. *Giornale Ital. di Nutriz. Clin. e Prev.* 1: 19
- Montedoro G.F., Servili M., Baldioli M. & Miniati E. (1992) Simple and hydrolyzable compounds in virgin olive oil. 1. Their extraction, separation and quantitative and semiquantitative evaluation by HPLC. *J. Agric. Food. Chem.* 40: 1571–1576
- Nakae D., Kobayashi Y., Akai H., Andoh N., Satoh H., Ohashi K., Tsutsumi M. & Konishi Y. (1997) Involvement of 8-hydroxyguanine formation in the initiation of rat liver carcinogenesis by low dose levels of N-nitrosodiethylamine *Cancer Res.* 57: 1281
- Nychas G.-J.E., Panagou E.Z., Parker M.L., Waldron K.W. & Tassou C.C. (2002) Microbial colonization of naturally black olives during fermentation and associated biochemical activities in the cover brine. *Lett. Appl. Microbiol.* 34: 173–177
- Orlando R.C. (2002) Mechanisms of epithelial injury and inflammation in gastrointestinal diseases. *Rev. Gastroenterol. Disord.* 2: S2
- Panagou E.Z., Tassou C.C. & KatsaboxiaKis C.Z. (2002) Induced lactic acid fermentation of untreated green olives of the *Conservolea* cultivar by *Lactobacillus pentosus*. *J. Sci. Food Agric.* 83: 667–674
- Piga A., Agabbio M. & Farris G.A. (2002) Influenza di alcuni interventi tecnologici nella trasformazione al naturale di olive da mensa. *Industrie Alimentari* 41: 1–6
- Rocca B. & Fitzgerald G.A. (2002) Cyclooxygenases and prostaglandins: shaping up the immune response. *Int. Immunopharmacol.* 2: 603–630
- Rodríguez de la Borbolla y Alcalá J.M., Fernández Díez J.M. & González-Cancho F. (1969) Influence of pasteurization and lye treatment on the fermentation of Spanish-style Manzanilla olives. *Appl. Microbiol.* 17: 734–773
- Rodríguez de la Borbolla y Alcalá J.M., González-Cancho F. & González Pellissó F. (1971) Aceitunas verdes y de color cambiante en salmuera. *Graças y Aceites* 22: 455–460
- Romani A., Mulinacci N., Pinelli P., Vinceri F.F. & Cimato A. (1999) Polyphenolic content in five tuscan cultivars of *Olea europea* L. *J. Agric. Food Chem.* 47: 964
- Ruiz-Barba J.L., Brenes Balbuera M., Jiménez-Díaz, García García P. & Garrido- Fernández A. (1993) Inhibition of *Lactobacillus plantarum* by polyphenols extracted from two different kinds of olive brine. *J. Appl. Bacteriol.* 74: 15–19

- Ryan D., Prenzler P.D., Lavee S., Antolovich M. & Robards K. (2003) Quantitative changes in phenolic content during physiological development of the olive (*Olea europea*) cultivar *Hardy's Mammoth*. *J. Agric. Food Chem.* 51: 2532
- Sánchez A.H., Rejano L., Montaña A. & de Castro A. (2001) Utilization at high pH of starter cultures of lactobacilli for Spanish-style green olive fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 67: 115-122
- Servili M., Baldioli M., Selvaggini R., Macchioni A. & Montedoro, G.F. (1999) Phenolic compounds of olive fruit: one and two dimensional nuclear magnetic resonance characterization of nüzhenide and its distribution in the constitutive parts of fruit. *J. Agric. Food Chem.* 47: 12
- Servili M., Baldioli M., Selvaggini R., Miniati E., Macchioni A. & Montedoro G.F. (1999) HPLC evaluation of phenols in olive fruit, virgin olive oil, vegetation waters and pomace and 1D and 2D-NMR characterization. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 76: 873
- Servili M., Conner J.M., Piggot J.R., Withers S.J. & Patherson A. (1995) Sensory characterization of virgin olive oil and relationship with head-space composition. *J. Sci. Food Agric.* 67: 61-70.
- Tassou C.C., Panagou E.Z. & Katsaboxakis K.Z. (2000) Microbiological and physicochemical changes of naturally black olives fermented at different temperatures and NaCl levels in the brines. *Food Microbiol* 19: 637-644
- Tsimidou M. (1998) Polyphenols and quality of virgin olive oil in retrospect. *Ital. J. Food Sci.* 10: 99
- Vasquez Roncero A., Graciani Costante E. & Maestro Durán R. (1974) Componentes fenólicos de la aceituna. Polifenoles de la pulpa. *Graças y Aceites* 25: 269

Use of a selected strain of *Lactobacillus pentosus* in the production of black- (*Itrana* and *Leccino* Cv.) table olives at pilot plant-scale

Fifty lactic acid bacteria (LAB) isolated from black table olive brines were evaluated on the basis of salt-tolerance, resistance to oleuropein and verbascoside and growth in modified, filter-sterilized brines. A strain of *Lactobacillus pentosus* was selected and used as starter to ferment, at 28°C, black (*Itrana* and *Leccino* Cv.) olives, in pilot plant-scale, in brines modified for pH value, carbohydrate and growth-factor concentration. For *Leccino* Cv. olives, temperature-controlled fermentation enabled the obtaining of ready to eat, high quality table olives, after 8 days of fermentation. At the above time chromatographic analysis of fermented olives and brines showed a decrease of oleuropein glycoside and an increase of hydroxytyrosol, marking the end of the debittering process.

Keywords: Fermentation - Lactic acid bacteria - *Lactobacillus pentosus* - Oleuropein - Pilot plant scale fermentation - Table olives.

Apport des biotechnologies de marquage génétique à la caractérisation et à la valorisation des ressources génétiques de l'olivier

N. OUAZZANI ¹, A. IDRISSE ¹ & M. ESSADKI ¹

¹ Équipe Olivier, Laboratoire de Marquage Génétique, École Nationale d'Agriculture BP S/ 40 50.000 Meknès-Maroc

Cette communication présente l'intérêt porté aux nouvelles biotechnologies (marqueurs génétiques) pour l'identification et la valorisation des ressources génétiques de l'Olivier. Une telle approche est d'une grande utilité lorsqu'on prend en considération les orientations actuelles des règlements et des normes de certification de la filière oléicole. Pour que l'huile d'olive puisse se voir octroyer l'appellation d'origine contrôlée, l'authenticité variétale et le milieu de culture déterminant largement la qualité de l'huile sont nécessaires. L'utilisation des marqueurs génétiques (enzymatiques et moléculaires «ADN chloroplastique, ISSR et SSR) pour l'identification et l'évaluation de la diversité génétique sera illustré à travers une synthèse des résultats obtenus à partir d'une étude sur les principales variétés méditerranéennes et les peuplements de l'olivier cultivé au Maroc. La combinaison de ces marqueurs génétiques avec des caractères morphologiques, physiologiques et agronomiques pourrait contribuer à la mise en place d'une identification fiable des variétés d'olivier pour une meilleure valorisation des ressources génétiques de cette espèce et son amélioration variétale.

Mots-clés: Olivier (*Olea europaea* L.) - Marqueurs génétiques - Caractérisation - Ressources génétiques.

Effect of genotype-environment interaction on chemical characteristics of virgin olive oil

S. BEN TEMIME ¹, L. ABAZA ¹, B. BACCOURI ¹, W. TAAMALLI ¹,
N. BEN YOUSSEF ¹, D. DAOUD ¹ & M. ZARROUK ¹

¹ Laboratoire de Caractérisation et Qualité de l'Huile d'Olive, INRST B.P.95 - 2050 Hammam-Lif, Tunisia.

Corresponding author, e-mail: mokhtar.zarrouk@inrst.rnrt.tn

The aim of this work was to study differences in quality and chemical composition of virgin olive oils produced from Chétoui olive cultivar over four consecutive crop seasons, taking the nature of the soil and the climatic conditions into consideration. For that purpose, olives at the same stage of maturation ; sampled in different production areas in the north of Tunisia ; were harvested for oil extraction and analysis. Several analytical determinations were made : quality indices as defined by EU Regulations (free fatty acid content, peroxide value and spectrophotometric characteristics in the UV region); parameters involved in oxidation processes (oxidative stability, total phenols, o-diphenols, tocopherols, chlorophyll and carotenoids pigments); fatty acids and volatile compounds. The obtained results showed that the majority of the analytical quality parameters and the flavour of the oils were greatly influenced by the origin zone, i.e., by the climatic and pedologic factors of the production environment, mainly the cumulative rainfall in the case of phenolic compounds and o-diphenols. Moreover, The amounts of phenols and o-diphenols showed a good correlation with stability.

Keywords: Tunisia - Virgin olive oil - Chétoui - Quality indices - Phenols - o-Diphenols.

Lipogenesis and oil composition of nine olive descendants obtained through controlled crossings with Chemlali variety

Hédia MANAI¹, Faouzia MAHJOUR HADDADA¹, Abdelmajid YANGUI²,
Ahmed TRIGUI², Douja DAOUD¹ & Mokhtar ZARROUK¹

¹ Laboratoire de Caractérisation et Qualité de l'Huile d'Olive, INRST, B.P. 95, 2050 Hammam-Lif, Tunisie

² Institut de l'Olivier, B.P. 208, 1082 Tunis, Tunisie.

Auteur correspondant, courriel: mokhtar.zarrouk@inrst.rnrt.tn

A major effort has been made in recent years for improving the quality of olive oil produced in Tunisia. The research of effective varieties, through inter-varietal controlled crossings constitutes a mean susceptible to provide cultivars having a better oil quality. This study was designed to characterize the virgin olive oil from nine descendants of olive-tree obtained through inter-varietal crossings (controlled hybridization) between «Chemlali Sfax» variety and other local or foreign varieties (done by Dr. Trigui, 1995). Chemlali Sfax's oil is figeable, but appreciated for its organoleptic and gustatory characteristics, it has an acidic composition whose improvement is essential (characterized by high rates of palmitic and linoleic acids and low rate of oleic acid). The aim of controlled crossings on «Chemlali Sfax» was to improve its oil quality while preserving the cultivar's characteristics, in particular its vigour and its resistance to arid medium. In order to evaluate oil quality of the nine descendants, a follow-up of oil accumulation and changes of fatty acid levels during olive fruit maturation were studied. We have also considered biochemical and quality characteristics (oil yield, acidic composition and phenolic compounds) in the fruits at complete ripeness. Maturity is often a compromise between oil quality and quantity, but is a key factor in determining the style of oil produced. It can even have a greater influence on oil quality of the variety. For each descendant there is about three or four weeks of ideal harvest period to reach its best quality. The results show that the analysed parameters change with the descendant genotype resulting in a clear variability. According to this biochemical study we can make out five cultivars, which show an excellent quality of oil compared with that of Chemlali Sfax. These five descendants are interesting and distinctly present an improved acidic composition, so a further study is required for their complete characterization.

Changes in olive oil quality according to genetical and environmental factors

L. ABAZA, W. TAAMALLI, S. BEN TEMIME, A. ALLALOUT & M. ZARROUK

Laboratoire de Caractérisation et Qualité de l'Huile d'Olive, INRST B. P.95 - 2050 Hammam-Lif, Tunisia.

Corresponding author, e-mail: mokhtar.zarrouk@inrst.rnr.tn

Olive oil composition and quality are the result of several factors including the cultivar, the pedoclimatic conditions and the production practice. The aim of the present work is to investigate the effects of botanical and geographical origins on olive oil chemical characteristics of some local and introduced varieties in Tunisia. Some chemical parameters were studied mainly fatty acid composition, triacylglycerol molecular species, phenolic and tocopherolic compounds.

Keywords: Olive oil - Cultivars - Botanical and geographical origins - Composition - Quality.

Variability of olive oil quality as related to cultivar and agronomic factors in Sicily

A. MOTISI¹, G. CAMPISI¹, T. CARUSO¹, L. CATAGNANO², R. SACCHI³,
M.L. AMBROSINO³ & C. FINOLI⁴

¹ Dipartimento di Colture Arboree, University of Palermo - Viale delle Scienze, 11 - 90128 Palermo, Italy

² Assessorato Agricoltura e Foreste Regione Siciliana U.O. 112 - Via Ovidio 26, 92019 Sciacca (Ag).

³ Dipartimento di Scienze degli Alimenti, University of Napoli - Via Università, 100 - 80055 Portici, Italy

⁴ Dipartimento di Ingegneria e Tecnologie Agro-Forestali, University of Palermo - Viale delle Scienze, 11 - 90128 Palermo, Italy

In Sicily the olive oil industry is based on 9 cultivars namely: Biancolilla, Cerasuola, Nocellara del Belice, Giaraffa, Tonda Iblea, Moresca, Nocellara Etnea, Ogliarola, Santagatese. Each of these cultivars is grown in a different area of the Island and, consequently, contributes to a large extent to characterize their olive oil, from the organoleptic and chemical point of view. For this reason, recently the Sicilian local government submitted to the European Union the proposal to established 9 different DOP (Protected Denomination of Origin). Since each DOP area extends over a wide range of environmental and edaphic conditions, a large degree of variation on olive oil quality can still be expected. For this reason, in three of the major DOP areas of West-Sicily ("Valli Trapanesi", "Valle del Belice" and "Val di Mazara"), for three consecutive years, has been carried out an investigation to study the variability of olive oil quality as related to cultivar, location of the olive grove and orchard management. From a methodological point of view, it has been decided to include in the study only oil samples that conformed to a well defined set of fruit sanity, harvest criteria and oil extraction aimed to maximize oil quality and, hence, explore the oil quality potential of those production areas. Olive oil quality was affected, in order of importance, from the cultivar, the degree of maturation and the location of growing. Discriminant analysis on fatty acid oil composition was able to identify the various cultivars of the monovarietal oils; blended oils were identified on the basis of the main cultivars that entered its composition; within cultivar, oils could be discriminated by site of production. Since in the DOP areas investigated olive trees are older than one century, even if the varietal composition has been ascertained, the presence of local clones cannot be excluded. For this reason whether this effect is related to environmental or genetic factors, deserves further investigations.

Keywords: Olive - Cultivars - Quality - DOP - Multivariate analysis

Morphological, phenological and molecular characterization of the Sicilian indigenous olive (*Olea europaea sativa*. L.) germplasm

Tiziano CARUSO¹, G. CAMPISI¹, A. MOTISI¹, M. LA MANTIA¹,
G. OCCORSO¹, D. CARTABELLOTTA², O. LAIN³ & R. TESTOLIN³

¹ Dipartimento di Colture Arbore, University of Palermo, Viale delle Scienze, 11 - 90128 Palermo, Italy

² Assessorato Agricoltura e Foreste - Regione Sicilia - Viale Regione Siciliana, 2226 - 90135 Palermo, Italy

³ Dipartimento di Scienze Agrarie ed Ambientali, University of Udine - Via delle Scienze, 208 - 33100 Udine, Italy

Olive tree (*Olea europaea* L.) cultivation in Sicily goes back to the Phoenicians settlement but its exploitation started during the Greek domination of the Island (7th century BC). Since those times, the particular geographical position of Sicily has favoured the trade among the Mediterranean inhabitants with their the exchange of culture, goods, food and plants. The Mediterranean region produces about 99% of the olive in the world and almost 2000 cultivars have been identified and gathered in germplasm collections in various Mediterranean countries. In spite of the fact that Sicily shares with the others Mediterranean countries common climate conditions, due to the variability of altitudes between the coastal areas and those inland, in the Island changes in soils characteristics and in microclimatic conditions, even among close counties, are very common. This phenomenon creates differences in the environmental pressure, and in turns, constitutes a natural tool to select genotypes. Furthermore, the different taste appeal of the olive products as well as the different degree of resistance to the biotic and abiotic stresses of the various genotypes, may have contributed to the differentiation of an indigenous germplasm. By the 80' a broad investigation activity carried out in the olive groves of the Island allowed to collect more than 100 genotypes that were propagated topworking adult trees. The observation carried out for ten years on morphological and phenological traits evidenced that among the genotype collect 35 were different cultivars and 10 presumed clones of one of the most widespread varieties of Sicily: "Biancolilla". More recently an experimental olive orchard with those cultivars and clones has been established to study the morphological, phenological and molecular traits of the indigenous germplasm of Sicily.

Keywords: Olive germplasm - Morphological traits - SSR

La verticilliose de l'olivier . Mécanismes de défense de l'hôte et facteurs de pathogénicité du parasite

B. RAHIOUI¹, J. CHARAFI¹, E. EL BOUSTANI², A. EL MEZIANE¹,
B. BOULOHA³ & C. EL MODAFAR¹

¹ Laboratoire de Biotechnologie et Phytopathologie Moléculaire, Faculté des Sciences et Techniques Guéliz, B.P. 549, 40 000 Marrakech

² Laboratoire de Biochimie Nutritionnelle et Pathologique, Faculté des Sciences Semlalia, Marrakech.

³ UR Amélioration Génétique des Plantes, INRA, Marrakech

Auteur correspondant, courriel: elmodafar@fstg-marrakech.ac.ma

La verticilliose, causée par *Verticillium dahliae*, représente actuellement l'un des principaux facteurs limitant la survie de l'olivier. La lutte génétique représente actuellement la seule alternative pour enrayer cette maladie. Pour sélectionner les sujets résistants au sein de populations issues de croisements dirigés, la démarche empirique basée sur des infections expérimentales et l'observation des symptômes est lourde et longue. La démarche rationnelle consiste à comprendre les bases biochimiques et moléculaires des interactions hôte - parasite. Nos travaux s'inscrivent dans ce contexte et ont pour objectif premier d'apporter des connaissances sur les principaux mécanismes de défense de l'olivier à la verticilliose. Les extraits hydro-alcooliques des feuilles manifestent un pouvoir inhibiteur vis-à-vis de la croissance mycélienne de *Verticillium dahliae*. Cette fongitoxicité est totale avec les extraits de la variété résistante alors qu'elle n'est que de 60% avec ceux de la variété sensible. Le piégeage des phénols des extraits hydro-alcooliques par le PVP (polyvinylpyrrolidone) permet d'enlever totalement l'inhibition des extraits de la variété sensible alors que la croissance fongique n'est réduite que partiellement (de 43%) avec les extraits de la variété résistante. L'analyse de la composition phénolique des feuilles n'a pas montré de différence d'ordre qualitatif entre la variété résistante et la variété sensible, tous les composés phénoliques foliaires caractérisés ont été mis en évidence chez les deux variétés étudiées. Cependant, les extraits foliaires de la variété résistante renferment des teneurs en phénols totaux 3,6 fois plus importantes que celles de la variété sensible. Cette différence est nettement plus marquée au niveau des différentes familles phénoliques. Ainsi, les teneurs en dérivés hydroxycinnamiques et en flavonoïdes sont respectivement 5,3 et 4,5 fois plus importantes que celles qui sont chez la variété sensible. De même, la variété résistante est 3,7 et 4,1 fois plus riche respectivement en flavanes monomères et en flavanes polymérisées. Ces résultats montrent clairement l'implication des composés phénoliques solubles dans l'inhibition de la croissance

mycélienne de *V. dahliae* constituant ainsi une composante de défense chimique constitutive de l'olivier vis-à-vis de ce pathogène. D'autre part, les parois cellulaires de la variété résistante sont plus résistantes à l'action des cellulases (β -1,4-endoglucanases) et des pectinases (polygalacturonases) parasites que celles de la variété sensible bien que le taux de production de ces hydrolases soit identique quelle que soit l'origine des parois. Ce comportement différentiel des parois végétales des deux variétés semble être lié à l'intervention de mécanismes de défense mécaniques représentés, au moins en partie, par le degré de lignification et l'abondance des phénols estérifiés aux parois cellulaires. Ainsi, les parois de la variété résistante sont plus riches en lignine et en phénols pariétaux que celles de la variété sensible. Ces phénols pariétaux sont identifiés, pour la première fois, chez l'olivier. Ils sont représentés par les acides caféique, *p*-coumarique et férulique. La réponse post-infectionnelle des teneurs en phénols solubles (dérivés hydroxy-cinnamiques, flavonoïdes, flavanes), en lignine et en phénols pariétaux de disques foliaires distingue clairement les variétés étudiées selon leur comportement à la verticilliose. Ainsi, les teneurs en composés phénoliques solubles (dérivés hydroxycinnamiques, flavonoïdes, flavanes monomères et polymères), en phénols pariétaux et en lignine augmentent après inoculation chez la variété résistante. Cependant, les teneurs post-infectionnelles de ces composés diminuent chez la variété sensible. Cette intensification de la lignification et de l'accumulation des phénols solubles et pariétaux chez la variété résistante permet de renforcer davantage l'intervention des composantes de défense chimiques et mécaniques de l'olivier à l'égard de *Verticillium dahliae*. L'arsenal de défense de l'olivier à la verticilliose semble être lié à des composantes multifactorielles. Des mécanismes de défense constitutifs (phénols solubles et insolubles, lignine) et induits (intensification de la lignification, accroissement des teneurs en phénols solubles et pariétaux, néosynthèses de phytoalexines) sont mis en évidence. Ces mécanismes peuvent être distingués en deux types selon leur mode d'intervention dans la stratégie de défense de l'hôte: (i) Mécanismes mécaniques (lignine, phénols estérifiés à la paroi) qui limitent l'action des enzymes hydrolytiques parasites sur la paroi végétale de l'hôte; (ii) Mécanismes chimiques (phénols solubles, phytoalexines) qui inhibent la croissance et le développement du parasite. Il apparaît donc que les composés phénoliques interviennent dans la défense de l'olivier vis-à-vis de *Verticillium dahliae* sous trois formes: solubles (phénols solubles, phytoalexines), insolubles (phénols estérifiés à la paroi végétale) et polymérisées (lignine).

Ce travail est soutenu par un projet IFS (D/2616-2F) et un projet PROTARS (P51/03).

Étude technologique de sept nouvelles variétés d'olivier Tunisiennes issues de croisements inter-variétaux

S. DABBOU¹, I. RJIBA¹, A. ECHBILI¹, A. YANGUI², N. GAZZAH¹,
I. CHERAIF¹, M. HAMMAMI¹ & A. TRIGUI²

¹ Laboratoire de biochimie, USCR Spectrométrie de Masse, Unité de Recherche 'Nutrition Humaine et Altération métaboliques, Faculté de Médecine de Monastir, Tunisie

² Institut de l'Olivier, B.P. 208, 1082 Tunis, Tunisie

Auteur correspondant, courriel: trigui.ahmed@iresa.agrinet.tn

La consommation de l'huile d'olive extra-vierge aide indubitablement à prévenir certaines maladies chroniques grâce à sa composition équilibrée et constituée principalement par l'acide oléique (AG monoinsaturé), une quantité appropriée d'acides linoléique et linoléinique (AG polyinsaturés essentiels) et des composés mineurs comme les antioxydants. Ce travail essaie de contribuer à l'évaluation en vue de la sélection de descendants de croisement inter-variétaux (effectués par A. Trigui) entre les variétés porte graine «Meski» et pollinisatrice «Chemlali Sfax» par l'étude de quelques paramètres biochimiques et pomologiques de sept d'entre eux. L'étude pomologique montre que le poids frais moyen est supérieur à 1.68 g. Il est supérieur à 2 g pour SM19, SM21 et SM23. Le rapport pulpe/noyau suit la même allure que celle du poids frais moyen et le pourcentage de la pulpe est supérieur à 78.32%. La teneur en eau est élevée chez SM7, SM21 et SM19 où elle dépasse 44% (56.10% chez la « Chemlali Sfax »; Stiti, 2001). L'analyse de la composition acide de ces descendants permet de les classer en deux groupes. Le premier se compose des descendants: SM18, SM19, SM20 et SM22 dont la teneur des huiles en acide oléique est supérieure à 63%. Le deuxième groupe contient SM21, SM7 et SM23 avec une teneur variant entre 58 et 59%, ce qui est mieux que celle de la «Chemlali Sfax» (57.81%; Echbili, 2003). De plus, la teneur en huile exprimée par rapport à la matière sèche est supérieure à 35% avec une prédominance de SM19 (58.56%) et SM23 (52.65%). Les nouvelles variétés, comparées au pollinisateur, paraissent d'un grand intérêt et méritent d'être davantage étudiées aux plans agronomique et biochimique.

Sélection variétale et amélioration génétique ciblée par croisement de l'olivier en Tunisie: potentiel et acquis

A. TRIGUI¹, M. HAMMAMI², M. ZARROUK³, N. GAZZAH², A. YANGUI¹,
H. BELGUITH¹, H. MANNAI³, D. KRICHÈNE³, I. RJIBA², S. DABBOU²
& A. TOUIL⁴

¹ Institut de l'Olivier

² Faculté de Médecine de Monastir

³ INRST

⁴ INAT.

Auteur correspondant, courriel: trigui.ahmed@iresa.agrinet.tn

L'olivier constitue en Tunisie aride la seule alternative culturelle viable. L'olivieraie, dont les deux tiers se trouvent en milieux aride et semi-aride, est d'une richesse génétique inouïe (variabilité inter-variétale), mais mal connue. La dominance des «Chemlali» au Centre et au Sud a masqué plusieurs cultivars autochtones et types locaux jusque-là ignorés dont Fakhari, Zarrazi, Dhokkar Nafti, Gemri Dhokar, Toffahi (Trigui *et al.*, 2002). En outre, les travaux de prospection et de caractérisation ont permis de mettre en évidence l'hétérogénéité génétique de «Chemlali» considérée jusque-là comme variété unique). Prenant «Chemlali Sfax», le plus répandu, comme référence, les autres Chemlali Zarzis, Jerba, Tataouine, Ouled Msallem, Chemlali Ontha) ont des caractéristiques morpho-pomologiques très différentes confirmées par une caractérisation moléculaire (en cours). L'étude des potentialités de ce patrimoine regroupé au Conservatoire National de l'Olivier a permis de relever que les cultivars et types locaux présentent, outre leurs rusticité et adaptation aux conditions locales arides, certaines performances agronomiques (précocité de l'entrée en production, importance quantitative de la production, grosseur des fruits, rapport pulpe/noyau). En outre, la caractérisation de leurs huiles (Rjiba, 2003; Echbili, 2003) a permis de relever les qualités assez intéressantes, parfois meilleures que celles des cultivars dominants propagés et commercialisés (taux d'acide oléique dépassant de loin celui de la Chemlali Sfax et composés mineurs plus abondants et stables) et d'entamer la sélection de ces variétés peu connues, mais performantes en vue de leur valorisation. L'huile tunisienne étant de composition acide passable, l'amélioration génétique de l'olivier Chemlali Sfax et d'autres types locaux par croisement dirigé a été menée depuis 1989 pour éviter des restrictions qualitatives éventuelles du marché. Le suivi et l'étude des potentialités des 1445 nouvelles obtentions (variétés) ont permis de relever une hétérogénéité assez prononcée des descendants (de croisements différents et issus des mêmes croisements). L'amélioration de la qualité de l'huile étant l'objectif de nos recherches, la caractérisation des huiles des descendants (Mannai, 2003; Rjiba *et al.*, 2004, Dabbou *et al.*, 2004) a permis de présélectionner plus de quarante nouvelles variétés dont le taux d'acide oléique dépasse les 65% (55% pour la Chemlali Sfax). L'étude (en cours) de la productivité (olives et huile) et de la teneur en matières grasses permettrait de connaître les potentialités des descendants et chimiques de leurs huiles afin de sélectionner les nouveaux cultivars intéressants, les protéger et les valoriser et enrichir le patrimoine.

Étude de la diversité de l'olivier au Maroc. Caractérisation par traitement d'images et analyse moléculaire

B. BOULOUHA ¹, L. SIKAOUI ¹, A. BARI ², I. ELOUAFI ³, M. NACHIT ³,
A. EL HEIRECH ¹ & P. MATHUR ²

¹ INRA Marrakech, BP 533, Maroc

² IPGRI, Via dei Tre Denari 472/a, 00057 Maccaresse, Italie

³ ICARDA, PO Box 5466, Alep, Syrie

L'oliveraie marocaine est constituée à hauteur de 96% d'une seule variété population connue communément sous la dénomination «Picholine marocaine». Plusieurs études ont montré sa très grande diversité et confirment que cette dénomination renferme plusieurs cultivars. Cette diversité pourrait être intéressante sur le plan amélioration génétique. Le but de ce travail est d'étudier la variabilité génétique de l'olivier dans les régions de Marrakech-Essaoiura-Agadir-Taroudant-Ouarzazate et de modéliser sa distribution dans l'espace. L'utilisation de l'outil GIS au préalable a permis de localiser 25 sites géographiquement distincts. Les prospections sur les lieux ont permis d'en retenir 15. Un échantillon de 5 arbres est considéré au niveau de chaque site en vue de leur caractérisation. Les méthodes empruntées pour la caractérisation sont à la fois la caractérisation morphologique (Barranco *et al.*, 2000), le traitement de l'image du noyau (Bari *et al.*, 2003) et l'analyse moléculaire par AFLP. Le but est de comparer les méthodes entre elles, d'une part, et de modéliser la distribution de la diversité dans l'espace, d'autre part. L'utilisation de variables quantitatives comme les fractales (texture) et les moments (forme) obtenus d'après le traitement de l'image a permis l'établissement de l'indice de diversité. L'utilisation de l'outil GIS *a posteriori* a permis de modéliser la diversité génétique de l'olivier dans la région de l'étude. Ceci permet d'orienter les prospections futures en vue de localiser les génotypes à importance agronomique notamment en relation avec la résistance à la sécheresse.

Oxidative Stability of monovarietal virgin olive oil of cv Carrasquinha in Beira Interior (Portugal)

M.F. PERES¹, L.R. HENRIQUES¹, P. SIMÕES-LOPES² & M.C. PINHEIRO-ALVES²

¹ Escola Superior Agrária de Castelo Branco Quinta Senhora de Mércules, 6001-909 Castelo Branco. E-mail: fperes@esa.ipcb.pt

² Estação Nacional de Melhoramento de Plantas Apartado 6, 7350-951 Elvas. E-mail: pinheiro.alves@iol.pt

Olive (*Olea europaea* L.) occupies about 60.000 ha in Beira Interior, an inland region in the Centre of Portugal. Most of the olives are intended for oil extraction. 'Galega vulgar' is the most important cultivar in this region but there are other cultivars that give particular tastes to olive oils. The present paper studies oxidative stability of Beira Interior monovarietal olive oil, cv Carrasquinha. Results are discussed for three harvests: 2001, 2002 and 2003. Results from Rancimat test are brought into relation with fatty acid composition and antioxidant content. Virgin olive oil obtained from this cultivar shows high oxidative stability mainly because of the low content in polyunsaturated fatty acids.

Keywords: Monovarietal olive oil - Oxidative stability - Fatty acids, antioxidants.

Olive oil composition of some descendants obtained through controlled crossings on Meski cultivar

H. TRABELSI¹, B. BACCOURI¹, A. ALLALOUT¹, W. TAAMALLI¹,
N. BEN YOUSSEF¹, D. DAOUD¹ & M. ZARROUK¹

¹ Laboratoire de Caractérisation et Qualité de l'Huile d'Olive, INRST B.P.95 - 2050 Hammam-Lif, Tunisia.

Corresponding author, e-mail: mokhtar.zarrouk@inrst.rnr.tn

In Tunisia, olive oil represents, the first agricultural product of export. So it is essential to improve its quality for a better sale. In the present work, we proceed to the evaluation of some chemical characteristics of virgin olive oil from 8 descendants obtained through controlled crossings between Meski cultivar and other local and foreign varieties (Besbessi, Picholine, Manzanille and Koroneiki). The analytical parameters studied were: oil content of olives, fatty acid composition, triacylglycerol molecular species, amount of total phenolic compounds in oil. The results showed an important variability in oil composition due to the effect of cultivar. Some descendants are characterized by an improved acidic composition as compared to chemlali, the most abundant olive oil variety in Tunisia.

Keywords: Tunisia - Olive oil - Fatty acid - Triacylglycerol - Phenolic compound.

Acidic composition and oil contents of three populations of oleasters

Béchir BACCOURI¹, Amira ALLALOUT¹, Sonia BEN TEMINE¹, Wael TAAMALLI¹, Leila ABAZA¹, Douja DAOUD¹ & Mokhtar ZARROUK¹

¹ Laboratoire de caractérisation et qualité de l'huile d'olive, INRST B.P.95-2050 Hammam-Lif, Tunisie

Corresponding author, e-mail: mokhtar.Zarrouk@inrst.rnrt.tn

Virgin olive oil is one of the edible fats most highly prized by Tunisian people. Selection and breeding of performant olive cultivars is an important way to improve oil quality. The aim of the present work was to select new and improved olive cultivars based on oil chemical characteristics of three populations of oleasters. Fatty acid profiles were studied, including palmitic, oleic and linoleic acids. Among the three populations sampled, 10 descendants showed high oil yield and quality characteristics. Oils from this oleasters are characterized by high levels of oleic acid ranged from 69 to 78%, low levels of linoleic acid ranged from 6 to 15% and by average percentages of palmitic acid that did not exceed 15%. Olive oil content was calculated on dry weight basis. So, the hybrid Mat 11 contained the highest oil amount (59%) while the hybrid Mat 10 contained the lowest one (43%). The other descendants contained intermediate values.

Caractérisation biochimique et moléculaire de la résistance de l'olivier à la maladie de l'œil de paon causée par *Spilocaea oleagina*.

J. CHARAFI^{1,2}, B. RAHIOUI¹, A. EL MEZIANE¹, A. MOUKHLI³,
B. BOULOUHA³, C. EL MODAFAR¹ & B. KHADARI²

¹ Laboratoire de Biotechnologie et Phytopathologie Moléculaire, Faculté des Sciences et Techniques Guéliz, B.P. 549, 40 000 Marrakech, Maroc

² UMR 1098 Biologie du Développement des Plantes Pérennes Cultivées (BEPC), INRA, 2 place Viala, 34 060 Montpellier cedex 1, France

³ UR Amélioration Génétique des Plantes, INRA, Marrakech, Maroc
Auteur correspondant, courriel : elmodafar@fstg-marrakech.ac.ma

La maladie de l'œil de paon due au *Spilocaea oleagina* constitue l'une des maladies redoutables de l'olivier qui cause des pertes considérables. L'oléiculture marocaine est particulièrement menacée puisqu'elle est représentée quasi totalement par une seule variété «Picholine marocaine» qui est sensible à cette maladie. Les clones sélectionnés à partir de cette variété: Menara, Haouzia et M26 se sont également révélés sensibles à la maladie. Afin de transférer les gènes de résistance à l'œil de paon au niveau de ces clones, des croisements ont été réalisés entre Menara, Houzia et M26, d'une part, et une variété française résistante au *S. oleagina*, Picholine du Languedoc. Les observations réalisées sur la descendance montrent que le comportement vis-à-vis du *S. oleagina* varie selon une échelle allant de la résistance totale (absence de symptômes) jusqu'à une totale sensibilité (attaques sévères). Ce modèle correspond à un dispositif de grand intérêt pour l'étude des mécanismes de défense impliqués dans la résistance des plantes aux pathogènes, et en particulier pour les polyphénols qui constituent l'un des mécanismes de défense déterminant dans la résistance des plantes aux pathogènes. L'étude des polyphénols constitutifs et induits chez les parents et les descendants F1 montre que la résistance de l'olivier à la maladie de l'œil de paon est liée à des composantes phénoliques multifactorielles. Par ailleurs, dans l'objectif de construire une carte génétique de l'olivier, indispensable à la détection des QTL (Quantitatif Trait Loci) liés à la résistance au *Spilocaea oleagina*, la vérification de la fiabilité de la population hybride issue d'un croisement entre les trois clones de la «Picholine marocaine» (Menara, Haouzia et M26), d'une part, et la «Picholine de Languedoc», d'autre part, a été réalisée. Ainsi, 218 descendants plus les 4 parents ont été analysés à l'aide de 6 loci microsatellites. À l'exception de 2

individus, toute la population hybride est caractérisée par les allèles parentaux. Aucun des descendants n'est issu d'une autofécondation des clones de la Picholine marocaine. La probabilité d'avoir un génotype parmi ceux des descendants sous l'effet du hasard est très faible (elle varie de $5,98 \cdot 10^{-5}$ à $2,37 \cdot 10^{-6}$). Le test Khi2 montre qu'il n'y a pas de distorsion à la ségrégation à l'exception des allèles détectés aux loci DCA 15 et GAPU89 pour lesquels l'hypothèse nulle est rejetée à une probabilité non négligeable de 5 et 10% respectivement. Avec un indice de similarité de Jaccard qui varie de 0,1 à 1, la population hybride est caractérisée par une importante diversité génétique. Cette étude montre qu'il s'agit d'une réelle population en ségrégation qui pourra servir à la construction d'une carte génétique et au phénotypage des caractères liés à la résistance au *Spilocaea oleagina* en vue de détecter les QTL de cette résistance et d'amorcer un programme de sélection assisté par les marqueurs moléculaires.

Ce travail est soutenu par un projet PROTARS (D54-12) et un projet PRAD (03-06)

Caractérisation chimique des huiles de quelques descendants de croisements dirigés de l'olivier Chemlali Sfax

I. RJIBA¹, A. ECHBILI¹, S. DABBOU¹, N. GAZZEH¹, A. YENGUI²,
H. BELGUITH¹, M. HAMMAMI¹ & A. TRIGUI²

¹ Laboratoire de biochimie, USCR Spectrométrie de Masse, Unité de Recherche 'Nutrition Humaine et Altération métaboliques, Faculté de Médecine de Monastir, Tunisie

² Institut de l'Olivier, B.P. 208, 1082 Tunis, Tunisie

Auteur correspondant, courriel: trigui.ahmed@iresa.agrinet.tn

Le cultivar Chemlali Sfax domine le verger oléicole tunisien essentiellement dans le sud et le centre. Malgré sa bonne productivité et son adaptation aux conditions arides, ses huiles présentent des inconvénients majeurs de qualité. Un programme d'amélioration génétique par croisements dirigés avec des variétés et type locaux et internationaux a été entrepris par A. Trigui depuis 1989. Ceci a conduit à l'obtention de 1445 descendants en cours d'évaluation. Le travail (dont une partie des résultats est présentée ici) est entrepris dans le cadre de l'évaluation de la qualité de l'huile d'une centaine de ces descendants. L'analyse de la composition en acides gras montre que seules les huiles de trois descendants présentent à la fois des teneurs inférieures à la limite fixée pour le C_{16:0} (15%) et des teneurs élevées en C_{18:1} supérieures ou égales à 74%. 25 descendants possèdent des teneurs supérieures à 55% en C_{18:1} et des teneurs en C_{16:0} inférieures à 15%. Au contraire, seulement 15 descendants présentent des teneurs en acide palmitique situées au-delà de 15% et des teneurs en acide oléique inférieures à 55%. L'étude des potentialités des descendants se poursuit avec les mêmes analyses pendant trois campagnes oléicoles (pour étudier la stabilité des caractères). Les descendants présélectionnés pour ce premier caractère feront l'objet d'une quantification de la teneur de leurs fruits en matières grasses et l'évaluation de leur productivité.

Characterization, identification and utilization of autochthonous olive plant material in Crete

I. METZIDAKIS ¹, N. NIKOLOUDAKIS ² & P. HATZOPOULOS ²

¹ Institute of Olive Tree and Subtropical Plants of Chania (ISPOT), National Agricultural Research Foundation (NAGREF), Chania, Greece

² Molecular Biology Laboratory, Agricultural University of Athens, Greece
Corresponding author, e-mail: imetzis@nagref-cha.gr

Aim of this project, which was implemented in Chania in the framework of RESGEN, was the determination of primary descriptors of olive cultivars, setting up and registration in database system for the primary and secondary characterization as well as the determination of 45 autochthonous cultivars. For the primary characterization and discriminatory identification of varieties, characters of the tree (vigour, growth habit and canopy density), leaf (shape, length, width and longitudinal curvature of the blade), inflorescence (length and number of flowers/inflorescence), fruit (weight, shape, symmetry, apex, base, nipple, lenticels, evolution of colour) and endocarp (weight, apex, base, shape, symmetry surface, grooves) were utilized. The same pomological and agronomic descriptors were used alongside Italian, French, Spanish and Portuguese partners and the data obtained are comparable between countries. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers were used to study the genetic diversity and to discriminate most of the autochthonous olive (*Olea europaea* L.) cultivars. The results presented contribute to a comprehensive understanding of cultivated Greek olive germplasm. An accession number was given to every cultivar and a number of synonyms were corresponded.

Keywords: Olive - Autochthonous - Cultivars - Variety - RAPD - Morphology - Genetic diversity.

Salinity and olive: growth, salt tolerance, photosynthesis, yield and management practices

K. CHARTZOULAKIS

NAGREF, Institute for Olive Tree and Subtropical Plants, 73100 Chania, Crete, Hellas

Olive is a major tree crop in the Mediterranean region, where 97% of the world's olive oil is produced. Irrigation of olives with saline water will inevitably increase in the future in the Mediterranean due to negative effects of population growth and climate change on the availability and quality of existing fresh water supplies. As a consequence, the risk land salinisation will exacerbate threatening the agricultural production. Olive tree is considered as moderately salt tolerant and recent studies suggest that olives can be irrigated with water containing 3200 mg/l of salt (EC_w of 5 dS/m) producing new growth at leaf Na levels of 0.4-0.5% d.w. Salt tolerance in olives appears to be cultivar-dependent and is likely due to control of net salt import to the shoot. The mechanism is located within the roots and prevents salt translocation, rather than salt absorption. It is probably that K-Na exchange at the plasmalemma is involved in regulating the transport of Na⁺ to the shoot, while calcium plays a key role in limiting the toxic effects of Na⁺ on integrity of the plasma membrane in root cells. In addition, osmotic adjustment, stomatal closure and leaf abscission appear to play a role. Understanding the mechanisms involved in salt-tolerance of olive tree is crucial to select salt tolerant genotypes or to engineer salt-sensitive genotypes with genetic traits inducing salt tolerance. Low and moderate salinity is associated with reduction of CO₂ assimilation rate, stomatal and mesophyll conductance. Salinity reduces the fruit weight and oil content while increases the moisture content of fruits. Total phenol content in the olive oil is not affected by moderate NaCl salinity, while the ratio of unsaturated/ saturated fatty acids decreases. Management practices for using saline water for irrigation of olives includes proper irrigation scheduling (amount of water and interval), efficient leaching (amount and timing), proper irrigation method, blending or cyclic use of irrigation water of different quality, establishing artificial drainage, using water or soil amendments and selection of salt tolerant genotypes.

Behaviour of some olive varieties introduced in Tunisia

Faouzia MAHJOUB HADDADA¹, Hédia MANAI¹, Douja DAOUD¹
& Mokhtar ZARROUK¹

¹ Laboratoire de Caractérisation et Qualité de l'Huile d'Olive, INRST, B.P. 95, 2050 Hammam-Lif, Tunisie.

Auteur correspondant, courriel: mokhtar.zarrouk@inrst.rnrst.tn

Virgin olive oil is one of the edible fats most highly prized by Mediterranean peoples and therefore constitutes a fundamental component of their diet. Tunisian olive oil production is dominated by that of Chemlali variety. Its oil is characterized by raised rates of palmitic and linoleic acid and low rates of oleic acid. To improve olive oil quality produced in Tunisia, some approaches have been considered among them the study of foreign varieties' behaviour as cultivated in local conditions, in order to choose cultivars having a better quality of oil. In the present work, we have characterised fatty acid composition, free acidity, peroxide value, contents of chlorophylls and total phenolic compounds of olive oil from nine mediterranean olive varieties: Koroneiki, Sigoise, Dhahbia, Galega Grada, Manzanilla sejerma, Cerignola, Carydolea, Grossa di spagna and Frangivento, Which are grown in the varietal collection of INRAT in the north of Tunisia, at the same pedoclimatic conditions. Results showed that analytical parameters are sharply influenced by the cultivar. The oil from Koroneiki and Frangivento are characterised by high levels of oleic acid accounting respectively for 74.85 and 70.12%, by relatively low levels of linoleic acid ranged from 7.78 to 17.12% and by a low percentage of palmitic acid that did not exceed 11%. The bulk of oil analysed showed less than 1% free acidity, the upper threshold limit for the "extra-virgin" category (EU regulations). The peroxide value which evaluates hydroperoxides content and offers a measure of lipid oxidation ranged between 3.5 to 18 meq O₂/kg. In the samples studied the content of total phenolic compounds ranged from 18.56 up to 349.15 mg/kg. Chlorophylls in the all samples tested have been found to range from 0.18 to 2.6 mg/kg.

Durabilité de l'olivier en milieu aride tunisien

Ahmed TRIGUI, A. YANGUI, H. BELGUITH & B. BEN ROUINA

Institut de l'Olivier, BP 1087, 3000 Sfax, Tunisie. E-mail: trigui.ahmed@iresa.agrinet.tn

L'olivieraie tunisienne occupe le tiers des terres labourables et s'étend du Nord au Sud du pays dans des conditions édapho-climatiques très variées. En zone aride (deux tiers du pays), l'olivier constitue l'unique alternative culturale viable et y est conduit presque exclusivement en monoculture en sec. Son développement et sa production (aux échelles de l'arbre, de la parcelle, de la région et de l'ensemble du pays) ont toujours été fluctuants et tributaires des conditions du milieu de culture dont les variations spatio-temporelles sont de règle (Trigui, 1987). En effet, nos travaux ont mis en évidence une large irrégularité spatio-temporelle des pluies et leur insuffisance (quantitative et qualitative pour une culture pluri-pérenne), toutes deux chroniques, aux niveaux local et régional. Le savoir-faire tunisien, traditionnellement conçu et sagement appliqué et perpétué, a permis de planter le tiers de l'effectif que compte l'olivieraie au Sud aride. Ce potentiel assure près de 40% de la production de l'huile, malgré l'aridité climatique souvent doublée d'une aridité édaphique (Trigui, 1983, 1998, 2002) que les longues séries d'années sèches affectent sérieusement. Cependant, l'importance des extensions des plantations d'olivier au sud dénote l'engouement vers cette culture pluri-pérenne malgré l'alternance de la production qui est accentuée par les conditions du milieu, l'âge des plants et le niveau des soins culturaux prodigués (contribuant indirectement à l'érosion), tous autres facteurs égaux par ailleurs. Nos travaux dès 1970 sur les relations sol-eau-plante, les ressources génétiques et le comportement de cette espèce en milieu aride montrent que par le passé, le traditionalisme séculaire a permis, vu l'insuffisance des ressources hydriques, la mise au point de techniques culturales ayant permis de gérer l'aridité (2/3 de l'olivieraie), de réussir l'extension et la conduite des plantations en sec et d'assurer la production d'une huile provenant d'un potentiel variétal dont la rusticité et l'adaptation sont prouvées. Cependant, les contraintes conjoncturelles évolutives et répétitives affectent la rentabilité de la spéculation conduite en sec (plus de 99% des cas) qui gêne l'instauration de nouveaux concepts de la gestion des ressources. L'avenir du secteur est tributaire de la durabilité de la spéculation, elle-même tributaire de la régularisation de la production, de l'amélioration de la qualité du produit (valorisation du patrimoine variétal autochtone) et de la rentabilité économique de la culture notamment en milieux aride et semi aride. Étant donné la sensibilité de l'écosystème en milieu aride sud méditerranéen à toute intervention culturale, l'oléiculture est assurément l'une des alternatives viables de développement agricole. L'amélioration qualitative et quantitative de la production oléicole dans ces conditions passe nécessairement par une connaissance approfondie du végétal, une gestion adéquate des ressources (végétales et édapho-climatiques) et un réexamen des normes techniques et culturales permettant de gérer au mieux le milieu aride en évitant de déstabiliser l'écosystème fragile.

Mots-clés: Olivier - Milieu aride - Ressources édaphoclimatiques - Durabilité - Régularisation de la production - Normes techniques et culturales.

Problématique de développement de la culture de l'olivier dans la vallée de Ziz (cas du Douar Ait Youssef ou Daoud)

Hro ABOUHRIF

Association Youssef Ou Daoud

La présente étude est réalisée au niveau du village (village = Douar) Ait Youssef ou Daoud relevant de la Commune d'Elkheng, Province d'Errachidia où la principale essence arboricole cultivée est l'olivier. Malgré les efforts de vulgarisation de la part des techniciens de l'Office de mise en valeur agricole de Tafilalet, cette culture est malheureusement très mal entretenue dans toutes les Oasis de la Province. Ceci engendre des pertes annuelles pour les agriculteurs pouvant être chiffrées à plusieurs millions de dirhams. La taille des arbres à titre d'exemple est mal pratiquée et les agriculteurs se contentent, au moment de la cueillette des olives, d'une simple taille d'entretien visant l'élimination des branches desséchées. Les arbres dont certains d'entre eux sont centenaires ont atteint une grande envergure qui, en plus d'une très forte densité, fait que les rayons du soleil n'atteignent pas le sol, ce qui rend impossible la mise en place de cultures sous-jacente. Cette étude sommaire menée en collaboration avec la jmaa du Douar (jmaa = institution villageoise constituée à base ethnolignagère) présente un diagnostic de la culture de l'olivier avec un recensement exhaustif par exploitation agricole et par catégorie d'âge des oliviers existants au niveau du Douar. L'étude traite aussi les contraintes de développement de la culture de l'olivier ainsi que des recommandations (y compris la vision de la communauté villageoise) visant à contribuer à relever les contraintes surtout sociales entravant la mise en œuvre des programmes techniques modernes de développement de la culture.

Mots-clés: Culture Olivier - Province Errachidia - Taille - Gestion de l'oliveraie.

Bioecology of the flowering phenomenon: possible use for early forecast olive yield model

F. ORLANDI¹, H. GARCIA-MOZO², B. ROMANO¹, C. GALAN²,
E. DOMÍNGUEZ², & M. FORNACIARI¹

¹ Department of Plant Biology and Agroenvironmental Biotechnology, University of Perugia, Borgo XX Giugno 74, 06121 Perugia Italy,

² Department of Plant Biology, Campus Universitario de Rabanales, Universidad de Córdoba, 14071 Córdoba, Spain.

During 2002 and 2003, thanks to research finance supported by the International Olive Oil Council, a bio-ecological study on olive flowering in Mediterranean areas (Perugia-Spoleto and Cordoba-Baena) was carried out. The aim of the study was to monitor, by the help of instrumental samplers, the trend of olive pollen flow in the atmosphere (beginning, duration, and full flowering) moreover to verify the relationships among climatic variables and the possible differences/similitudes between the monitoring areas. The pollen monitoring was carried out in four areas with volumetric instruments (VPPS, Lanzoni Bologna), which record the daily variations of pollen concentrations, presented as flowering diagrams. Moreover Pollen Index, the summation of daily concentrations was elaborated, and it can express the potential fruitification index. Some investigations show how the relationship between the pollen emitted in the atmosphere and olive production is regulated by climatic variables that are included in the biological-reproductive process. The flowering model has shown that pollen variables can synthesize ecological information of pre-flowering period. Therefore two spring climatic variables (minimum temperature of March and May) provide high statistical significance in the flowering period forecast in the two studied areas. Moreover in the crop yield forecasting model, the results show a high explicative capacity of the Pollen Index to predict the potential fruit production, with a mean error of 5% max.

Keywords: Olive - Pollen - Monitoring - Fruitification - Ecology - Pre-flowering period.

Effets de l'épandage simultané des margines et du phosphate naturel sur le statut nutritionnel du sol (P et K) dans une culture d'olivier (*Olea europaea* L. variété Chemlali)

Beligh MECHRI¹, Mohamed BRAHAM², Salem BEN ELHADJ³
& Mohamed HAMMAMI⁴

¹ Institut supérieur de biotechnologie de Monastir. Tunisie

² Laboratoire d'écophysiologie; Institut de l'olivier, Station de Sousse PB 14 Ibn Khaldoun. Tunisie

³ Institut Nationale Agronomique de Tunisie

⁴ Laboratoire de biochimie UR08/39 et USR Spectrométrie de masse; Faculté de Médecine de Monastir

Lors de la fertilisation phosphatée des sols calcaires, certains phosphates gardent une solubilité satisfaisante pour être assimilables par les plantes alors que d'autres sont rapidement adsorbés ou précipités sous forme calcique (Lindsay *et al.*, 1962). En effet, plus le pH du sol est élevé plus la solubilité des phosphates octocalciques, de l'hydroxylapatite et de la fluorapatite est faible. Et plus le pH du sol est faible plus cette solubilité est importante (Kolsi, 1999). Ces données nous ont incité à la formulation du présent protocole. Les margines sont acides, riches en potassium et pauvres en phosphore. Le phosphate naturel des mines de Gafsa (Tunisie) mélangé aux margines peut provoquer une série de réactions chimiques qui permettent, d'une part, l'apparition de phosphore assimilable et la neutralisation de l'acidité excessive des margines et, d'autre part, la création de liaisons chimiques nouvelles et complexes entre les radicaux organiques des margines et les divers niveaux d'oxydation du phosphore. Ainsi le phosphore entrera en liaison avec les radicaux organiques des margines et restera ainsi en position assimilable le plus longtemps (Carel, 1970; Attia *et al.*, 2001). Dans cette orientation, un essai a été mis en place, consistant en l'épandage simultané des margines et du phosphate naturel de Gafsa en respectant les doses d'utilisation compatibles avec les règles de la fertilisation raisonnée des sols alcalins modérément calcaires dans la région du Sahel. Les doses appliquées en trois répétitions sont: M_0 (0 m³/ha), M_1 (30 m³/ha) et M_2 (60 m³/ha) et deux doses de phosphate naturel de Gafsa PN_0 (0 kg/ha) et PN (150 kg/ha). L'attaque du phosphate naturel par la marge pour obtenir du phosphate assimilable demeure hypothétique. En effet, une diminution remarquable du taux du phosphore assimilable a été enregistrée au niveau du sol traité après le deuxième épandage des margines et du phosphate naturel. Les teneurs moyennes en phosphore assimilable au niveau de l'horizon superficiel (niveau 0-30 cm) sont de 19.67 pour le témoin M_0 , 4.51 pour la dose M_1PN et 8.99 pour la dose M_2PN . Cette diminution est due à la rétrogradation du phosphore et sa cristallisation sous forme calcique.

Place des composés phénoliques dans la phytotoxicité des margines: cas du maïs

Majdoulaine BELAQZIZ, Abdelbasset EL HADRAMI, Siham HANIFI,
Abdelaziz ABBAD & Ismaïl EL HADRAMI

Équipe Biotechnologies et Physiologie Végétales, Département de Biologie, Faculté des Sciences Semlalia, B.P. 2390, 40 000 Marrakech-Maroc

Auteur correspondant, courriel: hadrami@ucam.ac.ma

Dans les pays du bassin méditerranéen, l'aridité entrave amplement l'agriculture et impose la gestion des ressources en eaux. Les margines (sous-produit liquide des huileries) constituent dans ce cas une bonne alternative d'irrigation et de fertirrigation des sols, compte tenu de leur richesse en élément minéraux (~2% de la masse totale des margines) et de leur aptitude à améliorer les propriétés physiques du sol. Ces effluents présentent, cependant, l'inconvénient d'être acides (pH 4.5 à 5) et fortement chargés en substances toxiques notamment les polyphénols (~1 à 1.5%), en acides gras et en pesticides. Ceci constitue un risque de toxicité aussi bien pour les cultures que pour les micro-organismes telluriques. La phytotoxicité de ces déchets liquides et celle des composés phénoliques contenus dans ces effluents ont été ici étudiées chez le maïs. Les tests réalisés ont révélé que l'effet inhibiteur des margines (ajoutées jusqu'à 12.5%) sur la germination des graines de maïs reste très faible. Au-delà de 25%, l'inhibition devient de plus en plus perceptible et la germination du maïs se trouve totalement inhibée à partir de 75%. Un parallélisme parfait de cet effet inhibiteur a été retrouvé en ne considérant que la charge phénolique contenue dans chaque concentration testée. Ceci montre toute l'importance qui doit être accordée à l'étude de ces composés par les projets de détoxification de ces déchets. Par ailleurs, les tests de fertirrigation conduits en sachets et en pots de culture ou encore en plein champ n'ont montré aucun effet dépressif des margines sur la croissance et la productivité de la plante de maïs. En effet, lorsque l'irrigation par les margines est réalisée une fois par semaine jusqu'à hauteur de 25% de la capacité de rétention du sol (cas des pots de culture) ou 5.75 l par m² de culture (cas des expériences de plein champ), aucune différence significative n'a été relevée par rapport aux essais témoins. La production en épis et en graines ne présente également aucune différence significative. À l'opposé, le traitement par les margines à fortes doses se traduit par quelques modifications d'ordre physiologique qui touchent notamment la fuite des électrolytes, la teneur en chlorophylles, la teneur en protéines, certaines activités enzymatiques comme l'activité peroxydasique ainsi que la teneur qualitative et quantitative en phénols. Certains désordres physiologiques pouvant être apportés par la fertirrigation par les margines seront traités ici. Il en est de même des effets bénéfiques en prenant le maïs comme exemple.

Mots-clés: Margines - Fertirrigation - Phénols - Phytotoxicité - Maïs - Eaux usées

Caractérisation du comportement hydrique de quelques cultivars d'olivier (*Olea europaea* L.) cultivés en Tunisie en conditions de sécheresse

M. GUERFEL¹, D. BOUJNAH² & M. ZARROUK¹

¹ Laboratoire de Caractérisation et Qualité de l'Huile d'Olive, INRST, B.P 95- 2050 Hammam-Lif, Tunisie

² Institut de l'Olivier, B.P 40-4061 Sousse, Tunisie
Auteur correspondant, courriel: guerfel-mk@yahoo.fr

En régions arides, la sélection des variétés d'olivier tolérantes au déficit hydrique est d'une grande importance. Elle reste toujours la préoccupation majeure de toute politique destinée à lutter contre le manque d'eau dont le rôle est crucial dans la vie de toute plante. En outre, la Tunisie est caractérisée par une grande variabilité des conditions climatiques et surtout la pluviométrie qui, avec son irrégularité, entraîne souvent des cycles de sécheresse plus ou moins longs. Ceci affecte la productivité de l'olivier, arbre qui joue un rôle social et économique incontestable. C'est pourquoi, on se propose d'étudier l'impact d'un déficit hydrique sur la phénologie de cinq variétés d'olivier cultivées en collection dans une parcelle à Chott Mariem (centre de la Tunisie) durant un cycle biologique, qui a coïncidé avec une année déficitaire en eau pluviale. Les variétés étudiées sont: Zarrazi (sud), Meski (nord), Neb jemel (sahel), Fouji (Gafsa), Gerboui (Téboursouk). Concernant les caractères étudiés, nos résultats montrent des différences entre les variétés. Ainsi, l'accroissement végétatif de la variété Meski a atteint 7.5 cm à la fin de cycle de mesures. Pour la variété Zarrazi, la croissance de la pousse terminale n'a pas dépassé 3.5 cm. De même, le nombre moyen d'inflorescences par rameau fructifère varie significativement selon les cultivars. D'autre part, le suivi régulier de l'évolution de la floraison a permis de dresser les stades repères établis par Loussert & Brousse (1978). L'étude d'autres paramètres morphologiques (densité stomatique, densité des trichomes) et physiologiques (contenu relatif en eau, pertes hydriques, conductance stomatique) a permis de mieux caractériser l'adaptation à la sécheresse chez les cinq variétés étudiées.

GF-120* Naturalyte insect control product. Field performance for the control of olive fruit fly (*Bactrocera oleae* Gmel) on olive trees by bait application in the Mediterranean countries

P. VERGOULAS², C. MAVROTAS¹, C. JOUSSEAUME² & E. ALIMI³

¹ Dow AgroSciences Export SAS, Athens, Greece

² Dow AgroSciences Export S.A.S., Sophia Antipolis, France

³ Conseiller agricole, Tunis, Tunisie

Bactrocera (Dacus) oleae (Gmelin), the olive fruit fly is the most destructive pest in the Mediterranean region in olive trees. Crop losses, quantitative and qualitative, due to this pest can reach up to 80%, if no measures are taken. In the last forty years a variety of methods have been used to control this pest and protect the yield that can suffer large losses. The control methods are full cover and bait sprays. In the past high quantities of organophosphate insecticides needed to be used for full cover sprays with an impact on the environment, beneficial insects, applicators and residues. On bait sprays the toxicant, an organophosphate, is added to the locally used bait. The quantity of the toxicant, though lower than in the full cover sprays, can be as high as 500 g ai /ha. GF-120* Naturalyte* fruit fly bait (SUCCESSTM) is a prepackaged bait with Spinosad, a reduced risk toxicant, that provides improved consistency, attractiveness and efficacy as compared to earlier bait toxicant mixes. It is safe to environment, beneficial insects, applicators and it does not leave residues on the treated crops due to its very low rate of active per ha. GF-120 * Naturalyte* bait contains 0.24 g per liter of Spinosad and it is used at 1 to 1.5 liter per ha, which delivers 0.24 to 0.36 g of the active toxicant per ha. The other ingredients in GF-120 are attractants and phagostimulants. From the trials which have been carried out in Greece, Cyprus, Tunisia and Turkey across the years (1999-2003) to evaluate GF-120 bait activity on DACUOL the conclusion is that GF-120 is an effective mean for the control of Olive fruit fly. GF-120, by ground, at rates from 1 to 1.2 L/ha is effective for the control of *Bactrocera oleae*. The higher rate should be used under high insect pressure. GF-120, by ground, should be used at spray volumes ranging from 10 to 20 l/ha. Results across years showed that low spray volumes were more efficacious than high ones, though the later were not ineffective. Field results showed that GF-120 can be sprayed on every third tree. GF-120, by air, at 1 to 1.2 L/ha is effective for the control of *Bactrocera oleae* and as good as a spraying program based on pyrethroids (Turkey 2002, 2003). The spray volume by air ranged from 4.5 to 2.5 L/ha. In 2002, two field-laboratory Spinosad bait studies were organized in North Greece by Thessaloniki University on olive trees to evaluate the effect on beneficial arthropods and to compare it with the

standard organophosphate bait treatments of Fenthion (Lebaycid) and Dimethoate. GF-120 was tested also by the Tunisian State Institute on caper plants to evaluate the effect on the parasitoid *Opius concolor*. In North Greece in olive trial, GF-120 at 1.25 L per hectare was statistically equal to the untreated on *Chilocorus sp.*, *Chrysopa sp.*, *Coccinella dipunctata*, Coccinelidae predators and Hymenoptera parasitoids. All GF-120 treatments were safer than Fenthion and statistically different to Fenthion on *Chilocorus sp.*, *Coccinella dipunctata*, *Chrysopa sp.*, Coccinelidae predators and Hymenoptera parasitoids, while statistically equal to Fenthion on Syrphidae predators. In Tunisia in caper plants, GF-120 was safe on *Opius concolor* and equal to the untreated. The standard, Dimethoate bait treatment, was toxic to *Opius concolor*. In 2003, GF-120 was evaluated on olives beneficials and compared with Fenthion and Alpha-cypermethrin baits. GF-120 was found to be significantly safer than Fenthion and Alpha-cypermethrin baits. The conclusion is that GF-120 ready made bait formulation has an excellent profile on non target beneficial arthropods and can be used by air as the risk assessment and Ecotoxicological profile is favourable as per EU requirements.

Keywords: Spinosad - Beneficials - Non target arthropods - Bait - GF-120 -Fenthion - Dimethoate - *Bactrocera oleae* - Parasitoids - Coccinelidae -Hymenoptera - Syrphidae - *Chilocorus* - *Chrysopa* - *Coccinella* - *Opius concolor*.

Interaction Olivier-Psyle. Analyse de quelques paramètres biochimiques en rapport avec l'infestation des cultivars par l'insecte ravageur *Euphyllura olivina* Costa

Ilham RAHHOU¹, Abdelkader HILAL², Yamna OUGASS², Abdelaziz ABBAD³
& Ismail EL HADRAMI¹

¹ Laboratoire de Physiologie Végétale, Equipe Biotechnologies et Physiologie Végétale, Faculté des Sciences Semlalia, B.P. 2390, 40001 Marrakech

² Laboratoire d'Entomologie (INRA, Marrakech)

³ Laboratoire d'Écologie végétale, Faculté des Sciences Semlalia, Marrakech.

Auteur correspondant: hadrami@ucam.ac.ma

L'attractivité variable des différents cultivars d'olivier vis-à-vis de certains ravageurs comme *Euphyllura olivina* Costa paraît être en relation directe avec les teneurs et la nature de certains composés biochimiques. On s'est intéressés à comparer les teneurs en composés phénoliques, en protéines et en sucres chez cinq cultivars (Santa catharina, Frontão, Arbéquine, Ascolana dura et Gordale) placés dans une parcelle commune. Ces composés biochimiques ont été évalués au niveau des jeunes pousses sur une période allant de janvier à juin et suivant le développement phénologique des boutons floraux. De même, une comparaison a été faite entre le matériel attaqué et le matériel sain. Les résultats ont montré, chez les jeunes pousses, un effet hautement significatif de la variété et le mois pour les différents composés phénoliques, protéiques et glucidiques ($P < 0.001$) durant la période d'étude. Les trois composés sont très dépendants l'un de l'autre et dépendent aussi de la période d'attaque située entre février et avril. Pour les boutons floraux, le test statistique pour le facteur variété est très significatif ($P < 0.001$). Pour le facteur stade de développement des boutons floraux, aucune différence significative ne paraît exister. En ce qui concerne les analyses des différents composés du matériel attaqué, les différences sont significatives et peuvent être dépendantes de la variété, du degré de pullulation de l'insecte et de l'abondance de la laine. Pour les différents degrés d'attaque, la différence n'est pas significative et peut être expliquée par différents facteurs climatiques et biologiques.

Mots-clés: *Euphyllura olivina* Costa - Cultivars d'olivier - Phénols - Protéines - Sucres.

Effect of temperature on the development and on other biological parameters of the parasitoid *Pnigalio pectinicornis* (Linnaeus) (Hymenoptera: Eulophidae)

A.P. KALAITZAKI¹, D.P. LYKOURESSIS², S.E. MICHELAKIS³
& V.Z. ALEXADRAKIS³

¹ Prefecture of Chania, Division of Agricultural Development, Chania, Greece. E-mail: argkalaitzaki@yahoo.com

² Laboratory of Agricultural Zoology and Entomology, Agricultural Univ. of Athens, Iera Odos 75, 118 55 Athens, Greece. E-mail: lykouressis@auadec.aua.gr

³ Inst. of Olive Tree and Subtropical Plants of Chania, Agrokipio, 73 100 Chania, Greece. E-mail: valexandr@nagref-cha.gr

Pnigalio pectinicornis is an indigenous polyphagous parasitoid mainly of Lepidoptera, Diptera, Coleoptera and Hymenoptera. Shipments of the species, reared from *Bactrocera oleae* and *Phyllocnistis citrella* during 1997 and 1998 were identified from Dr LaSalle (CABI Bioscience UK Centre). In Greece has been found to parasitized *Bactrocera oleae*, *Prays oleae*, *Phyllocnistis citrella* and several other microlepidoptera (Neuenschwander *et al.*, 1983, Kalaitzaki *et al.*, 2002). The effect of temperature on the development and mortality was studied under controlled conditions when the parasitoid developed on *P. citrella* as host pest and fed on leaves of Washington navel. Mean total development time of immature stages was estimated at 15, 20, 25, 30 and 32.5°C. Within the limits 15-30°C development time shortened as the temperature increased. The shortest total development time of the immature stages was recorded at 30°C. Development time of females was longer than males. The highest mortality rate was found at 15°C and the lowest at 25°C. Between the different stages the larva was the most sensitive stage at all the temperatures and the pupa stage the less sensitive. Lower development threshold and thermal constant estimated to 2.10°C and 233 DD respectively for the total development period. Intrinsic rate of natural increase was highest at 20°C and lowest at 30°C. The intrinsic rate of natural increase almost tripled from 25 to 20°C and doubled from 30 to 25°C. It is concluded that having no diapause, development of *P. pectinicornis* could continue all the year under Greece climatic conditions. Is observed throughout the season but becomes abundant from August to October in the olive groves and from late May to early July in the citrus orchards. Is an effective biological control agent for *B. oleae* late in the season under our climatic conditions.

Keywords: *Pnigalio pectinicornis* - Temperature - Development - Biological control.

Impact de l'utilisation des eaux usées traitées sur les caractéristiques chimiques du sol et la nutrition minérale de l'olivier Chemlali

Saïda BEDBABIS¹, Béchir BEN ROUINA² & Mekki BOUKHRIS¹

Auteur correspondant, courriel: Saida_bedbabis@yahoo.fr

L'utilisation des eaux usées traitées pour l'irrigation de l'olivier dans le domaine d'El Hajeb (situé à 15 km au sud de Sfax) est pratiquée depuis 1989. La présente étude consiste à déterminer l'impact des eaux usées traitées issues de la station d'épuration de Sfax sur le sol et sur le comportement végétatif et fructifère de l'olivier. Les expérimentations sont menées au plein champ sur des oliviers plantés à une densité de 17 arbres par hectare. Elles ont pour objectifs de déterminer l'effet des eaux usées traitées sur les caractéristiques physico-chimiques du sol et leurs conséquences sur la croissance et la composition minérale des différents organes de l'olivier. Ainsi, quatre parcelles sont choisies: deux irriguées à l'eau usée traitée qui diffèrent par l'âge de leurs arbres (jeunes et vieux), une à l'eau provenant d'un puits de surface et la dernière est conduite en culture pluviale. Dans chacune des parcelles, le suivi des éléments minéraux: N, P, K, Na, Pb, Cd, Mn et Zn dans le sol, les feuilles et les brindilles est réalisé. De même, une analyse des eaux d'irrigation est effectuée. Les observations et le prélèvement des échantillons sont faites à la cadence mensuelle sur le matériel végétal et trimestrielle sur le sol dans les 80 premiers centimètres de profondeur. Au démarrage de l'étude en février 2003, la caractérisation de l'état initial des réserves minérales du sol montre des différences entre les 4 parcelles (irriguée aux eaux usées traitées, à l'eau de puits et celle qui est conduite en culture pluviale). Dans la première, la teneur de ces éléments varie entre 0,1 et 1,63% pour l'azote, de 0,01 et 0,03% pour le phosphore, de 0,01 à 0,11% pour le sodium, de 0,01 à 0,19 mg/l pour le zinc et de 0,19 mg/l pour le manganèse. Dans les parcelles irriguées à l'eau de puits ou en pluvial, ces valeurs sont plus faibles et varient comme suit: de 0,2 à 0,8% pour l'azote, de 0,001 à 0,01% pour le phosphore, de 0,006 à 0,1% pour le sodium, inférieur à 0,003 mg/l pour le zinc et de 0,008 mg/l pour le manganèse. Les concentrations de cadmium et de plomb sont faibles dans les 4 parcelles puisque inférieures à 0,4 ppm.

Effet de l'épandage des margines sur la biomasse microbienne et la nitrification du sol dans une culture d'olivier (*Olea europaea* L. variété Chemlali)

Beligh MECHRI¹, Mohamed BRAHAM², Salem BEN ELHADJ³
& Mohamed HAMMAMI⁴

¹ Institut supérieur de biotechnologie de Monastir, Tunisie

² Laboratoire d'écophysiologie, Institut de l'olivier, Station de Sousse BP 14 Ibn Khaldoun, Tunisie

³ Institut National Agronomique de Tunisie

⁴ Laboratoire de biochimie UR08/39 et USR Spectrométrie de masse, Faculté de Médecine de Monastir

Auteur correspondant, courriel: beligh.mechri77@laposte.net

Les problèmes écologiques liés au déversement de la margine dans les milieux récepteurs naturels ne sont pas encore résolus, malgré les nombreuses voies de recherches développées sur ce thème aussi bien en Tunisie que dans le bassin méditerranéen, principal producteur d'huile d'olive. La voie de la valorisation agricole de la margine comme fertilisant semble être la plus prometteuse parmi les différentes solutions proposées. Dans ce contexte, un essai a été mis en place et consistant en l'épandage de 60 m³/ha de margines sur des sols alcalins modérément calcaires dans la région du Sahel. Les effets de la margine sur l'activité biologique du sol ont été suivis en caractérisant la population microbienne. Un outil général qui peut être utile à cette fin est l'analyse des acides gras des phospholipides extraits à partir des membranes cellulaires des micro-organismes. Il suffit donc, pour avoir une estimation de la biomasse, de mesurer la concentration des acides gras au niveau du sol. Cette méthode ne cherche pas à connaître directement le nombre de micro-organismes présents dans un échantillon de sol, mais à évaluer une activité très générale que l'on suppose commune à tous. On fait implicitement le postulat que plus la concentration des acides gras est élevée, plus l'activité mesurée dans le sol est intense et plus les organismes responsables de cette activité sont nombreux. L'incorporation de la margine au sol semble augmenter la biomasse microbienne avec un effet favorable sur la libération des nitrates sans risque de pollution avec des teneurs en acides gras de 13,72 µg/g pour le témoin et de 63,94 µg/g pour le sol traité. Toutefois, les micro-organismes apparaissent avoir un temps de latence dès l'épandage des margines et qui correspond à leur adaptation au nouveau milieu acide et riche en polyphénols. Le suivi de l'évolution des acides gras dans les sols irrigués par les margines montre que le danger des margines ne provient pas des résidus phénoliques qu'elles contiennent, mais de leur polymérisation qui pourrait générer des polyphénols de haut poids moléculaire pouvant avoir des effets toxiques sur la composante vivante du sol (travail en cours).

Plan National Oléicole (PNO)

M. ISMAILI ALAOU¹, N. AKESBI¹, N. ELYASSAMI¹ & O. ZEMRANI¹

¹ Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, BP 6202, Rabat, Maroc

Auteur correspondant, courriel: m.ismaili@iav.ac.ma

Le secteur oléicole marocain avait bénéficié de plusieurs interventions visant le soutien de la production des olives. Cependant, malgré les efforts déployés par l'État dans la filière olive, les progrès réalisés demeurent insuffisants. Afin de lever les contraintes liées au développement du secteur oléicole national, l'État a mis en place un PNO au début de 1998. Ce plan avait comme objectifs l'extension de la superficie des olives à 1.000.000 ha, l'intensification du patrimoine oléicole existant, la valorisation de la production, la promotion de la qualité et l'amélioration de l'organisation professionnelle à l'horizon 2010. Afin de répondre à ces objectifs, des axes et des mesures d'accompagnement ont été établis pour assurer leurs réalisations. Pour la valorisation de la production des olives, le PNO a prévu la modernisation et la restructuration des unités de trituration traditionnelles à travers les mesures suivantes:

- L'octroi d'une subvention de 50% pour l'acquisition de petites unités modernes de trituration des olives.
- La mise à la disposition des coopératives et des associations d'agriculteurs, disposant d'une superficie minimale de 200 ha et d'un centre de collecte d'olives, de petites unités de trituration des olives pour la valorisation de leur production.
- L'octroi d'une prime à l'investissement pour l'installation et la modernisation des équipements de transformation des olives. Le montant de cette aide était fixé à 5 000 DH/t de capacité pour les unités à capacités moyennes (< 50 t/j) et 3 500 DH/t de capacité pour les grandes unités (>50 t/j).
- L'exonération des droits et taxes concernant l'acquisition des équipements et pièces de rechange destinés au renouvellement des unités de trituration et de conserve des olives.
- La délocalisation des unités de transformation en incitant les industriels à s'installer dans les zones de production par la création d'espaces aménagés dotés d'infrastructures nécessaires (eau, électricité, route, etc.).

Effect of irrigation and growing location on the quality characteristics of olive oil (cv Marsaline)

Oifa BACCOURI ¹, Wael TAAMALI ¹, Dhouha KRICHÈNE ¹,
Mokhtar ZARROUK ¹ & Douja DAOUD BEN MILED ¹

¹ Laboratoire de Caractérisation et Qualité de l'Huile d'Olive, INRST, B.P. 95, 2050 Hammam-Lif, Tunisie.

Auteur correspondant, courriel: mokhtar.zarrouk@inrst.rnrt.tn

Olive oil quality is of great concern for its biological and nutritional values. The aim of this work is to study the effect of irrigation and growing location applied to olive tree cv Marsaline on fruit morphologic parameters and on olive oil quality. Quality characteristic of Marsaline olive oil was evaluated in fruit samples of irrigated and non irrigated orchards in two different locations: Bou Arada and El Aroussa (Tunisian North). Results indicate that olive fruit from the irrigated plot had increased vegetative growth, mean fruit weight, flesh/stone ratio, moisture and oil content while growing region didn't affect this parameters. Olive oil extracted from irrigated orchard had higher acidity, peroxide index, absorbance coefficients in UV K_{232} ; K_{270} and lower total phenols, chlorophyll content compared with the oil extracted from the non irrigated plot. Olive oil quality was similar in the two study growing locations.

Interaction olivier - psylle (*Euphyllura olivina* Costa). Les composés phénoliques constitutifs peuvent-ils être des substituants potentiels des insecticides?

Nezha ZOUTEN & Ismaïl EL HADRAMI

Équipe Biotechnologies et Physiologie Végétales, Département de Biologie, Faculté des Sciences Semlalia, B.P. 2390, 40 000 Marrakech-Maroc

Auteur correspondant, courriel: hadrami@ucam.ac.ma

La psylle de l'Olivier (*Euphyllura olivina* (Costa)) est un ravageur commun dans tous les pays méditerranéens. Elle s'attaque aux organes en cours de croissance (jeunes pousses, grappes florales et jeunes fruits) et provoque, selon le degré d'attaque, une diminution considérable de la récolte. Peu de travaux ont porté sur les mécanismes biochimiques et moléculaires impliqués dans l'attraction ou la répulsion des cultivars d'Olivier vis-à-vis de cet insecte ravageur. Ce travail met en évidence un rôle indéniable des composés phénoliques solubles dans l'interaction du couple olivier - psylle. En effet, des différences quantitatives ont été relevées en comparant les extraits phénoliques de 10 cultivars présentant des degrés différents d'attraction ou de répulsion. Globalement, les jeunes pousses et les grappes florales des cultivars les plus répulsifs présentent des teneurs élevées en phénols par rapport aux cultivars les plus attractifs vis-à-vis de l'insecte. Par ailleurs, il ressort que l'attraction préférentielle de l'insecte par les grappes florales durant la période de floraison peut être expliquée, en partie, par leur teneur 2 à 3 fois plus faible en phénols (environ 20 mg équivalent d'acide chlorogénique/g de MF) par comparaison aux jeunes pousses. De même, ce travail révèle que les dégâts les plus importants (chute des jeunes pousses, des grappes florales et des jeunes fruits) ont lieu durant la période de floraison où le matériel végétal présente une faible teneur en phénols. Plusieurs composés phénoliques ont été identifiés comme le 3,4-dihydroxyphényléthanol, l'oleuropéine, la rutine, le lutéoline-7-glucoside, le verbascoside, l'isoquercétrine, un dérivé de l'isorhamnétine, l'acide chlorogénique et d'autres dérivés hydroxycinnamiques. Parmi ces composés mis en évidence, les teneurs en 3,4-dihydroxyphényléthanol paraissent être positivement reliées à la répulsion des cultivars. Par ailleurs, le traitement en plein champ et au laboratoire des boutons floraux et des jeunes pousses, par pulvérisation de composés phénoliques constitutifs des tissus de l'Olivier (ex. le 3,4-dihydroxyphényléthanol, l'oleuropéine et l'acide caféique) se traduit par une réduction importante voire l'annulation de la fécondité, mais également par une mortalité accrue de l'insecte (qui est de l'ordre de 80%, 56% et 58% respectivement pour les 3 traitements) par rapport au matériel végétal traité avec de l'eau et placé dans les mêmes conditions. Parallèlement, l'application de traitements impliquant des extraits phénoliques bruts provenant des jeunes pousses d'Olivier se traduit également par une réduction considérable de la ponte (de l'ordre de 72% et 93% respectivement) sans pour autant présenter des effets sur la mortalité de l'insecte. Les analyses des extraits phénoliques du matériel végétal ont montré que les divers traitements n'entraînent aucun changement qualitatif ou quantitatif des profils phénoliques tissulaires. À la lumière des résultats obtenus sur ce sujet, les composés phénoliques testés peuvent constituer des substituants des insecticides utilisés qui ne sont certainement pas sans effet sur l'environnement. L'importance des composés phénoliques, des réserves amyliques et protéiques révélées par l'étude histocytologique et des activités peroxydasiques dans le phénomène d'attraction ou de répulsion de la psylle par les cultivars d'olivier sera discutée.

***Sphaeropsis dalmatica* (Thum.) gigante, a causal agent of
olive fruit rot in Montenegro**

J. LATINOVIC, J. TIODOROVIC & Z. VUCINIC

Biotechnical Institute, Podgorica, Serbia and Montenegro

A few years ago it was recorded significant occurrence of the disease expressed on the olive fruits. The symptoms of the disease were very recognizable and necrosis development enlarged with the fruit growth and its maturity. It was established that the causal agent was the fungus *Sphaeropsis dalmatica* (Thum.) Gigante. The attack of the fungus was noticed not only on Zutica, the widespread domestic variety in Montenegro, but also on the other local varieties as well as on some introduced ones. In this work, symptoms description and some morphological and biological characteristics of *S. dalmatica* are given, as the contribution to the study of the fungus under Montenegrin ecological conditions.

Keywords: Olive - Disease - Fruit rot - *Sphaeropsis dalmatica*

Assessing the effectiveness of mycorrhizal inoculation and soil compost addition on *Olea europaea* subsp. *sylvestris* seedlings through changes in soil biological and physical parameters

A. ROLDÁN, F. CARAVACA & D. FIGUEROA

CSIC-Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura. Department of Soil and Water Conservation. P.O. Box 4195, Campus de Espinardo 30100-Murcia (Spain).

A field experiment was carried out in a semiarid area of Southeast Spain to assess the effectiveness of mycorrhizal inoculation and soil compost addition on establishment of *Olea europaea* subsp. *sylvestris* seedlings. Associated changes in soil biological and physical parameters were monitored. One year after planting, both mycorrhization and organic amendment had significantly improved the soil structure. Thus, mycorrhizal inoculation increased soil aggregates stability and composted residue addition decreased soil bulk density. A significant correlation ($P < 0.05$) was found between bulk density and several biochemical parameters (dehydrogenase, protease and β -glucosidase activities), indicating that soil biological agents play an important role in improving soil structure. The growth of *O. europaea* was significantly enhanced by both composted organic residue addition and mycorrhizal inoculation treatment. The increase in mycorrhizal *O. europaea* seedling growth may be due to the positive influence of mycorrhiza on soil aggregates stability and availability of water. The combination of high fertility levels and low bulk density also favored the growth of *O. europaea* in compost-amended soils. Finally, the positive interaction of both methods on seedling height growth could be related to the capacity of the mycorrhizal fungus to increase nutrient uptake from the soil amended with the composted residue.

Effet des extraits phénoliques à partir de margines ou de jeunes pousses d'olivier sur les taux d'infestation de l'olivier par *Euphyllura olivina* Costa

Ilham RAHHOU ¹, Abdelkader HILAL ², Yamna OUGASS ², Abdelaziz ABBAD ³
& Ismail EL HADRAMI ¹

¹ Laboratoire de Physiologie Végétale, Equipe Biotechnologies et Physiologie Végétale, Faculté des Sciences Semlalia, B.P. 2390, 40001 Marrakech

² Laboratoire d'Entomologie (INRA, Marrakech)

³ Laboratoire d'Écologie végétale, Faculté des Sciences Semlalia, Marrakech.

Auteur correspondant: hadrami@ucam.ac.ma

L'oléiculture à base de l'olivier (*Olea europaea* L.) est une des cultures caractéristiques du bassin méditerranéen. En effet, cet arbre occupe à l'échelle nationale environ 55 % de la surface arboricole. La production de l'olivier est confrontée à plusieurs problèmes en particulier l'attaque par les insectes phytophages. Parmi les insectes nuisibles de l'olivier, *Euphyllura olivina* Costa cause des dégâts importants. Aussi, a-t-on tenté d'évaluer l'effet de deux extraits phénoliques préparés à partir des solutions à base de matière fraîche et sèche des feuilles et des jeunes pousses du cultivar Frontoïo et des margines sur le taux d'infestation. Cette étude a été menée aussi bien au laboratoire qu'en plein champ. Le taux d'infestation a été évalué par le nombre d'œufs pondus et le taux de mortalité sur des rameaux traités et témoins (non traités). L'analyse au laboratoire a montré que les traitements par les deux extraits (matière fraîche et margines) ont engendré une réduction significative du nombre d'œufs pondus sur les rameaux traités par rapport au témoin et cela pour les deux variétés étudiées (Santa catharina et Frontoïo). Cette réduction des œufs pondus est nettement plus importante pendant les 10 premiers jours qui suivent le traitement. Le taux de mortalité de l'insecte paraît ne pas dépendre du traitement et cela au niveau des rameaux des deux variétés étudiées. Cependant, ce taux de mortalité augmente de façon significative en fonction du temps pour les trois traitements (témoin, extrait végétal et margines). L'étude au champ a confirmé l'effet dépressif des traitements par les margines et les extraits végétaux vis-à-vis de l'insecte marqué par une réduction importante du nombre d'œufs pondus et de larves par rameaux. Les données ici obtenues laissent penser à une potentielle utilisation des margines (sous-produits de l'olive) ou encore des extraits phénoliques à partir des rameaux de l'arbre pour contrecarrer l'effet nuisible pour le moins de la Psylle.

Mots-clés: Phénols - Biocontrôle - Psylle - *Euphyllura olivina* Costa - Ponte - Mortalité - Santa catharina - Frontoïo.

Review of expansion olive culture in Iran Golestan Province

M. YAGHBANI

Agricultural Research Center of Golestan Province, Iran

Requirement of oil in Iran is 960,000 ton/year that only 10 % of it is produced at present time and the rest are imported. As approach to self-sufficiency in production of oil is an important policy , increasing of oil production due to expansion of olive culturing is one of the important projects in Iran. Since climate in some provinces of Iran such as Golestan, Ghazvin, Gilan, Zanjan and ... allow to culture of olive trees therefore it is possible to use undesirable lands for olive culturing. During of a ten years programe, present olive cultured areas that is 95,000 ha , will raise to 600,000 ha and it is predicted in 2032 oil production from olive fruit reaches to 470,000 tons. The most production of olive oil is in Zanjan province that produced 17000-18000 tons/year olive fruits while total olive production in this year was 57000 tons. Simultaneous with increasing of fruit production, the creation of processing plants will be necessary. Golestan province have many sloping lands that could be considred for olive culturing that this project is started now. In this article basical information, tachtical method and some results will review.

Keywords: Olive culture - Iran - Golestan Province.

Study of the effectiveness of Mass Trapping and new products for the control of the olive fruit fly *Bactrocera oleae* (Gmelin) (Diptera: Tephritidae) in organic olive grooves

K. VARIKOU¹, V. ALEXANDRAKIS¹ & A. KALAITZAKI²

¹ Institute of Olive tree and Subtropical plants, Agrokipio, 73100, Chania, Greece. E-mail: valexandr@nagref-cha.gr

² Prefecture of Chania, Division of Agricultural Development, Chania, Greece. E-mail: argkalaitzaki@yahoo.com

Extensive research has been carried out the last years to develop methods that can be used in organic olive grooves for the control of Olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Gmelin). Five different types of liquid and paper traps were tested in Mass trapping (mts) for their effectiveness. New naturally products of microorganisms, like *Saccharopolyspora spinosa* (Spinosa) deriving from fermentation, which does not disrupt the agro ecosystem balance, have been evaluated for their effectiveness against the olive fruit fly in bait spray from the ground applications compared with the classical control (chemicals). The results showed that the recorded populations in the plots of the traditional bait control with chemicals (reference product) were about 3 times more than the plots of the tested traps. Among the type of trap treatments no significant difference was observed. Under the experimental conditions, Mts couldn't be a self-sufficient method of controlling the olive fruit fly and bait applications were sometimes necessary (depending on the insect populations and infestation). Mass trapping combined with chemical applications was equal to combination with the new product applications. Similar results were also observed on the captured olive fruit fly populations when the naturally product was compared to the classical chemical control. The percentage of the olive fruit fly infestation was low in all treatments and not significantly different.

Keywords: Olive fruit fly - *Bactrocera oleae* - Mass trapping - Microorganisms.

Olive orchard management for the improvement of quality and productivity and natural resources conservation in sloping land

I. METZIDAKIS ¹, C. COSMAS ² & V. KASSIDONIS ²

¹ Institute of Olive Tree and Subtropical Plants of Chania (ISPOT), National Agricultural Research Foundation (NAGREF), Chania, Greece

² Laboratory of Soils and Agricultural Chemistry, Agricultural University of Athens, Greece
Corresponding author, e-mail: imetzis@nagref-cha.gr

A detailed analysis of orchard management and land husbandry applied in olive orchards of sloping land in Crete, was conducted in the framework of OLIVERO project, in order to assess their qualitative and quantitative impact on production. An inventory of the actual status of cultivation systems and their production-, ecological-, economic- and social functions was a requisite to assess the suitability of the farm management practiced in each case. Several alternative cultural techniques (irrigation, tillage, plant cover etc) were tested. Sampling and analysis of soil (CEC, macro- and microelements, organic matter etc) was conducted and the PESSERA model was used for the estimation of erosion and land degradation. Recommendations of the best management practices for productive olive growing-by supporting farmers income-are opposed with concern to natural resources conservation and protection from desertification.

Keywords: Olive - Orchards - Management - Creta - Cultivation system - Cultural techniques.

Fertilizing practices used and nutritional status of olive orchards in the area of Crete

M. LOUPASSAKI¹, A. DIGALAKI¹, C. PSARRAS, K. CHARTZOULAKIS¹ & J. ANDROULAKIS¹

¹ Institute for Olive Tree and Subtropical Plants of Chania, Agrokipio, 73100, Chania, Crete, Greece.

Corresponding author, e-mail: mloupas@nagref-cha.gr

A survey on the nutritional status of olive trees in orchards of the prefecture of Chania, Crete, Greece was carried out in order to evaluate the existing fertilizing practices of Cretan farmers. In total, 136 orchards were included in the survey. Leaf analyses for N, P, K, Ca, Mg, B, Fe, Zn and Mn and soil analyses for pH, electrical conductivity (EC), soil texture and total CaCO₃ were carried out in order to evaluate the nutritional status of the trees and some essential properties of the soil. General information about the orchard layout and tree status (age, planting density, yield, etc.) was also collected for each orchard included in the survey. The majority of the sampled soils was medium-textured, while at about 30% of them the pH under the tree canopy was either too low or too high (<5.3 or >8.0). Soil pH was significantly lower under the tree canopy as compared to mid-row samples, especially in soils with low CaCO₃, while only 2.3% of the farmers were adding lime. More than 40% of the farmers were using composite fertilizers. As indicated by the leaf analyses data, trees had higher than the optimum levels of Na, P and K in about 38, 77 and 55% of the orchards respectively. On the contrary, for all nutrients, the percentage of orchards that had levels in the deficiency range never exceeded 2.3%. Consequently, it seems that the fertilizing practices of farmers in the area of Chania were in several cases inappropriate, adding higher amounts of macronutrients (N, P, K) than the actual plant requirements. From the micronutrients, the levels were below the optimum range in 58.9% of the orchards.

Keywords: Olive tree - Mineral nutrition - Fertilizer

Presence of moulds during olive post harvest process in Morocco and detection of mycotoxins in the end products

S. ROUSSOS¹, C. AUGUR¹, I. PERRAUD-GAIME¹, B. RIO¹, M. CHEHEB²,
G. SALIH², K. LAMRANI² & M. ISMAILI-ALAOUI²

¹ Laboratoire de Microbiologie IRD; IFR-BAIM, Université de Provence. Case 925, 163 Av de Luminy, 13288 Marseille Cedex 09. France

² Laboratoire de Bioprocédés, Div. Industries Agro-Alimentaires, Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II; BP 6202; Rabat Instituts, Rabat, Maroc
Corresponding author, e-mail: roussos@univ.u-3mrs.fr

Olives and olive oil play an increasing important nutritional role not only in Mediterranean countries but also in the world, and are an essential part of what is now widely known as the « Mediterranean diet ». However, the quality of the product varies greatly from one country to the other and often from one region to the other. There is a need for technological progress through the modernisation of traditional farms or the improvement of the quality of the end products whether for table olives, olive oil or olive cake. Post harvest storage of olive in Morocco and processing in the olive oil mill was analysed and discussed indicating possible impact in the safety and the quality of the end products particularly the presence of moulds on table olives and the detection of mycotoxins such as Ochratoxin A and Aflatoxin B1 in the olive oil. The purpose of this work is to present (1) the natural mycoflora present in olive, (2) the potential of fungi to produce mycotoxins and (2) the detection of mycotoxins in olive oil.

Keywords: Olive - Olive oil - Moulds - *Aspergillus niger* - *Aspergillus flavus* - *Penicillium* - *Geotrichum* - Mycotoxin - Ochratoxin - Aflatoxin - Immunoaffinity - HPLC.

Essai de lutte biologique contre les champignons de pourriture des olives

M. GHARSALLAOUI, A. RHOUMA, M. KHLIF & S. REBAI

Institut de l'Olivier BP 1087 Sfax 3000 Tunisie

Auteur correspondant, courriel: gama@yahoo.fr

Le stockage des olives au niveau de l'huilerie est une opération inévitable. Cependant, la contamination fongique est favorisée dans ces conditions. Des réaction d'hydrolyse et d'auto-oxydation enzymatique, dues à la forte teneur en eau du mésocarpe et à la présence des micro-organismes, principalement les champignons, peuvent se déclencher et provoquer la fermentation. Ceci se traduit par la détérioration de la qualité de l'huile. Ce travail tente d'étudier l'efficacité de la lutte biologique par l'utilisation de champignons antagonistes à savoir *Trichoderma viride*, *Trichoderma harzanium* et *Trichoderma* sp. La première partie de cette étude est consacrée à la détermination de l'effet antagoniste de ces champignons vis-à-vis des pathogènes. La deuxième a trait aux analyses physico-chimiques des huiles issues des olives traitées par ces antagonistes et stockées.

Mots-clés: Lutte biologique - Antagonisme - *Trichoderma viride* - *Trichoderma harzanium* - *Trichoderma* sp. - Champignons pathogènes - Stockage - Huile d'olive - Qualité

Improving the olive oil quality by increasing the concentration of its natural antioxidants during processing

P. RODIS¹, G. MONTEDORO², J. ALBA MENTOZA³, D. ICONOMOU⁴,
M. SERVILLI², R. GUILLEN³ & E. STEFANOUDAKI⁵

¹ Agricultural University of Athens, Dept. of Food Science and Technology, Iera Odos 75, Votanikos, Athens, 118.55, Greece. Tel: 0030 210-529-4702, 5980211, Fax: 0030 210-529-4702. E-mail: prodis@aua.gr

² Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Sezione di Tecnologie e Biotecnologie degli Alimenti Via S. Costanzo, 06126 - Perugia, Italy. Tel.: +39 075 5857942 - 7903; Fax.: +39 075 5857916. E-mail: servimau@unipg.it

³ Instituto de la Grasa y sus Derivados, Avda. Padre Garca Tejero 4, 41012 Sevilla, Spain. Tel.: 0034-5469-0850, Fax: 0034-54691262/16790-54690850. E-mail: rguillen@cica.es

⁴ Institute of Technology of Agricultural Products, I.S. Venizelou, Lycovrissi, 141 23 Athens, Greece. Tel: 0030 210-284-5940 - 1 - 2, Fax: 0030 210-284-0740. E-mail: diconomou@nagref.gr

⁵ Institute of Olive Tree and Subtropical Plants of Chania, NAGREF, Agrokipio 73100 Chania, Greece. E-mail: estefan@nagref-cha.gr

The natural antioxidants of olives (phenolic compounds) are distributed among oil, vegetation water and colloids (pectins, hemicelluloses, proteins and phenolic polymeric structures) after crushing. The colloidal system creates a complex with the phenolic compounds, especially quinones, and this mechanism is responsible for the loss of the phenols in the pomace. Processing under N₂ flow reduced the formation of quinones and increased the phenolic concentration in the various products of olive oil extraction. Likewise, the use of depolymerising enzymes during malaxation increased more the content of orthodiphenols than non-orthodiphenols in oils from i.e cv. Picual, Arbequina, Coratina and Koroneiki. The positive effect of enzymatic preparations was though higher on early harvested olives (green or 50% deep pigmentation stages). The use of enzymatic preparations did not modify the marketable quality of the oil (Reg. UE 2568/91 and Reg. UE 1513/01) while increases the antioxidant content and consequently improved nutritional and sensory quality of virgin olive oils.

Influence on olive oil quality of mixing in nitrogen atmosphere

P. AMIRANTE¹, A. TAMBORRINO¹, A. LEONE¹, G.L. MONTEL²
& G. DUGO³

¹ PROGESA dept, University of Bari, paolo.amirante@agr.uniba.it; leone@agr.uniba.it; a.tamborrino@agr.uniba.it

² PRIME dept, University of Foggia, g.montel@unifg.it

³ DiBCA. dept, University of Messina, dugogia@isengard.unime.it

In olive oil extraction process cycle mixing is an essential action with the aim to favor the breakup of the oil/water emulsions, formed during the crushing, and also to favor the reunion of the droplets of oil in drops of greater dimensions, such to easilier separate it more and more in the extraction phase. The increase of the duration of the mixing determines an increase of yield extraction, but such increase negatively influences the quality of the oil because of the onset of oxidative phenomenons, considering the presence of the oxygen in the atmosphere that overhangs the olive paste in mixer. A containment of the gaseous exchanges between the mixer atmosphere and the external environment or the glut of the same one with nitrogen (in environment perfectly closed), allows to increase the yield and to influence the oil quality, also prolonging the mixing time to 90 minutes; the oil so gotten it will preserve character of freshness and fragrance. The search has been developed to define the optimal mixing conditions using atmosphere of inactive gas, or maintaining the mixer under hermetic conditions allowing the gradual consumption of oxygen inside, during the mixing; these two conditions are been compared with the normal conditions of mixing. Samplings of oil are been compared coming from the same cultivar, the "Peranzana", starting from, stoned and de-stoned olives; qualitative parameters and the aromatic component has been determined. Moreover, during the tests in confined mixer, has been relief the percentage oxygen versus mixing time.

Keywords: Olive oil extraction - Process - Nitrogen atmosphere - Aromatic component.

Effet du talc sur le taux d'extraction et la qualité de l'huile d'olive

M. AYADI

Le produit principal de l'olivier est l'huile d'olive dont la qualité dépend de plusieurs facteurs agronomiques, technologiques et génétiques. Ce travail consiste à étudier l'influence du talc sur les paramètres physico-chimiques de l'huile de certaines variétés. Les résultats obtenus avec l'ajout de talc à différentes doses à la pâte de quatre variétés au cours du malaxage, montrent que cet adjuvant:

- A un effet sur les rendements en huiles, les teneurs en polyphénols, en chlorophylles et en insaponifiables ainsi que sur la stabilité oxydative des huiles.
- N'a pas d'effet sur l'acidité de l'huile, l'extinction spécifique à 232 et 270nm et sur la composition acide.

Mots-clés: Huile d'olive - Talc - Extraction

Nouvelle méthode de mesure de la teneur en acides gras polyinsaturés dans l'huile d'olive par couplage de deux enzymes

Ines BEN REJEB ¹, Jeannette BEN HAMIDA ² & Mohamed GARGOURI ¹

¹ Équipe de Génie Enzymatique, Institut National des Sciences Appliquées et de Technologie de Tunis, BP 676, 1080 Tunis Cedex, Tunisie, Tél: +216 71 703 829, Fax+216 71 704 329

² Laboratoire de Biochimie, Faculté des Sciences de Tunis, Tunisie

Auteur correspondant, courriel: benrejebines@yahoo.fr.

Le problème d'oxydation de l'huile d'olive est d'une importance majeure et dépend de la teneur en acides gras polyinsaturés. De nombreuses méthodes permettant de mesurer la teneur en acides gras dans une huile ont été développées. Cependant, aucune d'entre elles n'est vraiment complètement satisfaisante. Dans ce travail, on propose une méthode originale pour le dosage spécifique des acides gras polyinsaturés dans l'huile d'olive. Cette méthode est basée sur le couplage de deux enzymes: une lipase et une lipoxygénase. En effet, après hydrolyse lipasique des triglycérides et libération d'acides gras, la lipoxygénase utilise les acides gras polyinsaturés comme substrat pour donner des hydroperoxy-acides dosables à 234 nm. La deuxième réaction est très rapide et facilement suivie au spectrophotomètre. Elle permet donc le dosage indirect de l'activité lipasique. On note que les lipoxygénases utilisées, extraites à partir de graines de soja ou de pomme de terre, sont spécifiques des acides gras polyinsaturés et libres. Dans une huile, les acides gras saturés ou monoinsaturés ainsi que les acides gras estérifiés ne sont pas attaqués par la lipoxygénase et ne donnent donc pas de signal. L'huile d'olive a été utilisée comme substrat. La méthode de dosage par couplage enzymatique a été comparée à des méthodes classiques de dosage des acides gras libres par titration d'acide oléique libéré à partir d'huile d'olive ou de butyrate libéré à partir de tributyrine. La nouvelle méthode a montré une précision et une facilité d'utilisation comparables à celles des autres méthodes. En plus, elle peut être utilisée avec des préparations industrielles de substrat et d'enzymes libres ou immobilisées.

Caractérisation chimique et organoleptique des huiles d'olive issues des Maâsra de la région d'Essaouira (Maroc)

Abderraouf EL ANTARI¹, Abdelaziz EL MOUDNI¹, Hamid AJANA²,
Charlotte MARION³, Simon PERES³, Antoine PROFITT³,
Maria Louisa AMBROSINO⁴ & Raffaella SACCHI⁴

¹ Laboratoire de Technologie des Huiles Programme Olivier INRA-Marrakech BP 533 Marrakech Maroc. Tél: 044 44 78 82 Fax: 044 44 63 80

² Laboratoire Sciences des Aliments Département de Biologie Faculté des Sciences Semlalia - Marrakech, Maroc.

³ Département de Biologie expérimentale ENITA de Bordeaux, France.

⁴ Laboratoire des Huiles et Graisses Département Sciences des Aliments Faculté d'Agriculture Napoli, Italie.

Auteur correspondant, courriel: Abderraouf_el_antari@hotmail.com

In order to contribute to the elaboration of the first designation of origin concerning Moroccan olive oil, the results presented are related to chemical and organoleptic characterization of virgin olive oil produced in the traditional system of trituration « Maâsra ». The necessary elements to achieve a designation of origin were assembled (Location, variety and practices), however, some transformation practices should be improved to correct the defects noted in the gustatory level. Within the framework of this study, three investigations were carried out. The agronomic and technological investigations allowed us in one side to direct the operations of production from the harvest of olives until the trituration, in the other side they allowed us to improve the quality of oil especially the acidity degree. The consumer investigation showed us an absence of knowledge concerning categories of olive oil and in the same time his attachment to the regional products. This fact requires more attention to inform consumers about the importance of quality and its implication within the promotion of the traditional products. En vue de contribuer à l'élaboration des premières appellations d'origines de l'huile d'olive au Maroc, les résultats présentés portent sur la caractérisation chimique et organoleptique des huiles d'olive vierges produites dans le système de trituration traditionnel « Maâsra ». Les éléments nécessaires pour aboutir à une appellation d'origine étaient réunis (terroir, variété et pratiques). Cependant, des pratiques sur le plan transformation doivent être améliorés pour corriger les défauts notés sur le plan gustatif. Dans le cadre de cette étude, trois types d'enquêtes ont été réalisées. Les enquêtes agronomique et technologique nous ont permis, d'une part, d'orienter les opérations de la production depuis la récolte des olives jusqu'à la trituration dans les Maâsra et, d'autre part, d'améliorer la qualité de l'huile, notamment le degré d'acidité. L'enquête auprès du consommateur a montré une absence de connaissances sur les catégories d'huile d'olive, mais également son attachement vis-à-vis des produits régionaux. Ceci montre tout l'intérêt que l'on doit accorder à l'information du consommateur sur les notions de qualité et l'importance de l'intégrer lors de la promotion des produits traditionnels.

Oil quality of some foreign varieties used for intensive culture

Amira ALLALOUT¹, Béchir BACCOURI¹, Douja DAOUD¹
& Mokhtar ZARROUK¹

¹ Laboratoire de Caractérisation et Qualité de l'Huile d'Olive, INRST, B.P. 95, 2050 Hammam-Lif, Tunisie
Corresponding author, e-mail: mokhtar.zarrouk@inrst.rnrt.tn

The improvement of tunisian olive oil production, regarding either oil quality or yield requires to select performant varieties. This choice could be done through different ways such as introducing new varieties having advantageous characteristics as related to oil quality and yield. In the frame of this proposed work, we intend to implement a biochemical evaluation of four olive varieties planted under intensive farming in Tunis region. Among the four varieties, three are originated from Spain: Arbequina, Arbequina clone I18, Arbosana, and greek variety called Koroneiki. The analysis data showed that content of total phenols varies according to variety. The highest level was observed for Koroneiki cultivar (209,5 mg/kg), compared to the lowest levels observed in the clone (7,06 mg/kg) and Arbequina variety (10,29 mg/kg) while Arbosana showed an intermediate content (60,34 mg/kg). Chlorophyll content showed a low level in the four varieties studied, reaching slightly 1 mg/kg for Arbequina, clone I18, and Arbosana whereas it exceeded 2 mg/kg for Arbosana variety. Free acidity in studied varieties was lower than 1% which corresponds according to the standards to the extra virgin olive oil with good quality. The values observed were 0,5 for Arbequina, 0,4 for clone I18 and Arbosana and 0,3 for Koroneiki. The peroxide value as expressed in meq O₂ per Kilogramme of oil never exceed 15 for all tested varieties.

Small sized olive oil extraction plant for high quality local productions

P. AMIRANTE ¹ & L. BACCIONI ²

¹ PROGESA dept, University of Bari, paolo.amirante@agr.uniba.it

² ALFALAVAL olive oil Firenze, lambero.baccioni@alfalaval.com

Alfa Laval olive oil, collaborating with the Mechanical section of the PROGESA department of the University of Bari, has designed a plant small sized, technologically advanced, endowed with the possibility of setting of the single process operations. By its use, it's possible to crush or, in alternative, to destone the olives, to mix in confined or with nitrogen atmosphere and, finally, to use a decanter that can work with a barrier and two phases with an ample possibility of setting of the unloading levels. The plant of small dimensions is able to work 500 kg/hour of olives, connecting them, so with a shaking mechanical harvest site. The first results of the crushing, mixing and extraction are particularly interesting and they show as it is possible to work in quality and with all the most modern technologies of oil extraction, also with small sized plants, destined to the single farm to satisfy its own oil production.

Optical inspection and automatic quality separation of olive fruit for production of table olives and olive oil

A. KIRITSAKIS¹, S. EFSTRATIADIS¹, F. STERGIPOULOS¹,
K. KIRITSAKIS¹ & E. SOKOUTI¹

¹ Technological Education Institute (TEI), Sindos Thessaloniki, Greece
Corresponding author, e-mail: kiritsak@food.teithe.gr

An original optical inspection method and automatic quality separation of olive fruit is proposed. This study is designed to improve the quality of table olives and virgin olive oil. Our aim is to accomplish an effective separation of healthy and defective olive fruit and of foreign materials as well, based on digital images taken at the early stages of processing. We consider a computing system with suitable logistics that will elaborate the images of the olive fruit from the digital camera. Further more, the optical quality and purity control of the olive oil after the final centrifugation will be studied.

Keywords: Olive fruit - Inspection - Automatic separation - Optical quality - Image.

Use of a selected strain of *Lactobacillus pentosus* in the production of naturally fermented green- (var. *Nocellara del Belice*) and black- (var. *Itrana* and *Leccino*) table olives at laboratory and industrial scale

M. SERVILI, G.F. MONTEODORO, J. ROSSI, G. VENEZIANI, S. ESPOSTO,
O. MASSITTI, A. TATICCHI & A. CORSETTI

Dipartimento di Scienze degli Alimenti - Sezione di Tecnologie e Biotecnologie degli Alimenti
- Università degli Studi di Perugia - Via S. Costanzo, 06126 Perugia (PG), Italia.
Corresponding author, Tel. +39 075 5857925; Fax +39 075 32387
Corresponding author, e-mail: corsetti@unipg.it; servimau@unipg.it

So far the industrial production of both green- and black- table olives rely on a spontaneous fermentation, resulting in products with variable characteristics. Nevertheless it is known that a rapid lactic fermentation is required to reduce the likelihood of spoilage and increase the palability of the product. To achieve this purpose the use of selected lactic acid bacteria as starter could be profitable. In this study, fermentation of green (*Nocellara del Belice*) and black (*Itrana* and *Leccino*) cultivars of olives was obtained by using selected starter, at laboratory scale and, for the last cultivar, also in an industrial plant, without prior lye treatment. First, fifty lactic acid bacteria were isolated from green- and black- table olive brines and evaluated on the basis of salt-tolerance and resistance to oleuropein and its derivatives. A strain of *Lactobacillus pentosus* was then used as starter culture to ferment, at different temperatures, brines modified for initial pH value, carbohydrate and growth-factor concentration. For black *Leccino* cultivar olives, temperature-controlled fermentation enabled, both at laboratory and industrial scale, the obtaining of ready to eat, high quality table olives, only after 6 and 8 days of fermentation at 28 and 20°C, respectively. At the above time chromatographic analysis of fermented olives and brines showed a decrease of oleuropein and oleuropein glycoside and an increase of hydroxytyrosol, marking the end of the debittering process. A final pH values of 3.8 and a 8% salt concentration allowed the stability of the product without any further thermal or chemical treatment.

Identification par GC/Olfactométrie et GC/MS des composés odorants de l'olive verte de table et variation de la composition au cours du procédé de fabrication

Rafika IRAQI¹, Amale BENZEKRI¹, Amina BOUSETA¹, Driss BOUYA¹,
Sonia COLLIN² & Ahmed LEBRIHI³

¹ Université Sidi Mohamed Ben Abdellah, Faculté des Sciences Dhar Mahraz. UFR de Biochimie Appliquée et des Sciences Alimentaires. Fès, Maroc

² Unité de Brasserie et des Industries Alimentaires, Université catholique de Louvain, Faculté d'Ingénierie Biologique, Agronomique et Environnementale. Louvain-la-Neuve, Belgique

³ Laboratoire de Génie Chimique UMR5503 (CNRS-INPT-UPS), École Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse (ENSAT), France

Les olives de table sont caractérisées par une flaveur typique très appréciée par le consommateur méditerranéen. Afin d'évaluer leur qualité organoleptique, notre travail a pour but de mettre en évidence les principaux composés responsables de l'arôme de l'olive verte marocaine préparée selon « la méthode espagnole ». La variation de ces composés volatils et de certains paramètres biochimiques a également été suivie au cours du procédé de fabrication. Les composés odorants ont été extraits par une distillation-extraction simultanée type Likens-Nickerson. L'extrait ayant une odeur représentative de l'échantillon a été ensuite analysé par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme et à un détecteur olfactif (GC/Olfactométrie) ainsi que par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC/MS). L'identification s'est basée sur la comparaison des indices de rétention, des odeurs et des spectres de masse des arômes de l'extrait de l'olive avec ceux des composés standards. Parmi les 150 composés volatils détectés plus de 60 ont été identifiés et appartiennent à différentes classes chimiques comme les aldéhydes, les alcools et les terpènes. Le repérage des composés potentiellement odorants a été réalisé par GC/Olfactométrie sur des extraits de plus en plus dilués selon la méthode AEDA (Aroma Extract Dilution Analysis). Les résultats ont montré que l'hexanal caractérisé par une note de verdure est le composé odorant principal de l'olive verte de table. Le suivi de certains paramètres biochimiques au cours du procédé de fermentation aussi bien à l'échelle industrielle que du laboratoire a montré que le taux des sucres réducteurs et aminoacides libres diminuent nettement au cours du process alors que les teneurs en protéines ne subissent aucune modification. Parallèlement, des composés volatils comme certains alcools et aldéhydes et ayant différentes notes olfactives dont l'odeur florale et l'odeur fruitée sont synthétisés au cours de la fermentation lactique.

Major and minor components of virgin olive oil from some tunisian cultivars

L. ABAZA ¹, S. BEN TEMIME ¹, W. TAAMALLI ¹, D. DAOUUD ¹
& M. ZARROUK ¹

¹ Laboratoire de Caractérisation et Qualité de l'Huile d'Olive, INRST B.P.95 - 2050 Hammam-Lif, Tunisia

Corresponding author, e-mail: mokhtar.zarrouk@inrst.rnrt.tn

Some studies indicated that Pedoclimatic conditions, ripeness degree of olives, extraction methods and other factors may have a certain impact on olive oil quality but varietal factor seems to have the important one. In this work we have considered seven cultivars grown in an experimental station of Béjaoua (North of Tunisia, near Tunis) in the same pedoclimatic conditions. At the stage of maturity, olives were harvested and processed using the laboratory mill. Oils were characterized based on their fatty acids, triacylglycerols and two natural antioxidants: phenols and tocopherols. Results confirmed that analytical parameters are tightly linked to cultivars. Fatty acids and triacylglycerols composition showed a high quality of Sayali oil. Whereas, Chemchali oil is characterized by the highest level of total phenols. Our study revealed, also that certain phenolic compounds are present in some samples and not in others suggesting the possibility of using phenolic composition to classify virgin olive oils.

Determination of harvesting time and effects of storage conditions of olive fruit on quality and quantity of its oil on superior cultivars of Iran

J. MOHAMADZADEH

The harvesting time and storage conditions of olive fruit are effective factors on the quality and quantity of olive oil. The harvesting time of olive is different in the each area and it depends on climatic conditions. In this study, three selected cultivars of Golestan province include of Mission, Bleaidy and Roghani were harvested from middle September till early December with two week intervals and then quality and quantity of oil was determined. The results showed the oil content (on dry basis) for Mission reached to maximum level (44.2%) in the middle of November and for Bleaidy and Roghani were 52.1 and 50.2% respectively in the beginig of December. All increased oil content (as fresh % w.t) were due to decrease in water content of fruit. The acidity of oil during harvesting time arised countineously so that it was increased significantly after December. Therefore, the best harvesting time for these cultivars is beginning of December. Then, ripped olive fruits were stored in plastic boxes with three different storage conditions (referigeration with 5°C and 8°C temperatures and ambient condition) and quality of oils are determined after 45 days. According to the obtained results, referigeration in 5°C was the most suitable treatment. The oil quality of fruits stored in 5°C and 8°C was unchanged until 30 day and 15 day respectively while for ambient condition was less than 7 days. The oil content (as%dry wt) of olives stored in 5°C and 8°C was unchanged for 45 and 30 day respectively while in ambient condition was 15 day.

Keywords: Olive - Harvesting time - Storage - Oil quality

Performances de l'unité mobile de trituration des olives

M. ISMAILI-ALAOUI¹, N. AKESBI¹, N. ELYASSAMI¹ & O. ZEMRANI¹

¹ Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, BP 6202-Instituts, Madinate Al Irfane, 10101 Rabat, Maroc

Aueur correspondant, courriel: m.ismaili@iav.ac.ma

Le projet Biotransformation/Maroc a mis au point une unité mobile de trituration des olives répondant aux normes d'hygiène, de sécurité et de qualité, permettant aux agriculteurs de bénéficier d'un service de proximité. Équipée d'un régulateur électrique et d'un système de sécurité, cette machine, dont toutes les parties en contact avec l'olive ou l'huile extraite sont en inox alimentaire, est capable de fonctionner avec de l'énergie mécanique (diesel ou électricité) et permet d'améliorer la capacité de trituration journalière. Cette unité d'extraction d'huile d'olive devrait réduire la durée de stockage et la fréquence de broyage des olives, ce qui contribuera à l'amélioration de la qualité du produit et du rendement. Le travail a été effectué dans la zone de Tazougart située dans la province d'Errachidia. L'expérimentation conduite au niveau de la zone d'étude nous a permis de tirer les conclusions suivantes:

- Pour le suivi du bilan énergie de l'unité mobile, les calculs basés sur des enregistrements quotidiens ont montré qu'il faut 1 litre de gasoil pour produire 10 litres d'huiles d'olive.
- Pour le suivi du bilan matière, les résultats obtenus par enregistrement des entrées et des sorties de l'unité mobile ont permis de dégager une perte de 0,12 kg/quintal d'olive trituré.
- Le fonctionnement de cette Maâsra mobile nous a permis de relever les caractéristiques suivantes:
 - * l'énergie utilisée peut être le gasoil ou l'électricité;
 - * la capacité journalière est 15 quintaux;
 - * les opérations d'effeuillage et de lavage sont de l'ordre de 200 à 300 kg/ 22 min;
 - * l'opération de broyage est effectuée avec un broyeur à deux meules, soit 200 à 300 kg d'olives/46 min;
 - * l'opération de malaxage concerne 200 à 300 kg/ 46 min;
 - * la pression est hydraulique (300 kg/cm²);
 - * le stockage des huiles est fait à l'abri de la lumière.

Le rendement d'extraction obtenu est en moyenne 19,50 l/q avec un intervalle de production de 18 à 22 litres/q. Les huiles issues de l'unité mobile sont, dans 96% des cas, de catégorie «extra-vierges» et de bonne qualité organoleptique.

Étude du comportement des oléiculteurs face aux nouveaux services offerts par la Maâsra mobile

M. ISMAILI-ALAOUI ¹, N. AKESBI ¹, N. ELYASSAMI ¹ & O. ZEMRANI ¹

¹ Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, BP 6202-Instituts, Madinate Al Irfane, 10101 Rabat, Maroc
Aueur correspondant, courriel: m.ismaili@iav.ac.ma

L'enquête menée auprès des utilisateurs de l'unité mobile nous a permis de cerner leurs comportements vis-à-vis des services offerts par ce matériel en comparaison avec ceux des Maâsra traditionnelles. En effet, en termes technologiques, les infrastructures de trituration existantes au niveau de la zone de Tazougart (Tafilalet) ne permettent pas de valoriser la production oléicole du fait qu'elles engendrent de nombreuses pertes tant au niveau quantitatif que qualitatif. Au niveau logistique, l'éloignement des unités modernes constitue un obstacle pour la valorisation de la production et contribue à réduire, par les charges de transport, le revenu des agriculteurs. C'est pour cela qu'une nouvelle technologie mobile de trituration des olives, mise au point par le projet Biotransformation/ Maroc, a été conçue pour être en mesure d'accéder facilement aux lieux de production enclavés. L'utilisation de l'unité mobile a été appréciée par la majorité des agriculteurs qui ont manifesté leur intérêt pour une telle unité qui peut accéder facilement aux oliveraies et qui leur permet de valoriser leur production tout en produisant une huile de très bonne qualité « extra-vierge ». Selon les personnes enquêtées, les principaux avantages de l'unité mobile résident dans sa proximité auprès des lieux de production, sa capacité de trituration élevée, le respect des conditions d'hygiène et de qualité des huiles d'olives produites et, enfin, son efficacité économique par rapport aux unités traditionnelles.

Effect of commercial enzymes treatment during olive paste malaxation on qualitative characteristics of virgin olive oil

E. STEFANOUDAKI¹, D. ICONOMOU², A. KOUTSAFTAKIS¹,
C. ISRAILIDES², A. PAPAMANOLIUDAKI¹ & D. ARAPOGLOU²

¹ NAGREF-Subtropical Plants and Olive Trees Institute, Agrokipio 73100 Chania. E-mail: estefan@nagref-cha.gr

² NAGREF-Institute of Biotechnology of Agricultural Products, 1 S. Venizelou Str., Lycovrissi 14123, Athens - Greece. E-mail: diconomou@nagref.gr

The effect of treatment of olive paste of *cv.* Koroneiki with commercial enzymes on quality characteristics and the release of antioxidants in olive oil were evaluated by pilot plant experiments. In addition, the reduction of oxygen from olive paste either due to malaxator type or the use of nitrogen purge was examined. Results showed that the use of commercial enzyme preparations and nitrogen purge in the green olive paste during malaxation increased total phenols and secoiridoid derivatives in the oil and improved oxidative stability. Furthermore, treatment with enzyme combination and/or under nitrogen purge increased bitter and pungent attributes. Sterol and fatty acid composition was not affected by paste enzymatic treatment or by purging nitrogen during malaxation. Moreover, the malaxator type differentiates the concentration of antioxidants in the virgin olive oil.

Étude préliminaire de la stabilité oxydative de l'huile d'olive vierge

Faten KOTTI¹, Mustapha ISMAILI-ALAOUI² & Mohamed GARGOURI¹

¹ Équipe de Génie Enzymatique, Institut National des Sciences Appliquées et de Technologie de Tunis, BP 676, 1080 Tunis Cedex, Tunisie, Tél: +216 71 703 829, Fax+216 71 704 329,.

² Laboratoire de Biotransformation, Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Rabat, Maroc

Auteur correspondant, kotti_faten@hotmail.com

La stabilité oxydative est un paramètre qui conditionne la qualité de l'huile d'olive vierge. Elle dépend de la teneur en acides gras insaturés et de la présence d'antioxydants naturels dans l'huile. Le but de ce travail est d'étudier la stabilité oxydative de huile d'olive vierge extraite à partir d'une des principales variétés tunisiennes à savoir la Chemlali de Sfax (60% de la surface oléicole), d'une part, et de la comparer à d'autres variétés, d'autre part. On se propose d'établir une corrélation entre les différentes caractéristiques d'huiles d'olives vierges: stabilité oxydative, composition chimique, teneur en antioxydants, présence d'éléments pro-oxydatifs, phénomène d'auto-oxydation et activité enzymatique oxydante et notamment la lipoxigénase. Une activité lipoxigénase a été détectée dans la pulpe d'olive. Cette enzyme est capable d'oxyder des acides gras polyinsaturés, principalement l'acide linoléique et l'acide linoléique, produisant des hydroperoxy-acides gras. Ces composés intermédiaires sont très réactifs et sont à l'origine de la rancidité de l'huile. Ce sont des précurseurs de composés volatils de type aldéhyde et alcool responsables de la note verte appréciée dans l'huile d'olive. Pour mieux comprendre le double rôle que joue cette enzyme, on a mis en évidence l'implication de la lipoxigénase dans la biogenèse des composés volatils à C6. On a aussi établi l'influence de cette enzyme sur le profil aromatique de l'huile. La stabilité oxydative de l'huile à différentes conditions de stockage a été suivie en mesurant l'acidité, l'indice de peroxyde et la variation de l'extinction spécifique à 232 nm. Dans ce contexte, le rôle des antioxydants dans la stabilité oxydative de l'huile d'olive a été étudié. La qualité de l'huile d'olive est intimement liée à sa teneur en composés antioxydants phénoliques et autres qui contribuent à son goût particulier et à sa haute stabilité. Parmi ces composés, certains peuvent réduire l'effet oxydant de la lipoxigénase.

Caractérisation des huiles de quelques cultivars et types locaux tunisiens et de leurs clones sélectionnés

A. ECHBILI¹, I. RJIBA¹, S. DABBOU, N. GASA, A. YENGUI, H. BELGUITH, M. HAMMAMI¹ & A. TRIGUI²

¹ Faculté de Médecine de Monastir, Laboratoire de Biochimie, USCR Spectrométrie de Masse, Unité de Recherche Nutrition Humaine et Altération métaboliques, Tunisie. E-mail: mohamed.hammami@fmm.rnu.tn

² Institut de l'Olivier, BP1087, 3000 Sfax, Tunisie. E-mail: atroliv@hotmail.com; trigui.ahmed@iresa.agrinet.tn

L'huile d'olive est un aliment biologique aux qualités nutritionnelles confirmées. Il a été démontré qu'en plus de sa qualité organoleptique, elle a un intérêt indiscutable dans la prévention de certaines pathologies qui constituent des fléaux, notamment dans les pays développés (maladies cardio-vasculaires, cancer, ...). Cette propriété découle, d'une part, de sa composition en acides gras caractérisée par la prédominance de l'acide oléique et, d'autre part, des divers composés mineurs qu'elle renferme comme les polyphénols et les tocophérols. L'étude entreprise a consisté à déterminer la composition en acides gras et en triacylglycérols ainsi qu'en composés mineurs (polyphénols, vitamines et chlorophylles) des huiles extra-vierges de 37 variétés, clones et types locaux d'oliviers tunisiens implantés dans le Conservatoire National de l'Olivier de Boughrara (Sfax-Tunisie). L'analyse qualitative et quantitative par CGL des acides gras montre que seules les huiles de quatre variétés présentent des teneurs en acide oléique inférieures à la limite minimale (55%), fixée par les Normes Internationales, alors que douze variétés présentent des teneurs en acide palmitique situées dans les limites fixées à savoir 7,5 - 20%. La détermination de la composition en triacylglycérols par HPLC révèle que la meilleure composition glycéridique (teneurs élevées en trioléine (OOO), linodioléine (LOO) et palmitodioléine (POO) et teneur en trilinoléine (LLL) inférieure à 0,5%) est trouvée dans les huiles les plus riches en acide oléique et présentant des taux moyens en acide linoléique chez trois variétés ayant des teneurs en OOO supérieures à 34%. Pour les tocophérols, les huiles d'olive tunisiennes en contiennent des teneurs importantes allant de 246 à 597 ppm. L'analyse des polyphénols révèle la présence du tyrosol à des teneurs très variables allant de 0,03 à 43,47 ppm. La teneur en hydroxytyrosol varie de l'absence totale à 9,32 ppm. D'autres phénols comme l'acide 4-hydroxybenzoïque, l'acide p-hydroxyphényl acétique, l'acide vanillique, l'acide caféique, l'acide 3-hydroxybenzoïque et l'acide iso-vanillique sont aussi présents. Afin de valoriser ce patrimoine, l'approfondissement de l'étude des potentialités des variétés tunisiennes est envisagé pour les mêmes paramètres, en refaisant les mêmes analyses pendant trois campagnes oléicoles, sur le même site et sur les sites d'origine pour suivre la stabilité des caractères et déterminer l'impact des facteurs édapho-climatiques.

Bacteriocins produced by olive lactics and table olive quality

M.D. BRITO¹, A.M. DELGADO², L. CATULO¹, F. QUINTANS³
& C. PERES^{1,2,3}

¹ EAN/ INIAP Oeiras, Portugal

² ITQB Oeiras Portugal

³ ENMP/ INIAP Elvas Portugal

A table-olive fermentation roughly consists of three successions of spontaneous populations: *Enterobacteriaceae*, then yeasts and lactic acid bacteria and finally *Lactobacillus*. *Lactobacillus plantarum* LB17.2b and *Lactobacillus pentosus* LBB96 are bacteriocin producers (antimicrobial proteins) that were isolated during the fermentation of 'Azeiteira' variety. The fruit can be harvested at its maximum size, and be processed by the so-called "sevillian style", or after the development of some pulp colour and aroma and be processed by the so-called "natural style". Because of the complexity of such environments, the olive fermentation process is far from being characterized. Although, the role of bacteriocins in food environments is still not clear, they are expected to improve food safety. Bacteriocin production depends on medium composition (Yang & Ray, 1994) and on physical factors (Leroy & De Vuyst, 1999). In this study, the effect of brine components on the growth and on bacteriocin production was compared for LB17.2b and LBB96. Figures were based in brine composition along 'Azeiteira' fermentation that was monitored by HPLC. Bacterial growth (g/l dry weight) was calculated from DO and bacteriocin production was evaluated after the inhibition zone caused by the culture supernatant over a sensitive bacteria. In a first step, some variables were screened in MRS-based formulation. Differences between strains were observed. Best growth and bacteriocin production in brines also occurred under different conditions for each strain, denoting environmental selection pressures. Thus, bacteriocins can be produced in brines at different stages of the fermentation contributing to food safety by inhibiting spoilage and pathogenic bacteria.

Conditions de trituration des olives dans la plaine de Tadla et analyse comparative des sous-produits de quelques huileries

Z. DROUSSSI¹, M. BEN SALAH¹, M. HAFIDI² & A. OUATMANE¹

¹ Laboratoire d'Analyse et Valorisation des ressources environnementales, BP: 523, FST Beni-Mellal

² Unité sol et environnement, Fac. Sci. Semlalia, Marrakech
Auteur correspondant, courriel: ouatmane@fstbm.ac.ma

La production de l'huile d'olive dans la région de Tadla Azilal couvre environ 18% de la production nationale. À l'échelle régionale, ce secteur joue un rôle économique d'une grande importance et attire de plus en plus d'investissements. Le nombre croissant des huileries dans la région notamment les unités modernes à caractère industriel incite cependant à une réflexion profonde sur l'évidente problématique des déchets de cette industrie ainsi que sur la nécessité de leur recyclage et/ou leur traitement. Le présent travail fait partie d'un large programme de recherche scientifique (projet PROTARS D16/22) sur la valorisation des sous-produits des olives. Dans un premier temps, il s'est consacré à l'étude des conditions de trituration des olives et à l'analyse comparative des déchets qui en découlent. Ainsi, 34 unités dont 13 sont de type traditionnel (UT) et 21 de type moderne à semi-moderne (UM), relevant de la zone d'action de la DPA de Beni-Mellal et de l'ORMVAT, ont été retenues pour cet objectif. Les résultats obtenus ont mis en évidence une très grande hétérogénéité des conditions de trituration notamment en ce qui concerne la préparation des olives, leur entreposage et leur broyage. L'hétérogénéité est aussi observée dans la composition biochimique et physico-chimique des déchets produits par ces huileries. Dans les unités traditionnelles, utilisant l'énergie animale, les quantités triturées sont trop modestes soit 5 à 12 qx/j, le temps de broyage et le pressage sont très lents et prennent plusieurs heures (plus de 6 heures) comme ils sont parfois répétés deux à trois fois de suite. La durée d'entreposage est, par contre, relativement courte soit 2 à 6 jours en général. Les déchets solides (grignons) obtenus ont un pH de 5 à 5,5, des teneurs élevées en eau (35 à 60%) et en noyaux ligneux grossiers soit 60 à 78% en moyenne. Aussi, ils présentent des teneurs relativement élevées en lipides résiduels extractibles à l'hexane à chaud soit 15 à 24%. Les effluents liquides (margines) générés par ce type d'unités ont un pH d'environ 5, des teneurs en matière sèche oscillant entre 10 et 26% et une DCO comprise entre 300 et 700 mg/l. Dans les unités semi-modernes où on utilise l'énergie électrique ou des moteurs à gasoil, le broyage se fait une seule fois et dure 1/2 à 2 heures alors que le pressage prend environ 30 mn ou, 4 à 6 heures lorsque la montée en pression est manuelle. Les quantités broyées par jour sont de l'ordre de 2 à 8 tonnes selon les unités, mais le temps d'entreposage reste long étant donné le caractère industriel de cette catégorie d'unités. Les grignons produits sont, par contre, plus fins et plus secs: le % en noyaux ligneux grossiers est de l'ordre de 30 - 60% et les teneurs en eau ne dépassent pas 35 à 40%. Ces grignons sont moins riches en lipides résiduels (11 à 22%) alors qu'ils présentent des teneurs en azote total Kjeldahl comparables à celles de grignons des UT (7 à 13 g/kg). Les margines produites ont en moyenne plus ou moins les mêmes valeurs de pH, de charge en MS, de DCO, d'azote total et de cendres que ceux des UT. D'autre part, l'analyse des grignons et des margines au début (mi-octobre), en pleine campagne (mi-décembre) et vers la fin de la campagne oléicole (fin février-début mars) n'a pas révélé de variations significatives.

Étude préliminaire concernant la présence de mycotoxines (aflatoxine B et ochratoxine A) dans des olives noires prélevées au Maroc

Chakib EL ADLOUNI¹ & Annie PFOHL-LESZKOWICZ²

¹ Université Chouaib Doukkali, Faculté des Sciences, El Jadida, Maroc

² Institut National Polytechnique de Toulouse, Lab Génie chimique UMR CNRS/INPT/UPS n° 5503, France

Après récolte lors du séchage et du stockage des olives, un certain nombre de moisissures, notamment des *Aspergillii*, sont capables de se développer et de produire de l'aflatoxine B (AFB) et/ou de l'ochratoxine A (OTA). Le développement de moisissures sur les olives peut être à l'origine d'une baisse de qualité nutritionnelle de l'olive puisqu'elles peuvent perturber la synthèse correcte des acides gras. D'autre part, les toxines susceptibles d'être formées sont particulièrement dangereuses puisqu'à long terme elles peuvent engendrer des cancers du foie ou des voies urinaires. Une partie des toxines formées sur les olives passe dans l'huile. Dans cette étude, 4 lots d'olives achetés directement aux producteurs sur le marché ou bien en supermarché au Maroc ont été analysés. Les mycotoxines (AFB et OTA) ont été extraites simultanément en milieu acide, puis séparées par chromatographie liquide haute performance (HPLC) couplée à un fluorimètre. Les 4 lots d'olive contenaient de l'AFB de quelques ng/kg à quelques µg/kg. Un lot d'olive contenait aussi de l'ochratoxine A. La présence simultanée de ces 2 toxines augmente les risques toxiques. Il est donc indispensable d'avoir une bonne maîtrise de la conservation des olives après récolte.

Cold storage of 'Coratina' olives in air and controlled atmosphere

G. COLELLI¹, M.L. CLODOVEO² & G.L. MONTEL¹

¹ PRIME dept, University of Foggia, g.colellil@unifg.it; g.montel@unifg.it

² PROGESA dept, University of Bari, clodoveo@agr.uniba.it

Pre-processing storage of olives for oil production represents a key point in order to obtain a product with high quality attributes. Mechanical damages on fruits together with a high presence of decay agents determines a dramatic reduction of initial quality attributes. Main problems are associated to an increase in free fatty acid content and in their oxidation, which in turn leads to a lower shelf life and appearance of rancid odour and flavour. 'Coratina' is a very popular olive variety for processing in southern Italy; oil obtained from this variety is known to be very resistant to oxidation, thanks to the very high content in antioxidant components. The effect of cold storage and controlled-atmosphere (CA) conditions is described in this paper. After 45 days at 5°C in 2% O₂ olive fruits showed a better appearance and a lower respiration rate compared to fruit exposed to air either at 5 and 20°C. No decay was observed on all treatments, although oil produced from fruit held at lower temperatures presented better characteristics, in terms of acidity and oxidation state, compared to fruit stored at 20°C. The effects of low temperature resulted more important than the effect of atmosphere modifications.

Mycoflore des Maâsra marocaines. Toxinogénèse des souches isolées d'*Aspergillus flavus* et d'*Aspergillus niger*

G. SALIH, A. TANTAOUI-EKARAKI, K. LAMRANI¹, M. ISMAILI-ALAOUI¹,
M. CHEHEB¹, H. HASSOUNI¹, B. RIO², I. GAIME-PERRAUD², C. AUGUR²
& S. ROUSSOS²

¹ Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Laboratoire des Bioconversions, BP. 6202-
Instituts, Madinat Al Irfane, 10101 Rabat, Maroc

² IRD, UR-119 Biotechnologie Microbienne Post Récolte; IFR-BAIM, ESIL Case 925; 163,
Avenue de Luminy; F-13288, Marseille cedex 9, France

50 échantillons d'olives, de grignons d'olive et des margines ont été prélevés des différentes maâsras au Maroc durant la campagne 2003-2004. L'analyse mycologique de ces échantillons a permis d'isoler 122 souches à prédominance des souches mésophiles (69%) et des souches thermophiles (31%). Au sein des souches mésophiles, 9 genres ont été identifiés: *Aspergillus* (32%), *Penicillium* (31%), *Geotrichum* (11.7%), *Mucor* (10.9%), *Rhizopus* (7.1%), *Trichoderma* (3.6%), *Alternaria* (1.2%), *Acremonium* (1.2%) et *Ulocladium* (1.2%). Parmi les 38 souches de champignons filamenteux thermophiles isolées, seulement 12 souches ont été identifiées dont 10 souches appartiennent au genre *Rhizopus* et 2 souches d'*A. fumigatus*. Le pouvoir toxigène des souches isolées a été testé en utilisant une nouvelle technique qui consiste en un test rapide de criblage des moisissures aflatoxinogènes en les cultivant sur un milieu gélosé dont la composition est la suivants: PDA + 0.3% méthyl- β -cyclodextrine + 0.6% Désoxylate de sodium. Nous avons testé toutes les souches mais malheureusement les résultats que nous avons obtenu ne nous ont pas permis de tirer les conclusions souhaitées. Au sein du genre *Aspergillus*, trois espèces ont été identifiées: *A. niger* qui est la plus dominante (16 sur 28 souches), *A. flavus* (6 souches) et *A. fumigatus* (5 souches). Toutes les souches d'*A. flavus* et d'*A. niger* ont été testées pour leur pouvoir à produire sur milieux favorables, respectivement de l'aflatoxine et de l'ochratoxine A. 4 souches d'*A. flavus* ont produit l'aflatoxine B1 sur milieu à base de riz à des quantités allant de 48 à 92 $\mu\text{g}/\text{kg}$ et 14 souches d'*A. niger* se sont avérées plus ou moins productrices d'ochratoxine A sur milieu à base de blé: les quantités produites varient de traces jusqu'à 276 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Cependant, la capacité de ces souches à produire de mycotoxines directement sur les olives et/ou les grignons d'olive n'a pas été testée.

Mots-clés: Mycoflore - *Aspergillus* - *Penicillium* - *Geotrichum* - Maâsra - Olives - Huile d'olive - Mycotoxines - Aflatoxines - Ochratoxine A - Immuno-affinité - HPLC.

Contribution à l'étude de l'oxydation de l'huile d'olive vierge extra, traitée par filtration par gravité et sous pression

K. CHAARI¹ & S. SAYADI²

¹ Institut Supérieur Technologique de Sfax - Route de Mahdia Km 2.5 El Boustan BP 88 A-3099 -Sfax -Tunisie

² Laboratoire des Bioprocédés, Centre de Biotechnologie de Sfax, BP « K », 3038 Sfax, Tunisie
Auteur correspondant, courriel: sami.sayadi@cbs.mrt.tn

En Tunisie, l'oléiculture requiert une importance primordiale, voire fondamentale, aussi bien sur le plan social qu'économique. En effet, l'huile d'olive vierge extra se situe au premier rang des produits agro-alimentaires exportés (environ 40% des exportations agricoles), ce qui nécessite l'amélioration de ses qualités organoleptiques. En tenant compte de l'importance de plus en plus accordée à l'huile d'olive, les travaux de recherche n'ont cessé de s'intensifier afin de déterminer les moyens permettant d'améliorer sa qualité. Les travaux menés ont montré qu'elle est influencée par plusieurs facteurs dont le mode de transformation des olives et de clarification des huiles. Dans ce contexte, le présent travail a pour objectifs d'étudier, d'une part, l'effet de différents agents de filtration (coton, perlite et combinaison de ces deux agents) sur la qualité de l'huile d'olive. D'autre part, on a essayé d'étudier l'effet de l'oxydation à deux températures (60°C et 100°C) sur les produits de la filtration en fonction du temps. L'étude a été complétée, par la suite, par le suivi de la cinétique et l'évolution du comportement des agents de filtration sur les caractéristiques de l'huile d'olive. Les résultats obtenus montrent que la filtration par gravité ou sous pression permet de clarifier l'huile et d'éliminer certaines impuretés (traces de margines, eau, chlorophylles et polyphénols). Ces procédés permettent, aussi, d'éliminer certains composés essentiels et produits de stabilisation des huiles (antioxydants, acides gras essentiels, etc.). Des essais de vieillissement accéléré des huiles à des températures de 60°C et 100°C ont permis d'étudier le comportement des huiles par la détermination des indices caractéristiques comme les indices d'iode, de peroxydes et d'extinction spécifiques.

Mots-clés: Huile d'olive - Filtration - Qualité - Vieillissement - Antioxydants - Indice d'iode.

The influence of the extraction methods on antioxidant content in virgin olive oil

G. LACERTOSA, E. TRAMONTANO, E. ACITO, A. PETROZZA & F. CELLINI

Metapontum Agrobios S.S. 106 km 448,2 Metaponto (MT) - Italy
Corresponding author, e-mail: glacertosa@agrobios.it

The levels of antioxidants depend on several factors such as the variety of olive used, the cultivation environment and the method of oil extraction. Phenolic antioxidants strongly affect shelf life, sensory and nutritional olive oil quality. Furthermore, in the last years is increasing the interest on the health benefits of the Mediterranean diet and of olive oil. For these reasons recently, interest in producing olives oils containing higher levels of polyphenols. This research was conducted during 2003 comparing monovarietal olive oils, from three different varieties (Maiatica, Coratina and Ogliarola), obtained with a three phase decanter and with a two phase decanter with destoned olives. Acidity, ultraviolet light absorption, peroxide value, total polyphenols, tyrosol, hydroxytyrosol, α -tocopherol and fatty acid composition were determined. The research results indicated that destoned oil content, compared to the traditional one, is lower in peroxide and higher in total polyphenols and hydroxytyrosol contents. Acidity and fatty acid composition were not affected by the extraction method.

Valorisation de la production oléicole dans le Tafilalet. Expériences et perspectives d'avenir

Moha CHAOUCHAOU

ORMAVA du Tafilalet, BP 17, Errachidia

Dans le Tafilalet, l'olivier constitue la deuxième espèce arboricole après le palmier dattier, avec un effectif de 1.120.000 pieds et une production moyenne annuelle de 13.000 tonnes. Le secteur oléicole offre en moyenne 1,5 Millions de journées de travail par an. Ainsi, compte tenu de l'intérêt de cette culture dans la vie des populations locales et pour satisfaire aux conditions de commercialisation de l'huile d'olive aussi bien à l'échelon international (normes fixées par COI) que national (arrêté de 1997) et protéger le consommateur qui devient de plus en plus exigeant, il est devenu non seulement nécessaire mais impératif de produire une huile d'olive de qualité recommandée. Conscient de l'importance de l'enjeu, l'ORMVA du Tafilalet a multiplié ses efforts au profit du secteur par le renforcement des actions d'encadrement de proximité portant essentiellement sur (i) la sensibilisation des agriculteurs sur le mode et la date de récolte des olives (ii) l'amélioration des techniques de trituration au niveau des Mâasra traditionnelles et (iii) l'introduction de micro-huileries. L'approche de la mise en œuvre de ces actions se base sur l'implication et la participation de la population cible, le renforcement de l'esprit de partenariat avec l'ensemble des intervenants dans ce domaine et par la formation multidisciplinaire des vulgarisateurs. S'agissant des actions futures, l'ORMVA du Tafilalet a signé une convention avec l'IAV HASSAN II portant sur (i) la détermination de la date optimale de récolte des olives par zone (ii) la restructuration et la modernisation des Mâasra traditionnelles et (iii) la valorisation des grignons d'olives. Toutefois, compte tenu du nombre élevé des Mâasra (488), de la vétusté du matériel qui y est utilisé, du niveau technique des propriétaires des Mâasra, il y a lieu de renforcer et d'assurer la continuité des actions programmées et ce dans le cadre d'un partenariat participatif avec les différents acteurs de développement locaux, nationaux et internationaux.

Effect of genotype-environment interaction on chemical characteristics of virgin olive oil

S. BEN TEMIME ¹, L. ABAZA ¹, B. BACCOURI ¹, W. TAAMALLI ¹,
N. BEN YOUSSEF ¹, D. DAOUD ¹ & M. ZARROUK ¹

¹ Laboratoire de Caractérisation et Qualité de l'Huile d'Olive, INRST B.P.95 - 2050 Hammam-Lif, Tunisia

Corresponding author, e-mail: mokhtar.zarrouk@inrst.rnrt.tn

The aim of this work was to study differences in quality and chemical composition of virgin olive oils produced from Chétoui olive cultivar over four consecutive crop seasons, taking the nature of the soil and the climatic conditions into consideration. For that purpose, olives at the same stage of maturation; sampled in different production areas in the north of Tunisia; were harvested for oil extraction and analysis. Several analytical determinations were made: quality indices as defined by EU Regulations (free fatty acid content, peroxide value and spectrophotometric characteristics in the UV region); parameters involved in oxidation processes (oxidative stability, total phenols, o-diphenols, tocopherols, chlorophyll and carotenoids pigments); fatty acids and volatile compounds. The obtained results showed that the majority of the analytical quality parameters and the flavour of the oils were greatly influenced by the origin zone, i.e., by the climatic and pedologic factors of the production environment, mainly the cumulative rainfall in the case of phenolic compounds and o-diphenols. Moreover, The amounts of phenols and o-diphenols showed a good correlation with stability

Changes in olive oil quality according to genetical and environmental factors

L. ABAZA ¹, W. TAAMALLI ¹, S. BEN TEMIME ¹, A. ALLALOUT ¹
& M. ZARROUK ¹

¹ Laboratoire de Caractérisation et Qualité de l'Huile d'Olive, INRST B.P.95 - 2050 Hammam-Lif, Tunisia
Corresponding author, e-mail: mokhtar.zarrouk@inrst.rnrt.tn

Olive oil composition and quality are the result of several factors including the cultivar, the pedoclimatic conditions and the production practice. The aim of the present work is to investigate the effects of botanical and geographical origins on olive oil chemical characteristics of some local and introduced varieties in Tunisia. Some chemical parameters were studied mainly fatty acid composition, triacylglycerol molecular species, phenolic and tocopherolic compounds.

Variability of olive oil quality as related to cultivar and agronomic factors in sicily

A. MOTISI¹, G. CAMPISI¹, T. CARUSO¹, L. CATAGNANO², R. SACCHI³,
M L. AMBROSINO³ & C. FINOLI⁴

¹ Dipartimento di Colture Arboree, University of Palermo, Viale delle Scienze 11, 90128 Palermo, Italy

² Assessorato Agricoltura e Foreste Regione Siciliana U. O. 112 - Via Ovidio 26, 92019 Sciacca (Ag).

³ Dipartimento di Scienze degli Alimenti, University of Napoli, Via Università 100, 80055 Portici, Italy

⁴ Dipartimento di Ingegneria e Tecnologie Agro-Forestali, University of Palermo - Viale delle Scienze, 11 - 90128 Palermo, Italy

In Sicily the olive oil industry is based on 9 cultivars namely: Biancolilla, Cerasuola, Nocellara del Belice, Giaraffa, Tonda Iblea, Moresca, Nocellara Etnea, Ogliarola. Santagatese. Each of these cultivars is grown in a different area of the Island and, consequently, contributes to a large extent to characterize their olive oil, from the organoleptic and chemical point of view. For this reason, recently the Sicilian local government submitted to the European Union the proposal to established 9 different DOP (Protected Denomination of Origin). Since each DOP area extends over a wide range of environmental and edaphic conditions, a large degree of variation on olive oil quality can still be expected. For this reason, in three of the major DOP areas of West-Sicily ("Valli Trapanesi", "Valle del Belice" and "Val di Mazara"), for three consecutive years, has been carried out an investigation to study the variability of olive oil quality as related to cultivar, location of the olive grove and orchard management. From a methodological point of view, it has been decided to include in the study only oil samples that conformed to a well defined set of fruit sanity, harvest criteria and oil extraction aimed to maximize oil quality and, hence, explore the oil quality potential of those production areas. Olive oil quality was affected, in order of importance, from the cultivar, the degree of maturation and the location of growing. Discriminant analysis on fatty acid oil composition was able to identify the various cultivars of the monovarietal oils; blended oils were identified on the basis of the main cultivars that entered its composition; within cultivar, oils could be discriminated by site of production. Since in the DOP areas investigated olive trees are older than one century, even if the varietal composition has been ascertained, the presence of local clones cannot be excluded. For this reason whether this effect is related to environmental or genetic factors, deserves further investigations.

Keywords: Olive - Cultivars - Quality - DOP - Multivariate analysis

Presentation of a EU Programme on the integrated approach to sustainable olive oil and table olives production (INASOOP)

C. ISRAILIDES¹, P. GALIATSATOU², D. ICONOMOU¹, E. STEFANOUDAKI³,
A. KOUTSAFTAKIS³, A. ARAPOGLOU¹, TH. VARZAKAS⁵, S. PANAGOU²,
N. CHRISTOPOULOU¹ & A. VLYSSIDES⁴

¹ Institute of Biotechnology of Agricultural Products, NAGREF, 1, Sof. Venizelou Str. 14123, Lycovrissi, Greece, tel. (+30)2102852521, fax (+30)2102852523. E-mail: cisrailides@nagref.gr

² Institute of Technology of Agricultural Products, NAGREF, 1, Sof. Venizelou Str. 14123, Lycovrissi, Greece, tel. (+30)2102845940-2, fax (+30)2102840740. E-mail: gal.itap@nagref.gr

³ Institute of Olive Tree and Subtropical Plants, Agrokipio 73100Chania, Greece.

⁴ National Technical University of Athens, Department of Chemical Engineering, 9, Heroon Polytechniou, 15770, Greece.

⁵ Hellenic Food Safety Authority, 5, Karystou 11323, Ampelokipi, Greece.

The European Union is the world's largest producer of olive oil (84%) and table olives (40-45%), employing more than 800,000 people in this sector and about 600 companies. However, both industrial activities generate highly polluting residues (more than 10 million tons from olive oil and about 1 million tons from table olives annually) which pose serious problems to the involved companies. Faced with strict environmental legislation many of these companies will be forced to close in the next years unless they adopt an environmentally sound solution for their wastes. The purpose of this programme is to develop harmonized European environmental quality standards (EQS) for both olive oil and table olives production and to provide the necessary support to the EU olive growers for meeting them.

Comparaison technico-économique de l'unité mobile avec les autres unités de trituration des olives au Maroc

M. ISMAILI-ALAOUI ¹, N. AKESBI ¹, N. ELYASSAMI ¹ & O. ZEMRANI ¹

¹ Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, BP 6202-Instituts, Madinate Al Irfane, 10101 Rabat, Maroc
Aueur correspondant, courriel: m.ismaili@iav.ac.ma

L'enquête réalisée lors de l'expérimentation de l'unité mobile dans la région de Tafilalet a permis de ressortir la comparaison technico-économique suivante:

- L'unité mobile permet de valoriser la production des olives en produisant une huile d'olive qui répond à la norme du Conseil Oléicole International. Cette huile est de qualité « extra-vierge ». De même, l'unité a amélioré la capacité journalière de trituration ainsi que les rendements d'extraction. Les unités modernes permettent de triturer une grande quantité de production. Elles permettent de produire une huile de bonne qualité. Mais, elles ne sont pas accessibles aux petits agriculteurs qui vivent dans des oasis marginales et qui génèrent l'essentiel de la production des olives de la région. En ce qui concerne les unités semi-modernes, malgré leurs importantes capacités par rapport aux Maâsra traditionnelles, elles produisent des huiles d'olive de mauvaise qualité physico-chimique et organoleptique. Quant aux unités traditionnelles, elles constituent l'essentiel des infrastructures de trituration présentes au niveau de la zone. Elles sont caractérisées par un processus de transformation traditionnel qui entraîne de nombreuses pertes sur le plan quantitatif et qualitatif.
- L'unité de trituration mobile permet d'accéder facilement aux zones enclavées. Ce critère permet d'améliorer le revenu des agriculteurs en réduisant le coût de transport des olives. Ceci n'est pas le cas pour les autres unités. En plus, le caractère rapide de l'unité mobile dans son processus de transformation permet de dégager du temps libre qui sera exploité par les agriculteurs au niveau de leurs exploitations. La Maâsra mobile permet aussi de générer des marges assez importantes par rapport aux unités semi-modernes et traditionnelles. Cependant, elle ne peut pas atteindre celles qui sont dégagées par les unités modernes. Toutefois, la comparaison des coûts de production d'un litre d'huile montre que celui qui est dégagé par l'unité mobile est le plus rentable parmi l'ensemble des coûts des autres unités de trituration.

Composting two-phase olive pomace (“alperujo”) and testing the agricultural potential of the resulting compost

J. CEGARRA, J.A. ALBURQUERQUE, A. ROLDAN & G. TORTOSA

Department of Soil and Water Conservation and Organic Waste Management, Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura, CSIC, P.O. Box 164, 30100 Murcia, Spain.
Tel.: +34-968-396313. Fax: +34-968-396213.
Corresponding author, e-mail: jcegarra@cebas.csic.es

Increasing introduction of the two-phase centrifugation system for olive oil extraction during the early nineties in Spain has led to the generation of nearly four million tons per year of a new solid olive-mill by-product (two-phase olive pomace), which is called “alperujo” (AL) in Spanish. It is rich in potassium and organic matter, slightly acidic and have a high moisture content. As composting was considered a suitable alternative for the AL agricultural disposal, experiments were conducted to perform the process by evaluating different bulking agents and the most suitable aeration technology (either forced ventilation assisted by mechanical turning or only mechanical turning of piles). The results showed that the composting performance was decisively influenced by the characteristics of the bulking agents added to AL as well as the process completed in less time when forced ventilation was coupled to mechanical turning. However, the recommended method for composting AL was mechanical turning without forced aeration since the composition of the end-product in this case was comparable to the composted AL using forced ventilation and there were also substantial economical savings by selecting mechanical turning alone. The agricultural test of the resulting AL compost demonstrated its capacity to stimulate plant yield, but its low mineralisation rate resulted in low nitrogen availability which caused less plant growth and nutrient uptake. Also, when it was compared with a cattle manure and a sewage sludge compost for soil amendment, the soil organic matter content remained almost unchanged in the AL-amended plots after cultivation, whereas it was significantly reduced when the other organic fertilizers were used.

Co-composting of sludge from olive oil mill wastewater mixed with tree cuttings

N. SENESI¹, C. PLAZA², G. BRUNETTI¹ & D. MONDELLI¹

¹ Dipartimento di Biologia e Chimica Agroforestale ed Ambientale, University of Bari, Bari, Italy

² Centro de Ciencias Medioambientales, CSIC, Madrid, Spain

The sludge residue from olive oil mill wastewater (OMW) evaporated in natural conditions in an open-air lagoon was co-composted with tree cuttings (TC) in two mixtures, 48% of OMW sludge + 52% of TC (M1, C/N ratio, 30), and 58% of OMW sludge + 42% of TC (M2, C/N ratio, 26). The evolution and modification of properties occurring in the OMW sludge-TC mixtures at different stages of the composting process were evaluated by chemical analyses, including pH, electrical conductivity and contents of total organic C, total N, total extractable C and humified C fractions. Further, HAs were isolated from the mixtures by a conventional procedure based on alkaline extraction, acidic precipitation to pH 1, purification by repeated alkaline dissolutions and acidic precipitations, water washing, dialysis, and final freeze-drying. The HAs obtained were analysed for elemental (C, H, N, S, O) and acidic functional group (carboxylic and phenolic) composition, and by ultraviolet/visible, Fourier transform infrared, fluorescence and electron spin resonance spectroscopies. Composting of the OMW sludge-TC mixtures resulted in an increase of pH and total N, ash and humified C contents, whereas electrical conductivity and total organic C, total extractable C and NH_4^+ -N contents and C/N ratio tended to diminish. At the initial stage of composting, HAs from the OMW sludge-TC mixtures were characterized by a marked aliphatic character, small O and acidic functional group contents, marked presence of proteinaceous materials and partially modified lignin moieties and polysaccharides-like structures, extended molecular heterogeneity, small organic free radical contents and small degrees of aromatic ring polycondensation, polymerisation and humification. With increasing the composting time, a loss of aliphatic materials and carbohydrates, and an increase of oxygenation, acidic functional groups, S- and N-containing groups and aromaticity occurred in HA fractions. Chemical and physico-chemical analyses of the two OMW sludge-TC mixtures and their HA components at the end of composting indicated that an adequate degree of maturity and stability was achieved by both end-products, and especially for the one obtained from mixture M2.

**Biotechnological composting olive oil mill wastewaters
and residues for mediterranean sustainable
agriculture (COMPAMED)**

G. RANALLI¹, G. ALFANO¹, C. BELLI¹, G. LUSTRATO¹, E. ZANARDINI²
& C. SORLINI²

¹ DISTAAM, University of Molise, Via De Sanctis. 86100 Campobasso, Italy.

² DISTAAM, University of Milan, 20123 Milano, Italy.

The studies and field experiences carried out (AIR3-CT94-1987 "BIOWARE"; FAIR-CT97-3620 "HUSK") intend to contribute to solve the question of the olive oil milling wastewater (OOMW) and olive humid husk residues (OHH), recycle in agriculture of organic mature composted products by biotechnological composting process (BCP) applicable in MC countries. COMPAMED suggest, by olive-oil filiere innovation, a biological remedy for water saving, to re-use of polluted OOMW, to reduce pressure on freshwaters, to mitigate the impact of climate change in arid-semiarid environment and enhance sustainable agriculture development in the Mediterranean area. We proposes to apply advanced biotechnological composting process for the treatment of all final OOMW by-products and intend to offer a adaptations of the technology to the specific environmental conditions to the regions involved, at very low energy consuming and consequently with high economical benefits. More, the final results will contributes to the achievement of an effective regional planning and management of water resources under scarcity, improvement of co-ordination, dissemination of research and development of composting pilot plants.

Biocontrol of fungal phytopathogens by two phase olive husks residues biotechnological composted.

G. Ranalli ¹, G. Alfano ¹, C. Belli ¹, G. Lustrato ¹ & G. Lima ²

¹ DISTAAM, University of Molise, Via De Sanctis. 86100 Campobasso, Italy.

² SAVA, University of Molise, Via De Sanctis. 86100 Campobasso, Italy.

Composting of olive humid husk residues (OHH) permit the degradation of toxic compounds of the organic fraction of OOMW including sugar, lipids, pectins, tannins, polyphenols and aromatic compounds wich are also responsible for phytotoxic and antimicrobial effects in soil. The cured composted residues, when re-used in agriculture as eco-compatible, good quality organic amenders and fertilizers, can be potentially adopted as alternative products to control plant pathogens (bio-suppressive, bio-pesticide) in organic and integrated sustainable agriculture systems. The effects of inhibitory-suppressive activity of several OHH cured compost water extracts toward *Fusarium oxysporium* f.sp. *lycopersici* and 8 phytopatogenic fungi are reported.

Keywords: Olive humid husk residues - Composting - Bio-suppressive- Bio-pesticide.

Treatment of high organic and toxic strength effluents using the method of co-composting with organic residuals

Apostolos VLYSSIDES¹, M. LOIZIDES, Elli Maria BARAMPOUTI¹
& Sofia MAI¹

¹ National Technical University of Athens, Department of Chemical Engineering, 9 Heroon Polytechniou Str., Zografou Campus, Zographou 157 00, Athens, Greece.
Tel.: +302107723268, Fax: +302107723269
Corresponding author, e-mail: avlys@tee.gr

In this work a new approach of industrial wastewater treatment is presented using the method of co-composting with organic industrial or agricultural solid residuals. The concept of this approach is based on the continuous replacement of the aerobically digested organic carbon and the evaporated moisture, that were lost during the composting of an organic solid material, by the organic carbon and water content of a wastewater respectively. Theoretically, for effective bioreduction of organic pollutants, any mixture of wastewater with organic solids under controlled temperature, oxygen and moisture, in a continuously stirred bioreactor, has a critical solid-liquid feeding ratio in relation to the retention time of the solids in the bioreactor. The excess water is evaporated by the biological respiration procedure. The feasibility of the total process depends on the characteristics of the substrates and the conditions of the co-composting. The substrate toxicities and nutrients deficiency can be overcome by the biological synergy of both substrates and by the high temperature (60-75°C) that could be reached in a composting system. The final product, after proper maturation, could be in a marketable soil condition. This concept was applied on the olive oil mill solids and liquid wastes in a pilot scaled continuously stirred bioreactor. All parameters that affected co-composting were completely controllable. The results, that are presented, have shown that the co-composting of high strength and toxic industrial wastewater with organic solid residuals can be an efficient and feasible method of treatment.

Keywords: Co-composting - Olive oil mill wastewater OMW - Olive stone waste residues OSWR

Évolution des polyphénols et de la phytotoxicité au cours du co-compostage des boues de margines

Nozha ABID¹, Abdelhafidh DHOUIB¹, Fathi ALOUI¹, Michel PENNINCKX² & Sami SAYADI¹

¹ Centre de Biotechnologie de Sfax. Laboratoire des bio-procédés. BP « K » ,3038, Sfax, Tunisie.

² UPEM, Université Libre de Bruxelles, 642, Rue Engeland 1180 Bruxelles, Belgique
Auteur correspondant, courriel: sami.sayadi@cbs.mntr.tn

Les pays méditerranéens producteurs d'huile d'olive sont confrontés aux problèmes de la production des margines qui sont toxiques à cause de leur forte richesse en composés phénoliques. Les traitements physico-chimiques des margines (évaporation, décantation, coagulation, floculation, ultrafiltration) engendrent des quantités importantes de boues riches en polyphénols qu'il faudrait traiter. On a entrepris la technologie du co-compostage pour valoriser ces boues de margines et étudier le devenir des fractions polyphénoliques. L'étude à l'échelle laboratoire a permis de choisir des agents structurants locaux bon marché et d'optimiser le taux d'incorporation des boues dans le mélange à composter. La mise en œuvre d'un compostage à l'échelle semi-industrielle a permis d'obtenir, après 4 mois de compostage, un produit fini conforme aux normes. L'étude de la bioconversion de la fraction polyphénolique montre que les polyphénols peuvent jouer le rôle de précurseurs pour la synthèse des acides humiques. L'évaluation du pouvoir fertilisant du compost réalisée sur des cultures de tomates en champ montre que la croissance ainsi que le rendement des plantes cultivées sur le sol amendé par ce compost et le fumier sont similaires.

Mots-clés: Margines - Boues - Compostage - Polyphénols - Acides humiques.

Pilot plant operation of a novel system of oil milling wastewater using the Fenton method and recycling of byproducts in agriculture

Apostolos VLYSSIDES¹, Cleanthes ISRAILIDES², Charalampos LOUKAKIS¹,
Sofia MAI¹, Elli Maria BARAMPOUTI¹, Dimitris ARAPOGLOU²
& Maria DROUKA

¹ National Technical University of Athens, Department of Chemical Engineering, 9 Heroon Polytechniou Str., Zografou Campus, Zographou 157 00, Athens, Greece. Tel.: +302107723268, Fax: +302107723269

² Institute of Technology of Agricultural Products. National Agricultural Research Foundation (NAGREF). 1, Sof. Venizelou St., Lycovrissi 14123, Athens, Greece.
Corresponding author, e-mail: avlys@tee.gr

Olive oil production is associated with extremely polluting byproducts causing serious environmental problems in most Mediterranean countries. Strict EU environmental legislation could force the olive oil mills to close unless a viable and environmentally sound solution is adopted. This paper reports on an integrated viable solution to the olive mill waste (OMW) problem that can be implemented on a large scale. The method involves an oxidation step of the wastewater using the Fenton process with a parallel production of a high quality compost, which can be used as soil conditioner. Results from two pilot plants which have been operated using the above mentioned methodology are discussed.

Comparaison de certains paramètres physico-chimiques et de la charge phénolique des margines. La mise en place d'une solution de détoxification est-elle envisageable ?

Siham HANIFI¹, Majdouline BELAQZIZ¹, Abdelaziz ABBAD¹
& Ismaïl EL HADRAMI¹

¹ Équipe Biotechnologies et Physiologie Végétales, Département de Biologie, Faculté des Sciences Semlalia, B.P. 2390, 40 000 Marrakech, Maroc

Auteur correspondant, courriel: hadrami@ucam.ac.ma

Le secteur oléicole représente une activité fort importante dans les pays du pourtour méditerranéen, mais c'est aussi la source d'une pollution de plus en plus croissante. L'industrie oléicole génère une quantité importante de déchets constitués de grignons (rejets solides composés de pulpe et de noyaux des olives) et de margines (effluents liquides de composition complexe). Les margines sont connues pour leur phytotoxicité liée en particulier à leur charge en phénols. Plusieurs études ont été et sont en cours pour remédier à ce problème et trouver une solution pouvant minimiser les effets nocifs de ces effluents. Les solutions devraient prendre en compte la diversité des margines qui dépend certainement d'une multitude de facteurs. C'est le cas notamment du processus d'extraction (huileries traditionnelles et modernes), du stade de maturité des olives traitées, des cultivars et des régions oléicoles. Aussi, l'objectif de ce travail est-il de montrer la diversité hautement importante de certains paramètres physico-chimiques et de la charge phénolique qualitative et quantitative de différents échantillons de margines collectés dans la région de Marrakech. Lorsque le pH des échantillons traités reste relativement identique (4.63 à 4.88), leur conductivité électrique varie de 11.24 mS.cm⁻¹ à 83.3 mS.cm⁻¹ soit un rapport de 7. En ce qui concerne la teneur en protéines solubles, il a été relevé que ce paramètre passe de 0.60 à 0.79. L'analyse des composés phénoliques par spectrophotométrie et par chromatographie liquide à haute pression a montré une variation fort intéressante aussi bien sur le plan quantitatif que sur le plan qualitatif. En effet, les teneurs en phénols totaux solubles varient de 2.96 g.l⁻¹ à 9.96 g.l⁻¹, alors que les fractions des phénols liés obtenus après hydrolyse acide passent de 0.23 g.l⁻¹ à 2.34 g.l⁻¹. Sur le plan qualitatif, des profils phénoliques complètement différents ont été trouvés montrant en plus l'abondance plus ou moins importante de certains composés comme l'hydroxytyrol, le catéchol, le méthylcatéchol, l'acide benzoïque, des dérivés p-coumarique et caféique et des flavonoïdes. Les différences relevées, plus particulièrement en termes de conductivité électrique (en rapport avec la salinité) et en composés phénoliques (indicateurs de la charge des margines en matière organique), rendent compte de la difficulté de la mise en place et de la standardisation d'une stratégie de traitement et de détoxification biologique et/ou chimique de ces sous-produits des huileries. Dans le présent travail, les difficultés de la standardisation d'une stratégie de traitement des margines seront discutées en se basant sur leur équipement phénolique variable sur les plans qualitatif et quantitatif.

Suivi des transformations des margines traitées par bio-procédé aérobie par chromatographie sur gel de sephadex

H. EL HAJJOUJI¹, N. FAKHARELINE¹, G. AIT BADDI¹, J.C. REVEL²
& M. HAFIDI¹

¹ Unité Sol et Environnement (labo. Éco-Végét.), Dépt. de Biologie, Faculté des Sciences Semlalia, BP: 2390, Marrakech, Maroc.

² Équipe Agronomie, Environnement et Éco-toxicologie, ENSAT-INP Toulouse, France.

Auteur correspondant: hafidi@ucam.ac.ma

Le traitement des margines a été effectué à l'échelle du laboratoire, sous différentes conditions physico-chimiques et en inoculant le milieu par les différentes souches de micro-organismes, en vue d'optimiser le procédé. Les échantillons prélevés à différents stades du traitement ont été successivement fractionnés par chromatographie sur gel de sephadex (G25, G75 et G100). Par la suite, les fractions obtenues ont été caractérisées par spectroscopies ultraviolet-visible et infrarouge (IRTF) ainsi que par le rapport E_4/E_6 . Le fractionnement des margines sur gel de sephadex a montré qu'elles sont constituées de fractions de poids moléculaires différents, indiquant ainsi l'hétérogénéité moléculaire de la structure de ces effluents. De plus, la disparition de la fraction retenue de faible poids moléculaire et l'augmentation de la fraction exclue, rapporté par la chromatographie aux stades finaux du traitement, indique l'augmentation de la polymérisation des sous-unités de faibles poids moléculaires (Ait Baddi *et al.*, 2004; Amir *et al.*, 2003; Hafidi *et al.*, 2004; Tomati *et al.*, 2000). L'analyse par IRTF ainsi que le rapport E_4/E_6 des fractions exclues et retenues des margines sur gel de sephadex G25, G75 et G100 ont montré qu'au cours du traitement aérobie, il y a une réduction des groupements aliphatiques au profit de l'enrichissement en structures aromatiques. Par conséquent, la caractérisation des margines par chromatographie sur gel de sephadex a pu mettre en évidence les mécanismes de formation des substances humiques lors de leur traitement aérobie et qui sont similaires au processus d'humification des sols. Ceci ouvrira une voie prometteuse pour la valorisation agricole des effluents liquides d'huileries d'olives.

Mots-clés: Margines - Traitement aérobie - Chromatographie sur gel de sephadex - Spectroscopie UV-visible - E_4/E_6 - Spectroscopie IRTF.

Références

- Ait Baddi G., Hafidi M., Ouattmane A. & Revel J-C. (2004) Caractérisation des acides humiques extraits lors du compostage des déchets d'huileries d'olives sur Gel Sephadex. *Agrochimica* Vol.XLVIII-N.1-2.
- Amir S., Hafidi M., Bailly J-R. & Revel J-C. (2003) Characterization of humic acids extracted from sewage sludge during composting and of their Sephadex gel fractions. *Agronomie* 23: 269-275.
- Hafidi M., Amir S. & Revel J-C. (2004) Structural Characterization of olive mill waster- water after aerobic digestion using elemental analysis, FTIR and ¹³C NMR). *Accepted in Process Biochem* Tomati U., Madejon E. & Galli E. (2000) Evolution of humic acid molecular weight as an index of compost stability. *Compost Science & Utilisation* 8: 108.

Étude comparative de trois technologies de culture cellulaire sur les margines

S. MDAGHRI ALAOUI¹, F.Z. EL HASSANI¹, F. ERRACHIDI¹, H. AISSAM¹ & M. BENLMILH¹

¹ Laboratoire de Microbiologie de l'Environnement, Faculté des Sciences Dhar El Mehraz, B.P: 1796 Atlas-Fès, Maroc

La province de Fès constitue le 1^{er} pôle de production d'huile d'olive au Maroc (42% avec 72 unités industrielles). Étant caractérisés par une concentration élevée en composés phénoliques toxiques, les eaux résiduaires de la trituration des olives appelées margines engendrent une pollution importante. Ceci a un impact très redoutable sur la qualité des eaux de l'Oued Sebou surtout quand elles sont destinées à l'alimentation en eau potable des villes et à l'irrigation. Dans cette étude, on a réalisé un traitement biologique des margines par 4 souches de champignons basidiomycètes (*Phanerocheate chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Picnoporus coccineus* et *Corioloopsis polysona*) en utilisant plusieurs technologies de culture cellulaire à savoir:

- La culture sur milieu solide (solide state fermentation).
- La culture sur milieu liquide (cellules libres et cellules immobilisées).

La souche *T. versicolor* immobilisée dans l'alginate de calcium a donné le meilleur rendement d'abattement de la DCO (85%) et de l'assimilation des composés phénoliques (79%). Les résultats des analyses microscopiques et biochimiques montrent une modification du comportement morphologique de la souche *T. versicolor* et une modification du comportement physiologique de la souche *P. chrysosporium*. Les deux autres souches (*P. coccineus* et *C. polysona*) présentent un comportement invariable quelque soit les conditions de culture cellulaire utilisée.

Mots-clés: Biotraitement - Champignons - Basidiomycètes - Immobilisation cellulaire - Morphologie et physiologie cellulaire.

La production des bactéries lactiques et leurs potentialités d'applications aux produits de l'olivier

M. HAMDI

Unité de recherche - Procédés Microbiologiques et Alimentaires, Institut National des Sciences Appliquées et Technologie (INSAT). BP 676, 1080 Tunis, Tunisie

La transformation des olives est une activité saisonnière et le stockage des fruits avant leur trituration pose un problème très important. La qualité des produits (olive de table et huile d'olive) est tributaire de la qualité du fruit et de son degré d'altération provoqué par les micro-organismes d'altération. En outre, cette industrie engendre les grignons et les margines, deux sous-produits riches en polyphénols. Ces derniers, qui sont utiles dans le fruit pour protéger l'huile, deviennent polluants lorsqu'ils sont rejetés dans l'environnement à cause de leurs caractères récalcitrant et antibactérien. Les bactéries lactiques sont capables d'hydrolyser d'autres molécules plus complexes comme les tanins et les polyphénols pouvant exister dans les olives et les produits de transformation. La fermentation lactique constitue une méthode sûre pour la conservation d'une large gamme d'aliments grâce aux bactéries lactiques qui contribuent à l'apport d'effets bénéfiques au niveau de l'inocuité des produits et de la santé humaine. Ces bactéries permettent d'éviter l'utilisation des conservateurs chimiques de plus en plus désapprouvés par les consommateurs. Les activités enzymatiques, impliquées dans la bioconversion de plusieurs composés de l'olive, devront élargir davantage les applications de ces bactéries lactiques dans ce secteur. Les résultats obtenus ici sur la fermentation lactique des olives de table, la décoloration des margines et l'amélioration de la qualité des huiles d'olive témoignent de l'importance de ces micro-organismes. L'application de ces bactéries passe par des étapes de sélection, de production et de conservation qui seront présentées.

Potentialité des bactéries pour la valorisation des margines d'olives. Cas d'une bactérie isolée d'un bassin d'évaporation de margines situé au Maroc

A. QATIBI¹⁻³, A. ELASLI², J. LORQUIN³, P.P. LIEBGOTT¹⁻³, R. BENNISSE¹
& M. LABAT³

¹ Microbiological Engineering Group, PO. Box 549, Faculty of Sciences & Techniques, Cadi Ayyad University, M-40 000 Marrakech Morocco. Tel +212 44 43 34 04 /+212 44 43 46 88 Fax + 212 44 43 31 70

² School of Science & Engineering. Al Akhawayn University PO. Box 1846, Ifrane, Morocco

³ Post-Harvest Microbial Biotechnology, Microbiology Laboratory IRD-UR119, IFR-BAIM, Universités de Provence et de la Méditerranée, ESIL case 925, 163, avenue de Luminy, 13288 Marseille cedex 9, France.

Auteur correspondant, E-mail: qatibi@fstg-marrakech.ac.ma).

La surface oléicole mondiale est estimée à 8.600.000 ha sur laquelle sont plantés plus de 800 millions d'oliviers. Elle est principalement située dans le bassin méditerranéen (95%). Cette surface se trouve, à 85%, dans les zones semi-arides. Cette filière concerne 7 millions de familles, soit 30 millions de personnes et s'évalue à 7 milliards de dollars. 75% des terres cultivées sont réparties en petites superficies. La qualité mondiale reconnue de l'huile d'olive pour la santé humaine a entraîné une extension des zones de culture de l'olivier. La Communauté européenne est le premier consommateur mondial, mais les consommations les plus importantes dans le bassin méditerranéen se trouvent en Syrie (100.000 tonnes), en Turquie (70.000 tonnes), au Maroc (50.000 tonnes) et en Tunisie (40.000 tonnes). Ces marchés sont normalement desservis par les productions locales et ont donc une relevance limitée pour le commerce international. Les États-Unis, avec une consommation de plus de 220.000 tonnes entièrement importées, représentent actuellement le deuxième marché mondial. Une progression notable de la consommation d'huile d'olive a également été observée en Australie, au Japon, au Canada ainsi qu'au Brésil, ces consommations se situant entre 25.000 à 35.000 tonnes par an dans chacun de ces pays. En plus des quantités importantes d'eau que l'industrie oléicole nécessite, elle est parmi celles qui engendrent les plus grandes quantités d'effluents liquides (margines). La quantité de ces effluents dans le pourtour méditerranéen a été estimée entre 20 et 30 millions de m³ par an, selon que l'on considère ou non l'utilisation du procédé dit «écologique» qui génère peu ou pas de margines. Le rejet de ces effluents sans traitement préalable dans le milieu naturel engendre des problèmes environnementaux sérieux pour les eaux de surface, les flores, les microflores des cours d'eau et du sol, le sol lui-même et les eaux souterraines. Face à ces effluents particulièrement nocifs, des efforts considérables sont consentis par la communauté internationale, notamment celle des deux rives de la Méditerranée, afin d'élaborer et proposer des procédés d'épuration de ces effluents. L'objectif principal de cette communication est de décrire les potentialités métaboliques des bactéries, notamment avec l'exemple d'une bactérie aéro-anaérobie, isolée très récemment d'un bassin d'évaporation de margines au Maroc. Cette bactérie est capable de transformer certains composés mono-aromatiques présents dans les margines d'olives et ce sans modifier les fonctions chimiques impliquées dans des activités biologiques bénéfiques. Il s'agit donc de produire des molécules à haute valeur ajoutée et utilisables dans les domaines industriels comme l'agroalimentaire (arôme, antioxydants naturels), la cosmétologie ou encore la pharmacie.

Valorisation des effluents liquides de l'industrie oléicole par extraction de l'antioxydant majeur, l'hydroxytyrosol. Effet de la variabilité des margines sur la quantité produite

Noureddine ALLOUCHE & Sami SAYADI

Laboratoire des Bioprocédés, Centre de Biotechnologie de Sfax, 3038, B. P. « K », 3038 Sfax, Tunisie

Auteur correspondant, courriel: sami.sayadi@cbs.rnrt.tn.

Généralement, l'extraction de l'huile d'olive génère deux effluents. L'un solide appelé « grignon » et l'autre liquide désigné sous le terme « margine ». Les margines sont fortement chargées en matières organiques représentées essentiellement par les polyphénols. Ces composés phénoliques sont potentiellement toxiques pour les micro-organismes du sol faisant ainsi des margines un problème environnemental inquiétant. Néanmoins, la fraction monomérique de ces produits phénoliques, présente aussi dans les olives et l'huile d'olive, est dotée de plusieurs activités biologiques particulièrement l'activité antioxydante. Parmi les monomères phénoliques les plus intéressants des margines apparaissent essentiellement les ortho-diphénols et en particulier l'hydroxytyrosol (3,4-dihydroxyphényl-éthanol). Grâce à ces activités biologiques et ces effets bénéfiques vis-à-vis de la santé humaine, la production de l'hydroxytyrosol suscite l'intérêt de plusieurs chercheurs dans le monde. Dans ce contexte et dans le cadre d'un projet Inco-Med financé par la Communauté Européenne, on s'est intéressés à l'extraction liquide-liquide en continu de la fraction monomérique des margines. Pour cela, une étude quantitative portant sur la variation de la concentration de l'hydroxytyrosol en fonction du système d'extraction de l'huile d'olive et de la période de récolte des olives a été réalisée. La concentration en hydroxytyrosol augmente du début vers la fin de la campagne oléicole. Par ailleurs, les margines issues du système classique d'extraction de l'huile d'olive (super-presse) sont plus chargées en hydroxytyrosol que celles qui sont issues du système à chaîne continue. Moyennant une batterie d'extraction opérant avec trois étages d'extraction, un taux de solvant égal à 2 et en utilisant l'acétate d'éthyle comme solvant, 92.67% d'hydroxytyrosol ont été extraits à partir des margines. Trois grammes d'hydroxytyrosol ont été obtenus à partir d'un litre de margine brute super presse.

Valorisation non alimentaire des sous-produits de l'industrie oléicole (grignons d'olive et margines)

K. NYAZI, A. OUNAS, A. YAACOUBI, A. BACAOUI & C. BENNOUNA

Laboratoire de Chimie Organique Appliqué, Unité Analyse et Environnement, Université Cadi Ayyad, Faculté des Sciences Semlalia, BP 2390, Marrakech
Auteur correspondant, courriel: nz_khadija@yahoo.fr

Au Maroc, l'olivier constitue 50% de la superficie arboricole totale qui est estimée à 650 000 hectares. Les sous-produits obtenus après l'extraction des huiles à partir des olives sont constitués de 30% de résidus solides (grignons d'olive) et 50% d'eau de végétation (margines). Actuellement, ces déchets sont brûlés directement, pour leur pouvoir calorifique, dans le cas des grignons et rejetés dans la nature ou stockés dans des fosses sans aucun traitement pour les margines. Ceci cause de sérieux problèmes pour les eaux de surface, les eaux souterraines et l'environnement en général. Dans ce travail, on s'est proposés d'étudier la valorisation de ces déchets en vue de préparer des charbons actifs, de bonne qualité, utilisables dans plusieurs domaines, en particulier le domaine des traitements des eaux. La préparation a été faite à partir des grignons et de mélanges grignons/margines, par activation physique ou chimique. Après caractérisation, ces charbons sont utilisés pour l'élimination de plusieurs polluants rencontrés dans les eaux. Les résultats obtenus, et comparés aux matériaux commerciaux, montrent de bonnes performances d'élimination vis-à-vis des polluants étudiés et une grande diversité des domaines d'application.

Valorisation de sous-produits d'oléiculture. Utilisation comme source d'enzymes pour la production de note verte

Najla BEN AKACHA ¹, Oifa BOUBAKER ¹ & Mohamed GARGOURI ¹

¹ Équipe de Génie Enzymatique, Institut National des Sciences Appliquées et de Technologie de Tunis, BP 676, 1080 Tunis Cedex, Tunisie, Tél: +216 71 703 829, Fax: +216 71 704 329
Auteur correspondant, courriel: benakachanajla@yahoo.fr.

On s'est intéressés dans ce travail à la production de molécules aromatisantes naturelles par voie biotechnologique qui utilise des activités enzymatiques extraites à partir de matières premières végétales. Parmi ces activités, on utilise l'hydroperoxyde-lyase extraite à partir de tissus d'olivier. Cette enzyme transforme les huiles végétales en arômes de type aldéhydes et alcools responsables de la note verte chez les végétaux. En partant de 13-hydroperoxy-acides gras issus de la transformation de l'huile de lin ou l'huile de tournesol, on a mis en œuvre un système bi-enzymatique pour la production de note verte. Les deux activités enzymatiques étudiées sont: (i) l'hydroperoxyde-lyase extraite à partir de tissus d'olivier qui produit un C6-aldéhyde comme le 3Z-hexénal à partir d'acide linoléique et (ii) l'alcool-déshydrogénase de levure agissant en présence du cofacteur NADH sur l'aldéhyde en le réduisant en alcool correspondant, le 3Z-hexénol. Ces arômes sont responsables de la note verte ou « odeur de l'herbe coupée » et sont recherchés en industries alimentaire, cosmétique et des parfums. Ce travail consiste, dans un premier temps, à optimiser les conditions d'activité des enzymes et à déterminer leur cinétique qui a un comportement de type Michaelis-Menten. La production d'alcools en une seule étape a été réalisée par couplage de l'hydroperoxyde-lyase d'olivier et de l'alcool-déshydrogénase. Le suivi du système de couplage a montré un effet favorable de la deuxième réaction sur le déroulement de la première. Cette situation est thermodynamiquement favorable à la conversion des hydroperoxy-acides gras en arômes. Dans le but de mieux maîtriser la synthèse des arômes, on a procédé à la reproduction théorique de l'évolution expérimentale de la biotransformation. Un modèle, dans lequel les paramètres cinétiques déterminés expérimentalement ainsi que les différentes équations ont été introduits, a été établi. La comparaison des résultats obtenus par simulation et par expérimentation a constitué une démarche efficace pour avoir une idée sur le degré du perfectionnement du système.

Traitement des margines par des micro-organismes adaptés physiologiquement

H. AISSAM¹, F. ERRACHIDI¹, M. PENNINGCKX², M. MERZOUKI¹
& M. BENLEMLIH¹

¹ Laboratoire de Microbiologie de l'Environnement, Faculté des Sciences Dhar El Mehraz, B.P: 1796 Atlas-Fès, Maroc

² Laboratoire de Physiologie et d'Écologie Microbiennes, Université Libre de Bruxelles, Institut Pasteur, 642, Rue Engeland, B-1180 Bruxelles, Belgique

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. L'objectif de notre travail est d'étudier le traitement aérobie des margines via des souches pures. Pour cette étude, on a choisi deux souches de levures (*Candida boidinii* et *Geotrichum candidum*) et deux souches de champignons (*Penicillium sp.* et *Aspergillus niger*). 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. Après un mois de traitement des margines brutes, la réduction de leurs taux de composés phénoliques atteint 75.6% pour *A. niger*, 63.1% pour *Penicillium sp.*, 48.4% pour *G. terrestre* et 40.3% pour *C. boidinii*. Cette étude a montré également l'intérêt de la souche *A. niger* dans l'abattement de la DCO (78,3%) et des composés phénoliques (75,6%).

Mots-clés: Adaptation physiologique - Champignons - Levures - Margines - Traitement biologique.

Essai de traitement des margines à l'aide d'un réacteur aérobique de type « jet loop »

A. JAIL, F. CHAMKH, M.J. REIDA, F. BOUKHOBZA, A. NEJMEDDINE*,
J.C. DUARTÉ & L. HASSANI

Faculté des Sciences Semlalia, Université Cadi Ayyad, Département de Biologie, BP 2390,
40 000 Marrakech, Maroc. Université Hassan 1^{er}, Settat, Maroc
Auteur correspondant, courriel: lhassani@ucam.ac.ma

Le Maroc, comme tous les pays méditerranéens producteurs d'huile d'olive (2,6% de la production mondiale en 2001), est confronté à la problématique de l'élimination des eaux usées rejetées par les huileries, appelées margines. Ces eaux de végétation sont des effluents très polluants, fortement chargés en matière organique et très peu biodégradables. Les margines ont donc tendance à affecter les propriétés du milieu dans lequel ils sont déversés. Notre étude a pour objectif, d'une part, de caractériser les effluents d'une huilerie semi-moderne de la ville de Marrakech afin de connaître leur pouvoir polluant et, d'autre part, d'expérimenter un procédé de traitement intensif à l'aide d'un réacteur aérobique de type «jet loop», aimablement fourni par INETI, Lisbonne, Portugal. La caractérisation physico-chimique a montré que les margines de cette unité sont des effluents à pH acide, à faible taux d'oxygène, très chargés en polyphénols, en matière organique et en sels. D'après les résultats préliminaires obtenus, les rendements épuratoires du « jet loop reactor » ont montré un abattement de 70% de la demande chimique en oxygène (DCO) et de 66% des polyphénols totaux. Partant de ces résultats obtenus, ce procédé pourrait présenter un intérêt en tant que mode de prétraitement des effluents d'huileries par voie biologique avant leur réutilisation en agriculture, leur traitement par un autre système ou même leur rejet dans le milieu naturel.

Biocontrol of fungal phytopathogens by two phase olive husks residues biotechnological composted

G. RANALLI¹, G. ALFANO¹, C. BELLI¹, G. LUSTRATO¹ & G. LIMA²

¹ DISTAAM, University of Molise, Via De Sanctis. 86100 Campobasso, Italy.

² SAVA, University of Molise, Via De Sanctis. 86100 Campobasso, Italy.

Composting of olive humid husk residues (OHH) permit the degradation of toxic compounds of the organic fraction of OOMW including sugar, lipids, pectins, tannins, polyphenols and aromatic compounds wich are also responsible for phytotoxic and antimicrobial effects in soil. The cured composted residues, when re-used in agriculture as eco-compatible, good quality organic amenders and fertilizers, can be potentially adopted as alternative products to control plant pathogens (bio-suppressive, bio-pesticide) in organic and integrated sustainable agriculture systems. The effects of inhibitory-suppressive activity of several OHH cured compost water extracts toward *Fusarium oxysporium* f.sp. *lycopersici* and 8 phytopatogenic fungi are reported.

Olive oil mill wastes re-use: UE technical legislation and spreading system proposals

P. AMIRANTE¹, B. BIANCHI¹ & G.L. MONTEL²

¹ PROGESA dept, University of Bari, Italy

E-mail: paolo.amirante@agr.uniba.it; biagio.bianchi@agr.uniba.it

² PRIME dept, University of Foggia, Italy

E-mail: g.montel@unifg.it

This paper shows the results of one deepened investigation on the technical legislation which to make reference for the olive oil wastes disposal in the UE Countries, starting from the Community directives related to the disposal of the industrial and agricultural waters, as well as of the wastes. Aim of the search has been that to furnish solutions to the problem of the spreading in field of such wastes really enjoyable by the oil industry and the olive growing. In fact, among the olive oil Countries, Italy is the only one in which the agronomic use of the olive oil mill wastes (omw) is permitted through a uniform spreading on the agrarian soil; the quantities to annually be distributed don't owe to be superior to 80 m³/ha for the centrifugal system mills and 50 m³/ha for those with pressure system. Moreover, specific dimensional criterions have been defined for tank-trucks destined to the controlled distribution in olive-grove of the omw, according by the law, as well as the technical-agronomic parameters related to the time of distribution. The Authors have designed a tank-truck prototype to such aim. The machine has been optimized by tests in olive-groves, through which the systems of distribution, transversal and longitudinal have been tested. Through such systems (software controlled) it is possible, in any operational condition, to guarantee a spreading of the waste, uniform on the whole interested surface according by law. This prerogative constitutes the main element of these agricultural machines for its influence on the work quality (performance); in fact, if the tank-truck offers enough guarantees of high performances, it is possible to exalt its agronomic efficiency and to plan the spreading, not as an economic solution relatively for the wastes disposal, but rather as a productive and ecological solution to furnish to the soil and to the crops a suitable reinstate some nutrients.

Vermicomposting as an alternative to obtain value-added agricultural products from olive-mill wastes

E. BENÍTEZ¹, B. MORENO¹, E. ROMERO¹, J.D. FERNANDEZ¹, A. POLO²
& R. NOGALES¹

¹ Estación Experimental del Zaidín, CSIC, c/ Profesor Albareda, 1, 18080-Granada, Spain

² Centro de Ciencias Medioambientales. CSIC, c/ Serrano, 115 dpdo, 28006-Madrid, Spain

The two-phase olive mill waste or alperujo, a semi-solid waste produced during the two-phase extraction of olive oil, and the exhausted olive cake or orujillo, a solid waste produced after extraction of orujo olive oil, constitute the main wastes produced by the olive oil industry in Spain. Both olive wastes have a high C/N ratio, recalcitrant nature and contain toxic compounds, which prevent their direct application to agricultural soils. We studied the feasibility of using vermicomposting to transform both olive mill wastes into value added products. For it, different vermicomposting processes were carried out to micro, laboratory and pilot scale, using those olive-mill wastes, alone or mixed with other organic wastes. In addition, other experiments were done in order to determine the agricultural potential of the organic amendments obtained. The results demonstrated that vermicomposting can be an alternative technology for the management of olive-mill wastes, especially when these wastes were mixed with biosolids or manure. The combined action of microorganisms and earthworms (*Eisenia andrei*) enhanced biodegradation of the olive-mill wastes, as reflected by the depletion of overall microbial and hydrolytic enzyme activities. The end products "vermicomposts" had low C/N ratio, high stability and maturity and were not phytotoxic. These characteristics make the vermicomposts useful as soil organic amendments, mulching products and soil remediation amendments. In addition, the earthworms grown in these olive-mill wastes can provide a source of high quality protein for animals. Study support by CICYT "project REN2003-05359" and Junta de Andalucía "project CAO01-007".

Effet de l'épandage des margines sur la biodiversité microbienne du sol

F.Z. EL HASSANI, S. MDAGHRI ALAOUI, H. AISSAM, F. ERRACHIDI,
M. MERZOUKI, M. EL HASSOUNI & M. BENLEMLIH

Laboratoire de Microbiologie de l'environnement, Département de biologie, Faculté des sciences Dhar el Mehraz, BP: 1796-Atlas, Maroc

L'épandage des margines sur les terrains agricoles est une pratique prometteuse pour la valorisation de ces coproduits de la production d'huile d'olive. Afin de mettre en évidence l'effet de cette pratique sur la biodiversité microbienne du sol, on a suivi l'évolution de certains groupes microbiens pertinents pour la mise en évidence des changements potentiels des cycles bio-géochimiques du carbone et de l'azote dans le sol. L'effet de l'épandage des margines sur la microflore du sol dépend des doses en margines appliquées. Le suivi quantitatif et qualitatif des composés phénoliques dans le sol explique bien la biodiversité et l'évolution de la population microbienne.

Mots-clés: Margines - Composés phénoliques - Sol - Biodiversité microbienne - Cycle de l'azote - Cycle du carbone.

Valorisation et détoxification des effluents liquides des huileries d'olives

N. FAKHAREDINE, G. AIT BADDI, H. HAMDI & M. HAFIDI

Unité Sol et Environnement (Labo. Eco. Végét.), Dépt. de Biologie, Faculté des Sciences Semlalia, BP: 2390, Marrakech, Maroc.

Auteur correspondant: hafidi@ucam.ac.ma

Au Maroc, l'industrie oléicole génère deux sous-produits (grignons et margines), en quantités très importantes (Hafidi *et al.*, 2004; Ait baddi *et al.*, 2004) dont il est difficile de se débarrasser. La présente étude a pour objectif de traiter les effluents liquides en milieu aérobic. Le traitement des effluents dilués a été suivi, pendant 20 jours, sous différentes conditions (T1 = margines à pH acide + micro-organismes du sol; T2 = margines + micro-organismes du sol + phosphate naturel et T3 = margines + micro-organismes récoltés à partir des mêmes effluents (X)+ phosphate naturel). Un suivi des caractéristiques physico-chimiques et une caractérisation par spectroscopie infrarouge (IRTF) ont été réalisés afin de déterminer l'efficacité des traitements. Après 20 jours, l'abattement en polyphénols est de 90,8 % pour T1 et 92 % pour T2 et T3. L'abattement de la DCO est de 58 % pour les traitements T1 et T3 et 86.5% pour T2. L'analyse IRTF a mis en évidence une réduction très significative des groupements aliphatiques au profit des groupements aromatiques, en particulier pour T2 et T3, par comparaison au traitement T1. À la lumière de ces résultats, la digestion aérobic des margines enrichies par les micro-organismes du sol et en présence du phosphate naturel (traitement T2) semble être plus efficace pour la détoxification de ces effluents, avec une meilleure stabilité de la fraction organique du produit final.

Mots-clés: Effluents liquides des huileries d'olives - Digestion aérobic - DCO - Polyphénols - Spectroscopie infrarouge (IRTF).

Références

- Ait Baddi G., Alburquerque J.A., González J., Cegarra J. & Hafidi M. (2004) Chemical and spectroscopic analyses of organic matter transformations during composting of olive mill wastes. *International Biodeterioration and Biodegradation* 54: 39-44.
- Hafidi M., Amir S., Revel J-C. (2004) Structural characterization of olive mill wastewater after aerobic digestion (elemental analysis, FTIR, ¹³C-NMR). *Accepted in Process Biochem.*

Aerobic biodegradation of olive mill wastes and maturation monitoring by the follow of humic acids evolution

Ghita AIT BADDI ¹, Mohamed HAFIDI ¹, Véronique GILARD ²
& Pascal RAMOS ³

¹ Laboratoire Sol et Environnement, Département de Biologie, Faculté des Sciences Semlalia, Université Cadi Ayyad, BP: 2390, Marrakech, MAROC.

² Groupe de RMN Biomédicale, Laboratoire SPCMIB, Université Paul Sabatier, 118 route de Narbonne 31062 Toulouse, FRANCE.

³ Laboratoire de Travaux Pratiques de Spectroscopies, Université Paul Sabatier, 118 route de Narbonne 31062 Toulouse, FRANCE.

Corresponding author: hafidi@ucam.ac.ma

In order to determine the maturity of olive mill wastes compost, the generated humic acids during process are followed by several analyses (elemental analysis, Differential Scanning Calorimetry and fluorescence spectroscopy in the emission, excitation and synchronous-scan modes). The present study is a continuity of other works published before (Ait Baddi & Hafidi, 2001; Ait Baddi *et al.*, 2003; Ait Baddi *et al.*, 2004a; Ait Baddi *et al.*, 2004b; Hafidi *et al.*, 2004) and which have proved that olive mill wastes compost is stable and mature. Indeed, the elemental composition of isolated humic acids has shown that the C/N ratio decreased and the C/H and O/C ratios increased, indicating that there is a loss of aliphatic groups and formation of more stable humic acids. Moreover, the fluorescence results showed that intermediate wavelength peak (located at about 404 nm) intensity decreased relatively to the one of the long wavelength peaks (located at about 440 and 465 nm). Such evolution indicated an increase of molecular weight and of humification degree of these humic acids. Further, Differential Scanning Calorimetry (DSC) has shown a loss of peptidic structures integrated to the humic matter and the oxidation and polycondensation of the aromatic nuclei of molecules. As a consequence, the whole analyses confirmed more the increase of humic acids humification degree during olive mill wastes composting. It results also from this study that the quality of the humic substances could be a useful indicator to evaluate the compost maturity and to assess its agronomic value.

Keywords: Humic acids - Olive mill wastes compost - Stability - Maturity.

References

- Ait Baddi G. & Hafidi M. (2001) Traitement des déchets des huileries par un bio-procédé aérobie et production de substances humiques à haute valeur agronomique. *Annales de Chimie Sciences des Matériaux* Elsevier, 26: S459-S464.
- Ait Baddi G., Hafidi M., Gilard V. & Revel J.-C. (2003) Characterization of humic acids produced during composting of olive mill wastes: elemental and spectroscopic analyses (FTIR and ¹³C-NMR). *Agronomie* 23: 1-6.
- Ait Baddi G., Alburquerque J.A., González J., Cegarra J. & Hafidi M. (2004) a. Chemical and spectroscopic analyses of organic matter transformations during composting of olive mill wastes. *International Biodeterioration and Biodegradation* 54: 39-44.
- Ait Baddi G., Hafidi M., Ouatmane A. & Revel J.-C. (2004)b. Caractérisation des acides humiques extraits lors du compostage des déchets d'huileries d'olives sur Gel Sephadex. *Agrochimica XLVIII*, 1-2, 13-24.

Utilisation des margines dans la lutte contre l'orobanche, un parasite des légumineuses alimentaires

Kaddour SAFFOUR¹, Driss BOUYA² & Mohamed BOUHACHE³

¹ Centre Régional de la Recherche Agronomique de Meknès, Maroc

E mail: olea @awamia.inra.org.ma

² Département de biologie végétale, Fac des Sciences Dhar Mehraz, Fès, Maroc

³ Département d'écologie végétale, IAV Hassan II, Rabat, Maroc

L'orobanche est une plante parasite redoutable des légumineuses alimentaires. Bien installée dans presque toutes les régions de production de ces cultures au Maroc, elle peut réduire leur rendement de 5 à 100%. Dans l'objectif d'explorer l'effet des margines sur l'infestation des fèves par *Orobanche crenata* Forsk., deux essais ont été conduits en 1999-2000 et 2000-2001 en pot au Centre Régional de la Recherche Agronomique de Meknès. Les margines ont été apportées au semis de la culture, à la floraison et à la fois au semis et à la floraison de la fève à différentes doses de 100 à 400 ml/ pot de 6 kg. Les margines ont réduit l'infestation par l'orobanche quelque soit la dose ou la date d'apport. Les doses élevées ont été les plus performantes quant à la réduction du nombre de tiges d'orobanche par pot (82 à 97%), le nombre de tubercules (78 à 98%) et la matière sèche de l'orobanche (77 à 95%). Elles permettent en outre un retardement de l'émergence des tiges d'orobanche à la surface du sol de 7 à 10 jours. Les doses élevées ont également engendré une amélioration de la biomasse et du rendement de la culture. Le pH du substrat a été par contre réduit et la conductivité électrique augmentée temporairement par l'apport des margines. Les margines pourraient être apportées utilement pour la lutte contre l'orobanche dans la fève à une dose ne dépassant pas 40 l/m². Ceci permettrait de recycler ce sous-produit et contribuer à la réduction de la pollution des cours d'eau.

Mots-clés: Margines - *Orobanche crenata* - Fève - Contrôle - Efficacité.

Essai de traitement des margines par des procédés innovants à base de plantes aquatiques

M. ACHAK ¹, L. MANDI ² & N. OUAZZANI ¹

¹ Laboratoire d'Hydrobiologie, fac. Sc. Semlalia, Marrakech.

² Laboratoire d'Algologie, Fac.Sc. Semlalia, Marrakech

Auteur correspondant, courriel: achak_mounia@yahoo.fr

L'extraction saisonnière des huiles d'olives est une pratique très ancienne au Maroc et a connu un développement considérable pendant ces dernières années. L'extraction se fait soit par des unités traditionnelles (Maâsra) ou industrielles. Les unités traditionnelles utilisent des procédés rustiques basés essentiellement sur l'énergie mécanique, engendrant de nombreuses pertes. Cependant, elles génèrent de grandes quantités de margines qui sont évacuées dans l'environnement sans traitement préalable. Certains auteurs les estiment entre 500 à 600 kg de margines/tonne d'olives traitées (Leone, 1993). Les unités industrielles appliquent des technologies modernes de production basées essentiellement sur l'énergie électrique. La modernisation du secteur a permis une amélioration de la production et de la qualité des huiles. Mais la quantité de margines rejetée est équivalente à la quantité d'olives triturée (Martini *et al.*, 1991; Hamdi, 1993). Plusieurs travaux ont été réalisés pour caractériser les margines (Chimi, 1997; Fiestas *et al.*, 1982). Les résultats des analyses physico-chimiques effectués ont montré que les margines sont des effluents à pH acide, très chargés en matière organique allant de 199 à 389 g/l, en polyphénols (7,1 à 14,3g/l), en matière sèche (61,1 à 129,7g/l) et en métaux lourds surtout le Fe et le Zn. De même, des études expérimentales ont étudié l'impact de ces rejets sur le sol (Morisot *et al.*, 1986; Fiestas, 1981) et ont révélé qu'après applications répétées des margines sur le sol, la majorité des micro-polluants organiques et inorganiques est éliminée entraînant un changement de ses caractéristiques physico-chimiques et aussi un changement sur sa fertilité et sur son degré de salinité. Les procédés de traitement réalisés sont très divers et sont à base de traitements biologiques (Martinez *et al.*, 1992), physico-chimiques (Fiestas *et al.*, 1992) ou thermiques (Ranalli, 1991). Toutefois, vu la complexité de la composition des margines et ses teneurs élevées en polyphénols, ces procédés restent encore à améliorer. D'autre auteurs ont essayé d'optimiser ces mêmes procédés en développant la méthodologie de la sélection des souches de moisissures et des levures (Ranalli, 1991) ou par l'introduction des floculants et des coagulants (Fiestas *et al.*, 1992), ou par évaporation naturelle (Mountadar, 1997). L'objectif de notre recherche est, d'une part, faire le suivi de la synoptique de fabrication de l'huile d'olive, réaliser une caractérisation complète des margines issues d'huileries traditionnelles et modernes et, d'autre part, tester la possibilité d'utilisation des plantes aquatiques pour le traitement de ces effluents en vue de leur valorisation. Les plantes aquatiques ont été souvent testées pour traiter les effluents urbains et ont montré leur efficacité (Finlayson *et al.*, 1983; Gesberg *et al.*, 1986; Mandi, 1994). Cependant, peu de travaux ont testé l'utilisation des plantes macrophytes pour le traitement des margines. Ce travail consiste à tester des plantes macrophytes à l'échelle expérimentale et de proposer des démonstrations à l'échelle industrielle.

Isolement et sélection des champignons filamenteux thermophiles à partir de Maâsra au Maroc pour la production des phytases sur grignon d'olive

L.H. IRAQI¹, K. LAMRANI¹, M. ISMAILI-ALAOUI¹, M. CHEHEB¹,
N. KAMMAS¹, H. HASSOUNI¹, B. RIO², I. GAIME-PERRAUD²,
C. AUGUR² & S. ROUSSOS²

¹ Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Laboratoire des Bioconversions, BP. 6202-
Instituts, Madinate Al Irfane, 10101 Rabat, Maroc

² IRD, UR-119 Biotechnologie Microbienne Post Récolte, IFR-BAIM, ESIL Case 925; 163,
Avenue de Luminy; F-13288 - Marseille cedex 9, France

L'acide phytique est la forme majeure du stockage du phosphore dans les graines des plantes supérieures. Cependant, il constitue un antinutriments lorsqu'il est en concentration élevée dans les tourteaux d'oléagineux. Il peut être hydrolysé par la phytase en myo-inositol et phosphate inorganique. Mais jusqu'à ce jour, aucune phytase microbienne thermostable n'est disponible pour compléter la nourriture des animaux monogastriques. Notre étude vise à isoler des souches de champignons filamenteux thermophiles hyperproductrices de phytases thermostables ayant des propriétés spécifiques. Plus de 125 échantillons prélevés dans différentes régions oléicoles du Maroc ont été utilisés pour l'isolement des souches. Environ 400 souches de champignons filamenteux thermophiles ont été isolées à partir de divers biotopes naturels du Maroc et identifiées. Elles sont représentées comme suit: *Aspergillus* (58%), *Rhizopus* (21%), *Humicola* (8%), *Myceliophthora* (5%), *Paecilomyces* (4%) et *Thermoascus* (4%). Cinq souches productrices de phytases sur milieu acide phytique (MAP) ont été cultivées à 19°C et à 55°C pour évaluer la croissance apicale (CA) et l'indice de sporulation (Is). Parmi les 5 souches sélectionnées (*M. thermophila*, *H. lanuginosa*, *Th. aurentiacus*, *Rh. oligosporus*, *P. variotii*), on a retenu *Myceliophthora thermophila* qui se développe bien sur le milieu MAP à 5 g/l. Cette souche est thermotolérante (de 19 à 55°C). Elle a une CA de 0,8 mm/heure et un Is élevé ($4,15 \cdot 10^8$ spores/gramme de substrat). De plus, les spores germent rapidement (6 heures d'incubation à 45°C). À partir de 400 souches isolées au Maroc, *Myceliophthora thermophila* a été retenue pour la production des phytases en FMS sur grignons d'olive.

Mots-clés: Grignons - Isolement - Champignons filamenteux - Enzymes - Phytase.

Isolement et sélection des champignons filamenteux thermophiles à partir des Maâsra au Maroc pour la production de tannase sur grignons d'olive

N. KAMMAS¹, K. LAMRANI¹, M. ISMAILI-ALAOUI¹, M. CHEHEB¹,
H. HASSOUNI¹, L.H. IRAQI¹, B. RIO², I. GAIME-PERRAUD²,
C. AUGUR² & S. ROUSSOS²

¹ Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Laboratoire des Bioconversions, BP. 6202-
Instituts, Madinate Al Irfane, 10101 Rabat, Maroc

² IRD, UR-119 Biotechnologie Microbienne Post Récolte; IFR-BAIM, ESIL Case 925; 163,
Avenue de Luminy; F-13288 - Marseille cedex 9, France

L'acide tannique représente, après la cellulose, l'hémi-cellulose et la lignine, le quatrième constituant le plus abondant chez de nombreuses variétés de plantes utilisées dans l'alimentation. Ce polymère polyphénolique a la capacité de précipiter les alcaloïdes et aussi de se combiner aux protéines et d'autres polymères d'origine végétale comme la cellulose et la pectine. Cette faculté lui confère des propriétés anti-nutritionnelles dans l'alimentation des monogastriques. Il peut être hydrolysé par la tannase en composés assimilables l'acide gallique et un dérivé polyalcoolique. Mais jusqu'à présent aucune enzyme capable de décomposer des tanins condensés n'a été isolée. Cette étude vise à isoler des souches de champignons filamenteux thermophiles hyperproductrices de tannases thermostables ayant des propriétés spécifiques pour la valorisation des grignons d'olive. Plus de 125 échantillons prélevés dans différentes régions oléicoles du Maroc ont été utilisés pour l'isolement des souches. Environ 400 souches de champignons filamenteux thermophiles ont été isolées à partir de divers biotopes naturels du Maroc et identifiées. Elles sont représentées comme suit: *Aspergillus* (58%), *Rhizopus* (21%), *Humicola* (8%), *Myceliophthora* (5%), *Paecilomyces* (4%) et *Thermoascus* (4%). Trois souches productrices de tannases sur milieu acide tannique (MAT) ont été cultivées à 19°C et à 45°C pour évaluer la croissance apicale (CA) et l'indice de sporulation (Is). Parmi les trois souches sélectionnées, on a retenu *Rhizopus spp1* (NK101E62) qui se développe bien sur le milieu MAT à 4 g/L. Thermotolérante, elle croît à 19°C et a une CA de 1,6 mm/heure et un Is élevé ($4,42 \cdot 10^8$ spores/gramme de substrat). En outre, les spores germent rapidement (6 heures d'incubation à 45°C). Cette souche a été retenue pour la production des tannases par fermentation en milieu solide sur grignons d'olive.

Mots-clés: Grignons d'olive - Isolement - Thermophilie - Sélection - *Rhizopus* - Tannase.

Biodégradation et bioremédiation des margines dans le sol

S. KACHOURI, N. LÂADHAR & M. HAMDI

UR-Procédés Microbiologiques et Alimentaires, Institut Nationale des Sciences Appliquées et de la Technologie (INSAT), Ecole Supérieure des Industries Alimentaires de Tunis (ESIAT)
Auteur correspondant, courriel: moktar.hamdi@insat.nu.tn

Les effluents résultant de l'extraction de l'huile d'olive représentent un danger réel pour l'environnement. Une gamme importante de technologies physico-chimiques est disponible pour dégrader les margines, mais ces traitements sont souvent coûteux et induisent d'importantes modifications des propriétés du milieu, ce qui a incité à développer des méthodes biologiques curatives. L'épandage des margines sur les terrains cultivés est l'une des méthodes biologiques pour la dégradation de ce rejet et pour la fertilisation du sol. C'est une alternative intéressante surtout lorsque la dégradation des composés phénoliques est assurée par la microflore du sol. Trois doses de margine fraîche et de margine oxydée (5%, 10% et 15%) ont été épandues sur un sol sableux qui ne fixe pas les phénols par adsorption. L'effet de l'épandage des margines sur le sol a été évalué en suivant la flore microbienne ainsi que la pollution résiduelle exprimée en DCO. Le suivi de la flore microbienne du sol mélangé avec les doses de margine fraîche a donné des résultats satisfaisants. Tous les micro-organismes (flore mésophile totale, champignons et bactéries fixatrices d'azote) ont présenté une activité microbienne prononcée essentiellement au bout de trois mois après l'épandage. On note un abaissement de la DCO de l'ordre de 60%. Dans le sol, les composés phénoliques ont été biodégradés par dépolymérisation au bout de trois mois après l'épandage. Le traitement des margines par épandage a montré des résultats prometteurs concernant le traitement des margines fraîches. Par contre, cette méthode ne semble pas être favorable vis-à-vis du traitement des margines oxydées. En effet les margines oxydées à l'air libre deviennent difficilement biodégradables (DCO non réduite) à cause des composés phénoliques de haut poids moléculaire résultant de la polymérisation des composés phénoliques présents dans les margines fraîches. C'est pourquoi on a envisagé d'étudier la technique de bioremédiation des margines oxydées dans le sol grâce à l'introduction de deux micro-organismes, *Geotrichum candidum* et *Lactobacillus plantarum*, connus pour leur capacité à dégrader les composés phénoliques contenus dans les margines. Les résultats de cette approche suggèrent une biodégradation active des composés aromatiques des margines oxydées aussi bien par les micro-organismes introduits dans le sol (*Geotrichum candidum* et *Lactobacillus plantarum*) que par les micro-organismes autochtones. Cette élimination des phénols s'exprime par une décoloration de l'ordre de 65%, une diminution de la quantité des phénols de l'ordre de 70% et une baisse de la DCO de l'ordre de 60%. Contrairement aux margines fraîches riches en azote minéral, qui stimulent la croissance des bactéries en particulier les bactéries fixatrices d'azote, les margines oxydées plus toxiques privilégient le développement des champignons.

Mots-clés: Margines - épandage - *Geotrichum candidum* - *L. plantarum* - Bioremédiation.

Décoloration des composés phénoliques de la margine par les bactéries lactiques

N. BEN OTHMEN, L. AYED & M. HAMDI

UR-Procédés Microbiologiques et Alimentaires, Institut Nationale des Sciences Appliquées et de la Technologie (INSAT), Ecole Supérieure des Industries Alimentaires de Tunis (ESIAT)
Auteur correspondant, courriel: moktar.hamdi@insat.mu.tn

La margine est l'effluent liquide de l'industrie oléicole. La toxicité de ce rejet est due essentiellement à sa grande richesse en composés phénoliques. En effet, les composés phénoliques des margines sont difficilement biodégradables en particulier lorsqu'ils subissent une auto-oxydation et une polymérisation lors du stockage à l'air libre. La bioconversion des composés phénoliques par les bactéries lactiques représente une perspective intéressante, du fait que les cultures anaérobies ont l'avantage d'éviter les problèmes de polymérisation. *Lactobacillus plantarum*, isolée à partir de la margine fraîche, est capable de dépolymériser des composés phénoliques de haute masse moléculaire contenus dans la margine fraîche et oxydée. Après six jours de culture en présence de margines diluées, les réductions obtenues sont de l'ordre de 58% pour la couleur, 55% pour la DCO et 46% pour les phénols totaux. Le traitement de la margine fraîche par différents procédés biologiques engendre une importante réduction de la charge organique. Cependant, la coloration noirâtre due aux polyphénols récalcitrants persiste. *Pediococcus pentosaceus* a été sélectionnée et utilisée pour la décoloration d'une margine ayant subi un traitement aérobie et anaérobie. La margine traitée a été diluée 5 fois et supplémentée de 2.5 g/l de glucose et 1 g/l d'extrait de levure. La couleur a été réduite de 65% après huit heures de culture. Cette décoloration est associée à la dépolymérisation et à l'adsorption des composés phénoliques aux cellules bactériennes. La couleur a été réduite de 10% lorsque $2 \cdot 10^8$ UFC/ml de cellules de *Pc. Pentosaceus* ont été mélangées avec la margine traitée. La décoloration des composés phénoliques de la margine par les bactéries lactiques est due à des mécanismes enzymatiques et à des phénomènes d'adsorption qui méritent plus d'approfondissement.

Mots-clés: Margines - Bioconversion - Composés phénoliques - Décoloration - *Lactobacillus plantarum* - *Pediococcus pentosaceus*

Utilisation des grignons d'olive pour la production de spores des champignons filamenteux producteurs d'enzymes (lipases et tannases)

H. HASSOUNI^{1,2}, M. ISMAILI-ALAOUI¹, K. LAMRANI¹, M. CHEHEB¹,
B. RIO², I. GAIME-PERRAUD², C. AUGUR² & S. ROUSSOS²

¹ Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Laboratoire des Bioconversions, BP. 6202-
Instituts, Madinate Al Irfane, 10101 Rabat, Maroc

² IRD, UR-119 Biotechnologie Microbienne Post Récolte; IFR-BAIM, ESIL Case 925; 163,
Avenue de Luminy; F-13288 - Marseille cedex 9, France

Les champignons filamenteux sont des micro-organismes thallophytes eucaryotes sporogènes constitués d'un thalle (filaments végétatifs). Leur cycle de vie comprend les étapes suivantes: la germination, la croissance et la sporulation. Cette dernière concerne la formation et la libération de spores, qui sont des formes de résistance et de reproduction. Le but de cette étude est d'arriver à produire une quantité très importante de spores de CF (de l'ordre de 10^{12}) qui peuvent servir comme inoculum (starter ou ferment) pour démarrer diverses applications en biotechnologie. Pour la production massive de spores de champignons filamenteux, on utilise la fermentation en milieu solide qui consiste à cultiver le mycélium sur des substrats solides. Pour nos expériences, la bagasse de canne à sucre (80 g) a été utilisée comme support solide et les grignons d'olive «GO» (20 g) comme substrat vu qu'ils sont riches en sucres, protéines, lipides et sels minéraux. L'inoculation du mélange solide a été faite à raison de $2 \cdot 10^7$ par g de matière sèche à une humidité initiale de 90%. La germination a été évaluée par le calcul de la vitesse de germination (temps compris entre la mise en contact de la spore avec l'eau et l'émission du tube germinatif). La production de spores a été calculée via l'indice de sporulation qui représente le nombre de spores produites par gramme de matière sèche initialement présente dans le milieu de culture. Les deux souches utilisées (*Aspergillus niger* et *Rhizopus microsporus*) sont connues pour la production d'enzymes (tannases, lipases, etc.). Les résultats ont montré que les grignons d'olive constituent un excellent substrat pour la culture de ces deux champignons et permettent d'avoir, à 47°C, une germination rapide de spores au bout de 9 heures et un indice de sporulation de $2,03 \cdot 10^8$ pour *Rh. microsporus*. Pour *A. niger* cultivé à 30°C, la germination a lieu au bout de 12 heures et l'indice de sporulation a été de $10,4 \cdot 10^8$ spores. La production de spores en FMS de champignons filamenteux sur GO est très intéressante et prometteuse en particulier pour la préparation de starters à grande échelle, destinés à la production d'enzymes.

Mots-clés: Grignons d'olive - Champignons filamenteux - Fermentation en milieu solide - *Aspergillus niger* - *Rhizopus microsporus* - Germination - Sporulation.

Préparation d'aliment pour bétail à partir des grignons d'olives marocaines

My Mustapha ISMAILI-ALAOUI & Mustapha CHEHEB

Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, BP 6202-Instituts, Madinate Al Irfane, 10101 Rabat, Maroc

Les Maâsra traditionnelles sont de petites exploitations familiales. De ce fait, leurs propriétaires pratiquent en même temps une agriculture et un élevage de subsistance. Ainsi, le recyclage des sous-produits de ces Maâsra et leur enrichissement, afin d'en faire des aliments pour bétail riches en protéines, constituent une alternative valable pour la valorisation des grignons d'olive sur les lieux de production. Le Maroc produit chaque année environ 180.000 tonnes de grignons d'olive qui sont brûlées ou abandonnées dans la nature. L'application de la fermentation en milieu solide a permis la mise en place d'une technologie de préparation d'aliment pour bétail à base de mélasse, d'urée et de grignon d'olive.

Cold storage of 'Coratina' olives in air and controlled atmosphere

G. COLELLI¹, M.L. CLODOVEO² & G.L. MONTEL¹

- ¹ PRIME dept, University of Foggia, Italy
E-mail: g.colellil@unifg.it; g.montel@unifg.it
- ² PROGESA dept, University of Bari, Italy
E-mail: clodoveo@agr.uniba.it

Pre-processing storage of olives for oil production represents a key point in order to obtain a product with high quality attributes. Mechanical damages on fruits together with a high presence of decay agents determines a dramatic reduction of initial quality attributes. Main problems are associated to an increase in free fatty acid content and in their oxidation, which in turn leads to a lower shelf life and appearance of rancid odour and flavour. 'Coratina' is a very popular olive variety for processing in southern Italy; oil obtained from this variety is known to be very resistant to oxidation, thanks to the very high content in antioxidant components. The effect of cold storage and controlled-atmosphere (CA) conditions is described in this paper. After 45 days at 5°C in 2% O₂ olive fruits showed a better appearance and a lower respiration rate compared to fruit exposed to air either at 5 and 20°C. No decay was observed on all treatments, although oil produced from fruit held at lower temperatures presented better characteristics, in terms of acidity and oxidation state, compared to fruit stored at 20°C. The effects of low temperature resulted more important than the effect of atmosphere modifications.

Pour la paix, que chacun plante un olivier!

Moussa ETTALIBI

Professeur et Éditeur en Chef d'Actes Éditions, Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, BP 6202-Instituts, Madinate Al Irfane, 10101, Rabat, Maroc
Courriel: m.ettalibi@iav.ac.ma; moussaettalibi@menara.ma

L'olivier est un arbre béni par Allah (Le Coran: Sourate AL-MUMINUNE (LES CROYANTS), Sourate AN-NUR (LA LUMIERE), Sourate AT-TIN (LE FIGUIER)^{1,2,3}. *«Il n'est ni d'Orient ni d'Occident. Son huile éclairerait même si nul feu ne la toucherait»* (Cf. Sourate An-Nur)². Cette Sourate parle de métabolisme. Elle explique que les oxydations biologiques (biodégradations) se déroulent chez tous les êtres vivants, qu'ils soient aérobies ou anaérobies, sans qu'il y ait besoin de feu. Le système est universel (Ettalibi, 1998). L'olivier est un arbre qui peut vivre des siècles. Il est de ce fait témoin de plusieurs histoires anciennes et actuelles. Pour plusieurs peuples, l'olivier est synonyme de victoire. La distribution de couronnes d'olivier lors des derniers jeux olympiques en Grèce est très significative. L'olivier est, en fait, un symbole de paix, de bonheur et de bien-être. En effet, l'un des produits majeurs de l'olivier est son huile qu'on qualifie d'Or vert. Tous les peuples qui en consomment ignorent pratiquement les maladies cardio-vasculaires, par exemple. L'huile est destinée à être consommée et à être appliquée sur la peau (Sourate AL-MUMINUNE)¹ ou pour lutter contre certains micro-organismes (ex. Soin des yeux dans certains régions d'accès difficiles à la médecine moderne, conservation des sauces tomates,...). Par ailleurs, il s'est avéré que la consommation de lipides apporte des éléments indispensables à la vie (acides gras insaturés et vitamines liposolubles) que l'on peut trouver effectivement dans l'huile d'olive (Ettalibi, 1998), sans oublier les antioxydants dérivant des iridoïdes glucosides (Ettalibi, 2004). Pour l'homme, les besoins en lipides (huiles surtout) sont estimés, en moyenne, à 26 kg/personne.an soit 1 gramme par kilo de poids vif et par jour. Or, 26 kg c'est justement le rendement approximatif en huile d'un olivier. Alors si, à la naissance d'un enfant, on plante un olivier, on pourra assurer ses besoins en huile. Déjà planter un arbre fruitier est considéré comme une aumône courante selon le Hadith⁴. Donc en intégrant cette action dans nos habitudes, on pourra joindre l'agréable à l'utile. Chacun aura contribué à faire quelque chose à sa société. Dans le cas de la plantation d'oliviers, sans aller jusqu'à assurer totalement les besoins en huile et d'olives de table, on aura, au moins, contribué à préserver la nature et l'environnement. Et comme chaque habitant aura participé, la préservation de notre patrimoine et de nos écosystèmes ne sera que renforcée. Le sentiment d'avoir participé est le meilleur moyen de faire passer le

message aux générations futures. Il s'agit là d'un modèle de développement vectoriel où la rentabilité socio-économique dépasse de loin l'investissement. Alors pour une paix durable, que chacun plante un Olivier. Avec ce geste on aura, de manière humaine et simple, perpétuer la PAIX autour de la Méditerranée, mais aussi en Orient et en Occident. Que la Terre repose en Paix (Ettalibi, 1987).

Pour en savoir plus

¹ Sourate 23. AL-MUMINUNE (LES CROYANTS), versets 19-20. Avec elle, Nous avons produit pour vous des jardins de palmiers et de vignes, dans lesquels vous avez des fruits abondants et desquels vous mangez, ainsi qu'un arbre (l'olivier) qui pousse au Mont Sinai, en produisant l'huile servant à oindre et où les mangeurs trempent leur pain. <http://islamfrance.free.fr/doc/coran/sourate/23.html>

² Le Coran, Sourate 24. An-Nur (LA LUMIERE), verset 35. Allah est la Lumière des cieux et de la terre. Sa lumière est semblable à une niche où se trouve une lampe. La lampe est dans un (récipient de) cristal et celui-ci ressemble à un astre de grand éclat; son combustible vient d'un arbre béni: un olivier ni oriental ni occidental dont l'huile semble éclairer sans même que le feu la touche. Lumière sur lumière. Allah guide vers Sa lumière qui Il veut. Allah propose aux hommes des paraboles et Allah est Omniscient. <http://islamfrance.free.fr/doc/coran/sourate/24.html>

³ Le Coran, Sourate 95 AT-TIN (LE FIGUIER), versets 1-8. <http://islamfrance.free.fr/doc/coran/sourate/95.html>

⁴ Selon Aboû Hourayra (Que Dieu soit satisfait de lui), le messager d'Allah (Que la paix et le salut soient sur lui) a dit : «Dieu le Très-Haut a dit : *«Quand l'homme meurt, il ne peut plus entreprendre les bonnes œuvres par lesquelles il prétendait, dans sa vie, à la miséricorde divine. Toutefois, il peut continuer à bénéficier de cette Miséricorde s'il laisse derrière lui trois choses :*

- *Une aumône continue (i.e. Une œuvre d'utilité publique : forage de puits, fontaine, hôpital, asile, école, plantation d'arbres fruitiers, etc.).*
- *Une science dont les gens tirent un profit (i.e. Toute réalisation utile à la communauté sans distinction ni de religion, ni de race, etc.).*
- *Un enfant pieux qui prie Dieu pour lui ».* Rapporté par Al-Boukhari. (A.C. Binebine, Communication personnelle; voir aussi <http://islamfrance.free.fr/calendrier.html>)

Ettalibi M. (1987) La terre tremble pour la paix in À la recherche de l'espoir caché. Éditions Touguy, Paris, 112 p. ISBN 2-7363-0001-7

Ettalibi M. (1998) Lipides. Collection Biochimie pour tous, Actes Éditions, Rabat, 288 p. ISBN 9981-801-42-9

Ettalibi M. (2004) Biochimie des saccharides. Collection Biochimie pour tous, Actes Éditions, Rabat, 584 p. ISBN 9981-801-56-9

Compte rendu de l'atelier n° 1

Génétique, marqueurs moléculaires et sélection variétale

Coordonnateurs: D.M. Walali Loudiyi (A. Touzani); Secrétaire: N. Ouazzani
Modérateurs: A. Triqui, B. Boulouha, M. Zarrouk, A. Abousalim

1. INTRODUCTION

Au cours de cet atelier, 23 propositions de communications ont été retenues pour être présentées pour ce premier séminaire sur les biotechnologies et la qualité des produits de l'olivier dans le Bassin Méditerranéen.

L'atelier n°1 a tenu ses travaux au cours de cinq séances thématiques précédées par une conférence présentée par Mme Dozba sur la génétique moléculaire de l'olivier et ses différentes approches possibles.

Les communications groupées en cinq thèmes essentiels se sont déroulées dans l'ordre suivant:

- Méthodologies de caractérisation (une communication présentée par Mr. Boulouha *et al.*, sur deux programmées initialement).
- Ressources génétiques et amélioration de la qualité de l'huile: deux communications présentées par Mr. Caruso *et al.* et Mr. Trigui *et al.*
- Relations génotype/environnement: quatre communications présentées par Mr. Motisi *et al.*, Mme Ben Temime *et al.* et Mr. Zarrouk (deux communications).
- Caractérisation des ressources génétiques et micropropagation: trois communications, une présentée par Mr. Walali et deux par Mr. Abousalim.
- Relation plante/ maladie et résistance de l'olivier: conférence non donnée.

Trois exposés n'ont pu être assurés à cause de l'absence des conférenciers:

- Peres *et al.*
- Ouazzani *et al.*
- Dabbou *et al.*

Deux tables rondes ont été organisées le matin et l'après-midi au cours desquelles une vingtaine de questions ont été débattues sur les méthodes de caractérisation ainsi que sur les résultats exposés oralement et sur les posters.

Le débat a été fructueux puisqu'il a permis aux chercheurs de s'informer mutuellement et de se mettre d'accord sur les démarches méthodologiques à adopter et les possibilités d'améliorations ainsi que sur les résultats originaux et intéressants exposés. Les discussions ont porté aussi sur les possibilités éventuelles de coopérations bilatérales et multilatérales en vue de servir la cause et le développement de l'olivier, arbre de paix de nos pays méditerranéens.

À la fin de la journée, une réunion de synthèse a débouché sur la formulation des recommandations de l'atelier n°1 comme elles sont présentées ci-dessous. Trois points focaux ont été soulevés par l'ensemble des participants à l'atelier n°1.

2. RECOMMANDATIONS

2.1. Gestion, évaluation et valorisation des ressources génétiques au niveau méditerranéen

Pour cela, il faudrait:

- Consolider les acquis et l'organisation mis en place dans le cadre du projet international RESGEN/ UE/ CRC/ COI (1997- 2004):
- * Alimenter la base des données et la rendre accessible et interactive vis-à-vis des partenaires.
- * Approfondir les connaissances sur le matériel végétal déjà mis en place, notamment les collections nationales et les deux collections internationales (Cordoue et Marrakech).
- * Poursuivre les activités engagées dans un cadre fédérateur sous la coordination d'un organisme international (COI).
- Afficher de nouveaux objectifs pour la caractérisation et l'évaluation des ressources:
- * Mettre en œuvre la notion de géotypes de référence au niveau national et international dans le but de valider l'authenticité des ressources génétiques et faciliter leur utilisation.
- * Prendre en compte de nouveaux caractères d'intérêt agronomique et technologique.
- * Établir des descripteurs tertiaires (marqueurs moléculaires) et valider les méthodologies au plan national.
- * Fédérer les efforts pour répondre au prochain appel d'offres européen sur les ressources génétiques.

2.2. Mise en valeur des terroirs, des qualités et typicités des produits méditerranéens

À cet effet, il est nécessaire de:

- Repérer les géotypes remarquables par la typicité de leurs produits.
- Évaluer les potentialités agronomiques et technologiques de ce matériel à partir de dispositifs permettant l'étude des interactions géotype/ environnement. À cet effet, il y a lieu de consolider les travaux multidisciplinaires incluant les spécialistes en ressources génétiques et les équipes travaillant sur la qualité de l'huile d'olive.
- Élaborer des propositions de valorisation en relation avec des organismes professionnels et internationaux.

2.3. Amélioration de la qualité du matériel végétal et de ses dérivés

Il s'agit d'amélioration de la qualité sanitaire du matériel végétal et des produits échangés et commercialisés dans le cadre d'une certification, validée dans un programme d'échanges. D'où l'intérêt de:

- Déterminer la nuisibilité réelle des parasites en particulier pour les nouveaux virus et phytophages identifiés.
- Mettre au point des méthodes efficaces dans la sélection sanitaire pour la production de matériel végétal sain.
- Contribuer avec le COI à l'élaboration d'un système de certification efficient, généralisé à l'ensemble des pays méditerranéens pour fiabiliser les échanges de matériel végétal.
- Mettre en place des mécanismes pour assurer la durabilité de ce colloque.

Compte rendu de l'atelier n° 2

Agronomie, stress hydrique et protection des plantes

Coordonnateurs: B. Ben Rouina (M. Berrichi); Secrétaire: T. Jardak
Modérateurs: E. Bourbos, L. Sebastiani, I. Metzidakis
Conférence introductive: K. Chartzoulakis

1.INTRODUCTION

Les travaux de l'atelier n°2 ont comporté une conférence introductive présentée par le Dr Kharzoulakis sur les eaux saumâtres et leurs effets sur la croissance, la physiologie et la qualité de la production et quatre sessions thématiques ayant traité du développement durable de l'olivier en milieu aride et semi-aride, du comportement de l'espèce vis-à-vis du stress hydrique.

Ces quatre thèmes ont été abordés à travers 16 présentations orales et 15 posters répartis comme suit:

- Développement durable: 7 communications orales et 1 poster.
- Adaptation aux stress abiotiques: 4 communications orales.
- Protection de l'environnement 5 communications orales et 5 posters.

En ce qui concerne le premier thème, les communications et les posters ont traité de plusieurs aspects ayant trait aux diverses contraintes d'ordres climatiques, édaphiques et sociales auxquelles se heurte la culture de l'olivier notamment dans les zones arides et semi-arides et dans le milieu Oasien. D'autre part, les travaux ayant trait au deuxième thème ont mis en évidence les grandes capacités d'adaptation de l'olivier aux stress hydrique, édaphique et atmosphérique qui se manifestent à travers diverses mécanismes de régulation physiologique (photosynthèse, ajustement somatique, surface foliaire, enracinement, etc.) illustrés par des exemples de comportement variétaux. D'autres communications ont traité de la gestion de l'irrigation et de l'usage des eaux salées et des eaux non conventionnelles.

Quant au troisième thème, les communications et les posters ont concerné principalement les ravageurs de l'olivier et, à moindre degré, les maladies (2 posters).

Les interventions ont intéressé plus particulièrement l'estimation de la miscibilité de l'hylésine (Tunisie), la lutte biologique et biotechnologique contre la mouche de l'olivier et la teigne de l'olivier (Grèce et Tunisie) ainsi que l'importance des composés phénoliques dans la compréhension des relations entre la psylle et l'olivier (Maroc) et la lutte contre ce ravageur.

Parmi les méthodes de lutte testées, le piégeage de masse et la combinaison des produits biochimiques attractifs pour lutter contre la mouche et la teigne. Ces méthodes peuvent

remplacer à l'avenir les pesticides et plus particulièrement les organophosphorés dont la toxicité vis-à-vis de la flore et la faune est bien connue.

À propos des maladies, les travaux se sont intéressés à l'utilisation des produits à faible action sur l'environnement contre l'oïdium.

Aux terme des exposés, deux tables rondes ont été animées et les discussions ont porté plus particulièrement sur les conditions d'emploi des margines en agriculture, l'utilisation efficiente de l'eau et sur les mécanismes d'adaptation de l'olivier au stress hydrique.

2. RECOMMANDATIONS

Les débats ont pu déboucher sur certaines recommandations dont notamment:

- La nécessité de traduire en pratique les nombreux résultats présentés et les valoriser à travers la mise en œuvre de programmes de transfert de technologie.
- La prise en considération des contraintes de l'oléiculture en zones montagneuses et milieu oasien.
- La gestion rationnelle des ressources en eau en tenant compte des besoins réels des plantes et l'application des techniques de conduite appropriées pour un développement durable de l'oléiculture.
- La nécessité d'une collaboration fédérative entre chercheurs et les autres acteurs de la filière oléicole selon une démarche d'approche intégrée.

Le groupe souhaiterait la poursuite de la tenue régulière de ce séminaire.

Compte rendu de l'atelier n° 3 Technologie, récolte et post-récolte, transformation des olives, qualité et sécurité

Coordonnateur: M. Rahmani; Secrétaire: M. Gargouri
Modérateurs: A. Kiritsakis, J. Alba Mendoza, M. Hammami, M. Khammam
Conférence introductive: P. Amirante

1. INTRODUCTION

Dans un écosystème aride et semi-aride, la variété « koroneiki » a montré les meilleures performances en terme de qualité. Le rendement en huile de cette variété était similaire à celui qui est observé dans son écosystème d'origine.

2. RÉCOLTE MÉCANIQUE DES OLIVES

L'application de la récolte mécanique doit être accompagnée par une modernisation des unités de trituration en vue de réduire la durée de stockage des fruits.

3. EFFET DU STOCKAGE SUR LA QUALITÉ SANITAIRE DES FRUITS

Un stockage impropre du fruit peut conduire à un développement incontrôlé des moisissures, ce qui présente un risque la qualité de l'huile et donc pour la santé. Il est fortement recommandé que la transformation des olives (trituration) intervienne le plus tôt possible après la récolte.

4. DÉVELOPPEMENT D'UNE TECHNIQUE AUTOMATIQUE POUR L'INSPECTION OPTIQUE DES OLIVES

Une technique optique d'inspection des olives est en cours d'évaluation pour une éventuelle application surtout lors de l'élaboration des olives de table.

5. INFLUENCE DE LA DATE OPTIMALE DE RÉCOLTE ET DE LA TECHNOLOGIE SUR LE CONTENU DE L'HUILE EN POLYPHÉNOLS

Parmi les divers composés de l'huile, les polyphénols représentent un bon indicateur de la qualité de l'huile et affectent largement ses propriétés nutritionnelles et organoleptiques. La teneur de ces constituants est variable avec le degré de maturité des fruits et il est recommandé que la date de cueillette ait lieu lorsque leur teneur est la plus élevée.

La teneur de ces composés dans l'huile peut être également augmentée durant l'étape de transformation par l'utilisation d'un gaz inerte (azote) et d'enzymes au cours du malaxage de la pâte d'olives.

Compte tenu de l'impact nutritionnel des composés phénoliques éliminés avec les margines, leur utilisation potentielle ouvre des nouvelles perspectives pour la valorisation des margines.

6. ACTION DE LA LUMIÈRE SUR LA STABILITÉ OXYDATIVE DE L'HUILE D'OLIVE

L'huile d'olive est très sensible à l'action de la lumière (photooxydation) étant donné sa teneur élevée en chlorophylles et phéophytines. Aussi est-il recommandé de stocker l'huile à l'abri de la lumière (obscurité). Le matériel d'emballage utilisé doit donc protéger l'huile contre cette action altérative.

7. UTILISATION DE BACTÉRIES LACTIQUES SÉLECTIONNÉES POUR L'ÉLABORATION DES OLIVES DE TABLE

L'utilisation de bactéries lactiques sélectionnées peut améliorer, d'une manière significative, les propriétés organoleptiques et sanitaires des olives de table fermentées naturellement, tout en réduisant la durée de désamérisation. La caractérisation des composés d'arômes affectant la valeur sensorielle des olives de table est importante pour évaluer les aspects qualitatifs de ces produits.

8. ASPECTS DE TRAÇABILITÉ

L'application de la traçabilité dans la production des olives est d'une importance particulière. Elle est requise par les nouvelles réglementations de l'Union Européenne. Un grand effort doit être fourni pour l'application de ce concept dans les pays producteurs, depuis l'olivieraie jusqu'aux niveaux de conditionnement et de commercialisation.

Compte rendu de l'atelier n° 4

Biotechnologies pour la valorisation des co-produits et protection de l'environnement

Coordonnateur: J. Cegarra (D. Iconomou); Secrétaire: H. Macarie
Modérateurs: S. Sayadi, G.L. Montiel, I. El Hadrami, U. Tomati, M. Hamdi
Conférence introductive: N. Senesi

1. INTRODUCTION

Les travaux présentés ont proposé une transformation totale ou partielle des margines afin de les valoriser car c'est la véritable source de problèmes environnementaux causés par l'industrie oléicole.

2. PROBLÈMES SOULEVÉS PAR LES DIFFÉRENTES TECHNOLOGIES

2.1. Épandages

Mis à part le cas de l'Italie où la législation permet l'épandage à raison de 50 à 80 l/m², il est strictement interdit dans les autres pays. Toutefois, afin de déterminer sa viabilité, il est nécessaire de développer une recherche approfondie prenant en compte:

- Le type de sol.
- Les quantités de margines à apporter.
- L'âge et la qualité des margines épandues.
- Les espèces végétales cultivées.
- Les conditions climatiques.
- Les effets d'un épandage à long terme.

2.2. Compostage

Il s'agit d'une technologie prometteuse comme cela a été démontré pour les grignons d'olive à deux phases. Toutefois, il reste à:

- Évaluer son coût.
- Développer une technologie pour concentrer les margines.
- Trouver des agents structurants disponibles.
- Effectuer une recherche approfondie pour évaluer le produit final sur le plan agronomique.

2.3. Traitements physico-chimiques et biologiques

Aucun traitement n'est universel. Il semble nécessaire de combiner les traitements physico-chimiques (ex. Fenton, électro-Fenton) et biologiques aérobies et anaérobies. Les coûts actuels sont élevés.

2.4. Récupération des produits, transformation et sources de biodiversité

Comme exemples de récupération des produits (l'hydroxytyrosol), de transformation chimique (le charbon actif) ou biologique (la production d'enzymes) et de sources de biodiversité (les champignons et bactéries avec de nouvelles potentialités).

Encore au stade laboratoire ou pilote, cette recherche est essentiellement de type académique.

3. LÉGISLATION

La discussion de la table ronde a montré la nécessité d'une législation adaptée à chaque cas et aux conditions locales.

4. CONCLUSION

De cette journée très bénéfique, il se dégage la nécessité de se retrouver dans deux ou trois ans pour évaluer l'évolution de la situation.

Synthèse de clôture du premier séminaire (Olivebioteq 2004)
**«Biotechnology and quality of olive tree products
around the Mediterranean basin»**
**«Biotechnologies et qualité des produits de
l'olivier dans le bassin méditerranéen»**

Najib AKESBI

Département des Sciences Humaines, Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II,
BP 6202-Instituts, Madinate Al Irfane, 10101 Rabat, Maroc
Courriel: n.akesbi@iav.ac.ma

1. INTRODUCTION

Ce séminaire est le premier de son genre à l'échelle internationale sur les biotechnologies et la qualité des produits de l'olivier dans le bassin méditerranéen. Il s'était fixé des objectifs qu'on peut actualiser autour de trois axes:

1. Faire rencontrer des chercheurs, des opérateurs pour permettre les échanges des résultats de recherches, d'expériences (théoriques, pratiques, techniques, industrielles).
2. Permettre le transfert de savoir-faire, les acquis de la recherche/développement, à l'échelle internationale, pour la filière oléicole. Faire en sorte que les questions des uns trouvent réponse chez les autres, que les réponses des uns puissent susciter de nouvelles interrogations chez les autres, etc.
3. Élaborer de nouvelles problématiques de recherche notamment au niveau des quatre domaines ayant fait l'objet des quatre sections thématiques:
 - Génétique, marqueurs moléculaires, variétés d'oliviers adaptés à l'aridité.
 - Agronomie, résistance au stress hydrique, développement durable des zones arides.
 - Transformation des olives, qualité et sécurité.
 - Biotechnologie pour la valorisation des sous-produits et protection de l'environnement.

2. CONTRAINTES

Les contraintes du secteur oléicole sont nombreuses et complexes, mais son potentiel est énorme, d'autant plus qu'il s'inscrit dans un contexte de globalisation porteur. Cette opportunité a des exigences qui commencent par la qualité du produit, ce qui

nous ramène à l'impératif de la recherche. Le secteur oléicole, surtout au Sud, doit faire face à de nombreuses contraintes:

- Contraintes climatiques.
- Structures foncières et statuts juridiques des terres.
- Matériel génétique et diversité variétale (Picholine, Chemlali, Koroneiki).
- Techniques de production et pratiques culturales: techniques archaïques, itinéraires techniques mal conduits, aggravés par l'analphabétisme des exploitants, la pauvreté qui ne permet pas l'intensification, la lutte contre les maladies et les ravageurs, etc.,
- Techniques de récolte, collecte et transformation, ...
- Faiblesse de formation, de recherche, vulgarisation, ...

Au Maroc, 80% des exploitations oléicoles sont conduites de manière traditionnelle. Les rendements sont de l'ordre d'1 t/ha au Maroc, contre 15-20 t/ha en Espagne...

À tout cela, s'ajoutent les politiques:

- Au Nord, la culture de l'olivier n'est plus une priorité.
- Au Sud, on a même découragé l'oléiculture au profit des huiles oléagineuses (notamment en subventionnant ces dernières). Mais un effort a été fait récemment pour élaborer un Plan National Oléicole (PNO). Le PNO au Maroc se structure autour de quatre priorités:
 - Intensification de l'existant.
 - Extension des surfaces cultivées.
 - Modernisation de l'outil de transformation et amélioration de la qualité.
 - Organisations professionnelles.

Malheureusement les moyens mis en œuvre sont restés en deçà des ambitions affichées. Pourtant, le potentiel est énorme, ...

3. POTENTIALITÉS

Le potentiel est énorme à commencer par les qualités/atouts du produit:

- Un produit aux qualités nutritionnelles et sanitaires appréciables et appréciées.
- Un produit dont les sous-produits sont aussi importants que le produit lui-même.
- Un arbre adapté au climat aride et semi-aride.
- Un arbre qui lutte contre l'érosion.
- Un produit qui contribue à fixer les populations sur place, crée des emplois, génère des revenus,...

À l'avenir, la demande ne pourrait que s'accroître, d'autant plus que le modèle de consommation méditerranéen (dont l'huile d'olive est une composante majeure), connaît un succès croissant, étant désormais recommandé par différentes instances internationales (l'OMS notamment) pour ses qualités nutritionnelles et sanitaires reconnues.

Cette dynamique, qui va être nécessairement amplifiée par la globalisation et la libéralisation des échanges, soulève évidemment le problème de la compétitivité. Or,

ce qui est intéressant avec l'huile d'olive, c'est que, s'agissant souvent d'un produit identifié de « terroir », avec appellation d'origine contrôlée, voire pouvant s'inscrire dans une vision « d'agriculture raisonnée », cette dimension du produit lui permet, d'une certaine manière, de contourner l'épineuse question de la compétitivité-prix. Celle-ci ne se pose avec acuité que pour les produits standard, alors que le facteur prix est beaucoup moins déterminant lorsqu'il s'agit de produits présentant d'autres atouts plutôt qualitatifs.

Mais cela demande évidemment de la recherche, encore et toujours de la recherche... C'est dire son importance.

4. PLACE DE LA RECHERCHE

La recherche doit elle aussi être globale, adaptée, conséquente, au service de l'homme et de son écosystème.

- Globale: elle doit s'étendre sur toute la filière, aller de la fourche à la fourchette comme on dit.
- Adaptée aux réalités des écosystèmes et des objectifs poursuivis. La recherche doit privilégier notamment les zones arides et semi-arides, les zones de montagnes et oasiennes, trouver des solutions au problème de l'eau, ..., bref, coller aux réalités du Nord comme du Sud de la Méditerranée.
- Conséquente: la recherche doit se doter des moyens appropriés, financiers certes, mais aussi de politique agricole, de coopération Nord/Sud, comme vient de le souligner un récent document du Centre international des Hautes Études Agronomiques Méditerranéennes (CIHEAM), nous devons promouvoir une « culture scientifique partagée » tout autour de la Méditerranée.

La recherche doit être également au service de l'homme et de son écosystème. Ceci implique qu'elle doit contribuer à promouvoir l'emploi et les revenus, s'inscrire dans une logique de durabilité, œuvrer à la protection des ressources naturelles, s'appliquer à concilier l'économie et l'écologie, notamment par le choix des techniques utilisées,

...

Pour être au service de l'homme, la recherche a aussi besoin de mesures d'accompagnement:

1. Une vision globale en termes de devenir du monde rural, de stratégie agricole, de développement durable,...
2. Une véritable politique de la recherche (y compris la collaboration fédérative entre chercheurs et opérateurs).
3. Une coopération nord-sud qui permet le transfert des technologies et la valorisation de ces dernières.
4. Une organisation des filières, à commencer par l'amont, puis la transformation, le marketing et les circuits de commercialisation, une politique de la qualité,...
5. Une promotion de l'organisation professionnelle et l'appui des pouvoirs publics, en particulier aux coopératives, aux petits oléiculteurs,...

5. CONCLUSION

Est-ce que ce séminaire a atteint ses objectifs ? Est-ce qu'il a permis d'apporter des réponses aux questions posées ?

À rapprocher les objectifs de départ et le programme effectivement réalisé, il me semble qu'il y a lieu d'être plus que satisfait.

Mais après ce séminaire, il faut qu'il y ait un après-séminaire, il faut une suite... Il faudrait que ce séminaire devienne un rendez-vous régulier. Il faudrait que les synergies se développent autour de la Méditerranée: les Marocains ont besoin des matériels espagnols, les Grecs ont des variétés, mais ont besoin de la « Maâsra mobile » du Pr Ismaili-Alaoui, mise au point à l'IAV Hassan II grâce précisément à la coopération internationale. Ce n'est que grâce à de tels échanges gagnant - gagnant que nous réussirons ensemble à relever les défis de notre destin commun.

Comité d'Honneur

Monsieur le Porte-Parole du Palais Royal, actuel Wali de la Région Méknès-Tafilalet

Monsieur le Ministre de l'Agriculture et du Développement Rural, Maroc

Monsieur le Ministre du Commerce et de l'Industrie, Maroc

Monsieur le Ministre délégué auprès du Ministre de l'Enseignement Supérieur, de la Formation des Cadres et de la Recherche Scientifique, Chargé de la Recherche Scientifique, Maroc

Monsieur le Haut Commissaire des Eaux et Forêts et de la Lutte contre la Désertification

Monsieur le Wali de la Région Méknès-Tafilalet, actuel Ambassadeur du Maroc en Lybie

Monsieur le Gouverneur de la Province d'Errachidia

Monsieur le Président du Conseil de la Région Méknès-Tafilalet

Monsieur le Président du Conseil de la Province d'Errachidia

Madame la Présidente du CRDI, Canada

Monsieur le Président de l'Institut de la Recherche pour le Développement (IRD), France

Monsieur le Conseiller Coopération Scientifique et Technique auprès de l'Ambassade de France à Rabat

Monsieur le Secrétaire Général du CIHEAM, Paris, France

Monsieur le Président Directeur Général du Crédit Agricole, Maroc

Monsieur le Président de l'Association Tafilalet

Comité de coordination

AOURID Hassan, Wali de Méknès Tafilalet
 CHADLI Lahbib, Province Errachidia
 DAOUDI M., Gouverneur d'Errachidia
 GUESSOUS Fouad, IAV, Rabat, Maroc
 HARRAS Mohammed, ORMVAT, Tafilalet
 ISMAILI-ALAOUI Mustapha, IAV, Rabat, Maroc
 MARGHI Moha , Ministère de l'Agriculture, du Développement Rural et des Pêches
 Maritimes
 ROUSSOS Sevastianos, IRD, Marseille
 TOUZANI Ahmed, Conseil Oléicole International (IOOC), Madrid

Comité d'organisation

AGBANI M., Secrétaire Général, IAV Hassan II, Maroc
 AKESBI Najib, IAV Hassan II, Rabat, Maroc
 AUGUR Christopher, IRD Marseille
 BADRAOUI Mohamed, IAV Hassan II, Rabat, Maroc
 BENIDER Mohamed, Herbier de l'Atlas, Marrakech, Maroc
 BERRADA Mustafa, DERD Rabat
 BERRICHI M., MADRPM, DPV, Rabat
 CHADLI Ahmed, Province d'Errachidia
 CHEHBOUNI Abdelghani, IRD Maroc
 CHEHEB Mostafa, IAV Hassan II, Rabat, Maroc
 DEBBAGH H., ENA, Méknès
 ETTALIBI Moussa, Actes Editions, IAV Hassan II, Rabat, Maroc
 HACHIMI Larbi, Laboratoire Officiel d'Analyses et de Contrôle Chimique,
 Casablanca, Maroc
 HADDOU Jader, Haut Commissariat aux Eaux et Forêts et Lutte contre la
 Désertification, Rabat, Maroc
 HASSOUNI Hicham, IAV Hassan II, Rabat, Maroc
 HILALI Abderrahman, MADRPM, Répression Fraudes et Protection Végétaux, Rabat
 HOMMIMID, Centre des Etudes sahariennes, Errachidia, Maroc
 HRO Abouchrif, Centre des Etudes sahariennes, Errachidia, Maroc
 IDRISSE Amari, INRA, Rabat
 LABAT Marc, IRD Marseille
 NARJISSE Hamid , INRA, Rabat, Maroc
 OUBRHOU Ali, Service de Vulgarisation, ORMVA du Tafilalet, Errachidia, Maroc
 RAPOU M. Conseil Oléicole International (IOOC), Madrid
 SAIDI Bouchta, IAV Hassan II, Rabat, Maroc
 WALLALI LOUDIYI D.M., IAV Hassan II, Rabat, Maroc
 ZAID A., Doyen de la Faculté des Sciences et Techniques d'Errachidia, Maroc

Comité scientifique

ABOUSALIM Abdelhadi,, Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Rabat, Maroc
AKESBI Najib, Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Rabat, Maroc
ALBA MENDOSA José, Institut de la Grassa, CSIC, Seville, Spain
BELTRAN RODRIGUES E.A., Spain
BEN ROUINA B., Institut de l'olivier, Sfax, Tunisie
BERRICHI M., MADRPM, Rabat
BOULOUHA B., INRA Maroc
BOURBOS Vaggelis, Director, Institute of olive tree and subtropical plants, Chania, Greece
CAYRE Patrice, Directeur Département Ressources Vivantes, IRD, Paris, France
CEGARA J., Centro de Edafologia y Biologia Aplicada CSIC, Murcia, Spain
CHARTZOULAKIS Konstantinos, Greece
DI GIOVACCHINO L., Istituto sperimentale per Elaitecnica, Pescara, Italy
DOSBA Françoise, INRA-ENSA, France
EL HADRAMI I., Biotechnologie et Physiologie Végétale, UCAM, Marrakech, Maroc
HACHIMI Larbi, Directeur du Laboratoire d'Analyse et de Contrôle Chimique
HAMDI Moktar, INSAT-Tunis, Tunisie
HAMMAMI Mohamed, Tunisie
ISMAILI-ALAOUI Mustapha, IAV-Hassan II Rabat, Maroc
JARDAK Taïeb, Institut de l'olivier, Sfax, Tunisie
KIRITSAKIS Apostolos, Greece
LACERTOSA G., Metapontum Agrobios, Italy
LOUSSERT R., DERD, Rabat, Maroc
MACARIE H., IRD Marseille, France
METZIDAKIS Ioannis, NAGREF, Institute of olive tree and subtropical plants, Chania, Greece
MONTEDORO G., Univ. of Perugia, Perugia, Italy
MONTEL G.L., Univ. of Perugia, Perugia, Italy
NOIRO Henri, Director of CRAVENCO, Saint Raphaële les Arles, France
OUAZZANI Nouredine, ENAM- Meknes, Maroc
OUKABLI Ahmed, INRA Maroc
PANDEY Ashok, CSIR, Trivandrum, Inde
RAHMANI Mohamed, Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Rabat, Maroc
RAPPOU Lina, International Olive Oil Council, Madrid, Spain
RODIS Panagiotis, AUA, Athènes, Greece
ROUSSOS Sevastianos, IRD, Marseille, France
SAYADI Sami, Institut de Biotechnologie, Sfax, Tunisia
SEBASTIANI L. Scuola Superiore, Pisa, Italy
SENESI N., Dpt. Biologia e Chimica Agroforestal, Univ. Of Bary, Italy
TOMATI U., Istituto Biologia AgroAmbiantal, CNR Rome, Italy
TOUZANI Ahmed, Executif Director, International Olive Oil Council, Madrid, Spain
TRIGUI Ahmed, Institut de l'olivier, Sfax, Tunisie
VADEL Ahmedou Mohamed
WALLALI LOUDIYI D.M., Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Rabat, Maroc
XILOYANNIS C., Italy
ZARROUK Mokhtar, Laboratoire de Carctérisation et Qualité de l'huile d'olive, INRST, Tunisie

Secrétariat/ Site Web

GAIME-PERRAUD I., Institut de la Recherche pour le Développement (IRD),
Marseille, France

GUEDIN I., Institut de la Recherche pour le Développement (IRD), Marseille, France

TOMASI A.P., IFR, BAIM, Universités de Provence et de la Méditerranée, Marseille,
France

VALIENTE J., IFR, BAIM, Universités de Provence et de la Méditerranée, Marseille,
France

Liste des participants

Abbad Abdelaziz	Faculté des Sciences Semlalia, Département de Biologie, BP 2390, 40000 Marrakech, Maroc
Abouchrif H	E-mail: h.abouchrif@caramail.com
Abdellaoui Mustapha	ORMVA Tafilalet, Maroc
Abid Nozha	E-mail: abidnozha@yahoo.fr
Abouchrif	ORMVAT, Maroc
Abousalim Abdelhadi	Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Département d'horticulture, Rabat, Maroc. E-mail: a.abdelhadi@free.fr; a.abousalim@iav.ac.ma
Abro Hro	ORMVA Tafilalet, Maroc
Achahgar	Maroc
Agbani M	Maroc. E-mail: sg@iav.ac.ma
Ait Baddi Ghita	Université Cadi Ayyad, Faculté des Sciences Semlalia, département de Biologie, Unité Sol et Environnement (Labo Eco-Veget), BP 2390, Marrakech, 40000 Maroc. E-mail: ritange@hotmail.com
Ait Bassou	ORMVA Ouarzazate, Maroc
Ait Bella Zahra	ORMVA Tafilalet, Maroc
Ait Yacine Zehor	Faculté des Sciences et Techniques Beni Mellal, BP 523, 23000 Beni Mellal Maroc. E-mail: z.yacine@fstbm.ac.ma
Akabli	Maroc
Akesbi N	Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, BP 6202, Rabat, Maroc. E-mail: n.akesbi@iav.ac.ma
Al Khateeb Adly Farahat M.	COI Egypte
Alba Mendoza Jose	COI Espagne
Alexadrakis Venizelos	Inst. of Olive Tree and Subtropical Plants of Chania, Agrokkipio, 73 100 Chania, Grece. E-mail: valexandr@nagref-cha.gr
Allalout Amira	INRST, Laboratoire de Caractérisation et Qualité de l'Huile d'Olive, BP 95-2050, Hammam-Lif, Tunisie
Allioui Abdelghani	ORMVA Tafilalet, Maroc
Allouche Noureddine	Centre de Biotechnologie de Sfax, BP K, 3038, Sfax, Tunisie. E-mail: noureddine.allouche@cbs.mrt.tn
Aouragh Hssain	ORMVA Tafilalet, Maroc
Aourid Hassan	Maroc
Augur Christopher	IRD, Unité BioTrans, IMEP Boite 441, Université Paul Cézanne, FST St Jerome, 13397 Marseille cedex 20, France. E-mail: c.augur@univ-cezanne.fr
Azennoud Tayeb	Taouate Maroc. E-mail: souhad_azen@yahoo.fr
Baba Said	ORMVA Tafilalet, Maroc
Barampouti Elli Maria	National Technical University of Athens, Department of Chemical Engineering, 9, Heroon Polytechniou, 15770, Greece. E-mail: belli@central.ntua.gr
Belaqziz Majdoulaine	Faculté des Sciences Semlalia, Equipe Biotechnologies et Physiologie Végétales, Département de Biologie, BP 2390, 40000 Marrakech, Maroc
Belodi Hassan	ORMVA Haouz Marrakech, Maroc
Ben Akacha Najla	INSAT, Institut National des Sciences Appliquées et de Technologie de Tunis, Equipe de Génie Enzymatique, BP 676, 1080 Tunis Cedex, Tunisie. E-mail: benakachanajla@yahoo.fr

Ben Othman Nada	INSAT, Unité de Recherche 'Procédés Microbiologiques et Alimentaires, BP 676, 1080 Tunis, Tunisie. E-mail: nadabenothesia@yahoo.fr
Ben Rouina Béchir	Institut de l'Olivier, BP 1087, 3000 Sfax Tunisie. E-mail: rouina.bechir@iresa.agrinet.tn
Ben Temime Sonia	INRST, Laboratoire de Caractérisation et Qualité de l'Huile d'Olive, BP 95-2050, Hammam-Lif, Tunisie. E-mail: mokhtar.zarrouk@inrst.nrnt.tn
Benabdelkrim El Filali A. Benider M	124 Bd rahal el meskini, Casablanca Maroc. E-mail: ga@iam.net.ma Maroc. E-mail: benider@iam.net.ma
Bentaher Hatem	Institut de l'Olivier, BP 1087, Sfax, Tunisie. E-mail: bentaher.hatem@iresa.agrinet.tn
Berrada M	Maroc. E-mail: derd@derd.madrpm.gov.ma
Berrichi M	Maroc. E-mail: dpv@dpv.madrpm.gov.ma
Bouaziz Mohamed	Centre de Biotechnologie de Sfax, Laboratoire des Bio-Procédés, BP K3038, Sfax, Tunisie. E-mail: mohamedsfax@yahoo.fr
Boukhoubza Fadila	Université Cadi Ayyad, Faculté des Sciences Semlalia, Département de Biologie, BP 2390, 40000 Marrakech Maroc. E-mail: f.boukhoubza@ucam.ac.ma
Boukhris Makki	Faculté des Sciences, BP 802, 3000 Sfax, Tunisie
Boulouha Belkassem	INRA Marrakech, BP 533, Maroc. E-mail: inramrk@iam.net.ma
Bourbos Vaguelis	NAGREF, Institute of Olive Tree and Subtropical Plants of Chania, Lab of Plant Pathology and Ecotoxicology of Plant Protection Products, Agrokipio, 73100, Chania, Crete, Greece. E-mail: vbourbos@nagref-cha.gr
Bracci Tania	Scuola Superiore Sant'Anna di Studi Universitari e di Perfezionamento, Viale R. Piaggio, 34, I-56025, Ponterosa, Pisa, Italie. E-mail: bracci@sssup.it
Carrasco Blasquez Lucia Caruso Tiziano	Espagne University of Palermo, Dipartimento di Colture Arboree, Viale delle Scienze, 11, 90128 Palermo Italy. E-mail: ticarus@unipa.it
Cegarra Juan	CSIC, Department of Soil and Water Conservation and Organic Waste Management, Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura, P.O. Box 164, 30100 Murcia, Spain. jcegarra@cebas.csic.es
Chaari K	Institut Supérieur Technologique de sfax, Route de Mahdia, km 2,5, el Boustan, BP 88, A-3099 Sfax Tunisie
Chadli L	Maroc
Chaouchao Moha	ORMVA Tafilalet, Maroc
Chartzoulakis Kosta	NAGREF, Institute for Olive Tree and Subtropical Plants of Chania, Agrokipio, 73100, Chania, Crete, Greece. E-mail: kchartz@nagref-cha.gr
Cheheb Mostapha	Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Laboratoire de Biotransformation, département des Sciences Nutritionnelle et Alimentaire BP 6202, Rabat, Maroc. E-mail: mcheheb@hotmail.com
Chimi H	Département des Sciences Alimentaires et Nutritionnelles; Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II ; P.B 6202 - Rabat (Maroc)
Clavier Henri	Societe DEVCO, Maroc. E-mail: filatis@filatis.com
D'Andria Riccardo	ISAFOM, Consiglio Nazionale delle Ricerche, I-80056, Ercolano, Italy. E-mail: r.d'andria@ispaim.na.cnr.it
Debagh H	Maroc. E-mail: adebbarh@enameknes.ac.ma
Derouich Ahmed	ORMVA Tafilalet, Maroc
Dhifi Wissal	INRST, Unite des plantes aromatiques et medicinales, BP95, Hammam-Lif 2050 Tunisie. E-mail: wissal_d2002@yahoo.fr

Di Giovacchino Luciano	COI Italie
Didi Mohamed	ORMVA Tafilalet, Maroc
Diwdaw	ORMVAT, Maroc
Dosba Françoise	COI France. E-mail: dosbaf@ensam.inra.fr
Dribi Alaoui My Llabib	ORMVA Tafilalet, Maroc
Droussi Zainab	Faculté des Sciences et Techniques Beni Mellal, Laboratoire d'Analyse et Valorisation des Ressources Environnementales, 23000 Beni Mellal Maroc. E-mail: zainabdroussi@yahoo.fr
Echbili Adel	Faculté de Médecine de Monastir, Laboratoire de Biochimie, USCR Spectrométrie de Masse, Unité de Recherche Nutrition Humaine et Altération métaboliques, Tunisie
Eid Mariam	COI Liban
El Hadrami Ismaïl	Faculté des Sciences Semlalia, Equipe Biotechnologies et Physiologie Végétales, Département de Biologie, BP 2390, 40000 Marrakech, Maroc. E-mail: hadrami@ucam.ac.ma; hadramii@hotmail.com
El Hajjouji Houda	Université Cadi Ayyad, Faculté des Sciences Semlalia, département de Biologie, Unité Sol et Environnement (Labo Eco-Veget), BP 2390, Marrakech, 40000 Maroc. E-mail: elhajjoujihouda@hotmail.com
El Hassani Fatima Zahra	Université Sidi Mohamed Ben Abdellah, Faculté des Sciences Dhar Mehrez, BP 1796 Atlas Fes 30000 Maroc. E-mail: elhassani3@yahoo.fr
El Idrysy Khalid	Cooperative Sidi Aissa d'huile d'olive, BP 25 Outat el haj Province de Boulemane 33300 Outat El Haj, Maroc. E-mail: el_idrissi35@caramail.com
El Mellali Lahcen	ORMVA Ouarzazate, Maroc
Elalaoui Hicham	Maroc
Ettalibi Moussa	Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Rabat, Maroc. E-mail: m.ettalibi@iav.ac.ma
Fakharedine Nawal	Université Cadi Ayyad, Faculté des Sciences Semlalia, département de Biologie, Unité Sol et Environnement (Labo Eco-Veget), BP 2390, Marrakech, 40000 Maroc. E-mail: nawalfakar@caramail.com
Fatni Mohamed	ORMVA Tafilalet, Maroc
Fki Ines	Centre de Biotechnologie de Sfax, Laboratoire des Bio-Procédés, BP K, 3038, Sfax, Tunisie. E-mail: inesfeki@yahoo.fr
Gallitelli Maria	Metapontum Agrobios, S.S. Jonica 106 km 448,6, 75010 Metaponto, Italie. E-mail: mgallitelli@agrobios.it
Gargouri Mohamed	INSAT, Institut National des Sciences Appliquées et de Technologie de Tunis, Equipe de Génie Enzymatique, BP 676, 1080 Tunis Cedex, Tunisie. E-mail: mohamed.gargouri@insat.rnu.tn; mhdgargouri@yahoo.fr
Guedin Isabelle	IRD, IFR-BAIM, ESIL Case 925 ; 163, Avenue de Luminy ; F-13288 - Marseille cedex 9, France. E-mail: iguedin@esil.univ-mrs.fr
Guerfel Moktar	Institut de l'Olivier, BP 40-4061, Sousse, Tunisie. E-mail: guerfel_mk@yahoo.fr
Guessous Fouad	Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Rabat, Maroc. E-mail: guessous@iav.ac.ma; dg@iav.ac.ma
Hachimi Larbi	Maroc. E-mail: loarc@casanet.net.ma
Hafidi Mohamed	Université Cadi Ayyad, Faculté des Sciences Semlalia, département de Biologie, Unité Sol et Environnement (Labo Eco-Veget), BP 2390, Marrakech, 40000 Maroc. E-mail: hafidi@ucam.ac.ma
Hamdi Moktar	INSAT, Unité de Recherche 'Procédés Microbiologiques et Alimentaires, BP 676, 1080 Tunis, Tunisie. E-mail: Moktar.hamdi@insat.rnu.tn

Hammami Mohamed	Faculté de Médecine de Monastir, Laboratoire de Biochimie, USCR Spectrométrie de Masse, Unité de Recherche Nutrition Humaine et Altération métaboliques, Tunisie. E-mail: mohamed.hammami@fmm.rnu.tn
Hammana Koraichi Malika Fadila	COI Algérie
Hanifi Siham	Faculté des Sciences Semlalia, Equipe Biotechnologies et Physiologie Végétales, Département de Biologie, BP 2390, 40000 Marrakech, Maroc
Harras M	Maroc. E-mail: ormvatf@menara.ma
Hassanpour Abolghasem	COI Iran
Hassouni Hicham	Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Laboratoire des Bioconversions, BP. 6202-Instituts, 10101 Rabat, Maroc. E-mail: hihass@caramail.com
Hemme Mohamed	ORMVA Tafilalet, Maroc
Hilali A	Maroc. E-mail: ahilali@iam.net.ma
Iconomou Dimitris	NAGREF, Institute of Biotechnology of Agricultural Products, 1 Sof. Venizelou Str. 14123, Lycovrissi, Greece. E-mail: diconomou@nagref.gr
Ismaili Alaoui Mustapha	Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Laboratoire des Bioconversions, BP 6202, Rabat, Maroc. E-mail: m.ismaili@iav.ac.ma
Jail Aasma	Maroc. E-mail: asmaa.jail@caramail.com
Jaoui Khadija	ORMVA Tafilalet, Maroc
Jardak Taieb	COI Tunisie. E-mail: jardak.taieb@iresa.agrinet.tn
Jari Fatima	ORMVA Tafilalet, Maroc
Kachouri Sonia	Tunisie
Kasraoui Mohamed Faouzi	Ecole Supérieure d'Horticulture et d'Elevage de Chott-Mariem, Département de Productions Horticoles, Laboratoire d'Arboricultures Fruitières, Sousse-TUNISIE
Khaldi Abdessalam	ORMVA Tafilalet, Maroc
Khoufi Sonia	Centre de Biotechnologie de Sfax, Laboratoire des Bio-Procédés, BP K, 3038, Sfax, Tunisie. E-mail: khoufisonia@yahoo.fr
Kiritsakis Apostolos	Technological Education Institute (TEI), Sindos Thessaloniki, Greece. E-mail: Kiritsak@food.teithe.gr
Kotti Faten	INSAT, Institut National des Sciences Appliquées et de Technologie de Tunis, Equipe de Génie Enzymatique, BP 676, 1080 Tunis Cedex, Tunisie. E-mail: kotti_faten@hotmail.com
Labat Marc	IRD (LMI), IFR-BAIM, Laboratoire de Microbiologie, Université de Provence et de la Méditerranée, ESIL case 925, 163, avenue de Luminy, 13288 Marseille cedex 9, France.. E-mail: labat@esil.univ-mrs.fr
Lacertosa Giovanni	Metapontum Agrobios, S.S. Jonica 106 km 448,6, 75010 Metaponto, Italie . E-mail: glacertosa@agrobios.it
Lapin Pierre Karim	Maroc
Lebrihi Ahmed	ENSAT, Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse, Laboratoire de Génie Chimique UMR5503 (CNRS-INPT-UPS), France. E-mail: lebrihi@ensat.fr
Lhasnaoui Lhassan	ORMVA Tafilalet, Maroc
Liebgott Pierre Pol	Université Cadi Ayyad, Faculty of Sciences & Techniques, Microbiological Engineering Group, PO. Box 549, M-40 000 Marrakech Morocco
Loupassaki M	Institute for Olive Tree and Subtropical Plants of Chania, Agrokkipio, 73100, Chania, Crete, Greece. E-mail: mloupas@nagref-cha.gr

Macarie Hervé	IRD, Unité BioTrans, IMEP Boite 441, Université Paul Cézanne, FST St Jerome, 13397 Marseille cedex 20, France. E-mail: herve.macarie@ird.fr
Magouri Ahmed	ORMVA Tafilalet, Maroc
Mai Sofia	National Technical University of Athens, Department of Chemical Engineering, 9, Heroon Polytechniou, 15770, Greece. E-mail: mai@central.ntua.fr
Makrionitis Meos	Ouarzazate Ouarzazate
Mansouri	Camelo, Vari, 84100 Syros, Greece
Marghi Moha	Maroc
Martinez Garcia Gonzalo	Maroc. E-mail: dpv@dpv.madrpm.gov.ma
Mdaghri Alaoui Sanae	Espagne. E-mail: gonzalmartgarc@hotmail.com
Mehdioui Ahmed	Université Sidi Mohamed Ben Abdellah, Faculté des Sciences Dhar Mehraz, BP 1796 Fes Maroc. E-mail: mdaghriaouis@yahoo.fr
Mekki Ali	ORMVA Tafilalet, Maroc
Merzouki Khalid	Centre de Biotechnologie de Sfax, Laboratoire des Bio-Procédés, BP K, 3038, Sfax, Tunisie. E-mail: sami.sayadi@cbs.rnrt.tn
Migkirou Christina	ORMVAM, Berkane, 60300 Maroc. E-mail: kmerzouki@hotmail.com
Minnocci Antonio	COI Grece
Mojthid	Scuola Superiore Sant'Anna di Studi Universitari e di Perfezionamento, I-56100, Pisa, Italy. E-mail: minnocci@sssup.it
Montel Gian Luca	Maroc
Motisi A	University of Foggia, Prime Department, Via Napoli 25, 71100 Foggia Italy. E-mail: g.montel@unifg.it
Moutawakil El Ghali	University of Palermo, Dipartimento di Colture Arboree, Viale delle Scienze, 11, 90128 Palermo Italy. E-mail: motisi@unirc.it
Mouttaqui Mohamed	ORMVA Tafilalet, Maroc
Naaza Idriss	ORMVA Tafilalet, Maroc
Nacir Moha	ORMVA Tafilalet, Maroc
Nadim Abderrahmane	ORMVA Tafilalet, Maroc
N'Ait M'Babak Assou	ORMVA Tafilalet, Maroc
Nargisse H	Maroc. E-mail: nargisse@awamia.inra.org.ma
Nyazi Khadija	Université Cadi Ayyad, Faculté des Sciences Semlalia, Laboratoire de Chimie Organique Appliquée, Unité Analyse et Environnement, BP 2390, Marrakech, Maroc. E-mail: nz_khadija@yahoo.fr
Ouazzani Noureddine	Ecole Nationale d'Agriculture, Equipe Olivier, Laboratoire de Marquage Génétique, BP S/40, 50000 Meknes Maroc. E-mail: nouazzani@hotmail.com
Oubrhou Ali	ORMVA Tafilalet. E-mail: oubrhou@netcourrier.com
Oulkaïd Malika	ORMVA Tafilalet, Maroc
Outahr Mohamed	ORMVA Tafilalet, Maroc
Perez Teresa	COI Italie
Perraud-Gaïme Isabelle	IRD, Unité BioTrans, IMEP Boite 441, Université Paul Cézanne, FST St Jerome, 13397 Marseille cedex 20, France. E-mail: i.gaïme@univ-cezanne.fr
Pfohl-Leszkwicz Annie	INP/ENSAT Institut-National Polytechnique de Toulouse, Lab Génie chimique UMR CNRS/INPT/UPS N° 5503, 1 av agrobiopole, 31326 Auzerville-Tolosane, France. E-mail: leszkowicz@ensat.fr
Qatibi Abdel Illah	Université Cadi Ayyad, Faculty of Sciences & Techniques, Microbiological Engineering Group, PO. Box 549, M-40 000 Marrakech Morocco. E-mail: qatibi@fstg-marrakech.ac.ma

Rahhou Ilham	Faculté des Sciences Semlalia, Laboratoire de Physiologie Végétale, Equipe Biotechnologies et Physiologie Végétale, B.P. 2390, 40001 Marrakech, Maroc
Rahmani Mohammed	Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, BP 6202, Rabat, Maroc. E-mail: m.rahmani@iav.ac.ma
Ramade Jean Claude	Groupe SOPROFEL, Immeuble Oumlil, angle rue hotel de ville N°44, Etage 4, 80000 Agadir Maroc. E-mail: rosaflor@iam.net.ma
Rappou Magdalini	COI Grece
Rhomari Yahya	ORMVAM, Berkane, 60300 Maroc. E-mail: yrhomari@caramail.com
Rjiba I	Faculté de Médecine de Monastir, Laboratoire de Biochimie, USCR Spectrométrie de Masse, Unité de Recherche Nutrition Humaine et Altération métaboliques, Tunisie
Roussos Sevastianos	IRD, Unité BioTrans, IMEP Boite 441, Université Paul Cézanne, FST St Jerome, 13397 Marseille cedex 20, France. E-mail: s.roussos@univ-cezanne.fr
Sahir A	Maroc
Salmon Oded	COI Israel
Samhale	Maroc
Sayadi Sami	Centre de Biotechnologie de Sfax, BP K3038, Sfax, Tunisie. E-mail: sami.sayadi@cbs.rnrt.tn
Sebastiani Luca	Scuola Superiore Sant'Anna di Studi Universitari e di Perfezionamento, I-56100, Pisa, Italy. E-mail: l.sebastiani@sssup.it
Senesi Nicola	University of Bari, Dipartimento di Biologia e Chimica Agroforestale ed Ambientale, Bari, Ita. E-mail: senesi@agr.uniba.it
Serrari Lahcen	ORMVA Tafilalet, Maroc
Servilli Maurizio	Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Sezione di Tecnologie e Biotechnologie degli Alimenti, Via S. Costanzo, 06126 - Perugia - Italy. E-mail: servimau@unipg.it
Soufiani Driss	Groupe SOPROFEL, Immeuble Oumlil, angle rue hotel de ville N°44, Etage 4, 80000 Agadir Maroc. E-mail: rosaflor@iam.net.ma
Spuig	Societe Pellenc, Maroc
Ssessa Ivor	Groupe SOPROFEL, Immeuble Oumlil, angle rue hotel de ville N°44, Etage 4, 80000 Agadir Maroc. E-mail: rosaflor@iam.net.ma
Stefanoudaki Evangelia	Institute of Olive Tree and Subtropical Plants, Agrokipio 73100 Chania, Greece. E-mail: estefan@nagref-cha.gr
Tadlaoui Jalil	Maroc. E-mail: filatis@filatis.com
Tomati Umberto	CNR Istituto di Biologia Agroambientale e Forestale, Area della Ricerca di Roma, via Salaria Km 29.300, Monterotondo Scalo (Rm), Italy. E-mail: umberto.tomati@ibaf.cnr.it
Touzani Ahmed	Maroc. E-mail: Iooc@internationaloliveoil.org
Trigui Ahmed	Institut de l'Olivier, BP1087, 3000 Sfax, Tunisie. E-mail: atroliv@hotmail.com; trigui.ahmed@iresa.agrinet.tn
Trubert	Societe Pellenc, Maroc
Varikou K	Institute of Olive tree and Subtropical plants, Agrokipio, 73100, Chania, Greece
Walali Loudyi D.M.	Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, BP 6202, 10101 Rabat, Maroc. E-mail: l.walali@iav.ac.ma
Zarrouk Mokhtar	INRST, Laboratoire de Caractérisation et Qualité de l'Huile d'Olive, BP 95-2050, Hammam-Lif, Tunisie. E-mail: mokhtar.zarrouk@inrst.rnrt.tn
Zeddouk Mohamed	ORMVA Tafilalet, Maroc

Table des matières

Sommaire	5
Préface	7
Identification of olive (<i>Olea europaea</i> L.) genotypes using SSR and RAPD markers	9
Michele LA MANTIA, Jennifer GUERIN, Margaret SEDGLEY & Ettore BARONE	9
1. Introduction	9
2. Materials and methods	9
2.1. Plant material and DNA extraction	9
2.2. RAPD analysis	10
2.3. SSR analysis	10
2.4. Identification of Mission samples	10
3. Results	10
3.1. RAPD and SSR	10
3.2. Mission identification	11
4. Conclusion	11
Effet du type d'explant, de l'acide tri-iodobenzoïque et du nitrate d'argent sur le microbouturage de l'olivier	15
Dou el Macane WALALI LOUDIYI, Abdelhadi ABOUSALIM & Asma SERHANI	15
1. Introduction	15
2. Matériel et méthodes	15
3. Résultats et discussion	16
3.1. Potentiel comparé des différentes sources d'explants à développer des bourgeons axillaires	16
3.2. Effet de l'acide 2,3,5- tri-iodobenzoïque (TIBA) sur le débourrement des bourgeons axillaires	18
3.3. Effet du nitrate d'argent sur le débourrement et le développement des bourgeons axillaires	20
4. Conclusion	21
Improving micropropagation and somatic embryogenesis protocols for olive tree (<i>Olea europaea</i> L.) cv. 'Moroccan Picholine'	23
Abdelhadi ABOUSALIM & Dou el Macane WALALI LOUDIYI	23
1. Introduction	23
2. Micropropagation	24
2.1. Improving the establishment and the reactivity of mature explants	24
2.2. Improving shoot proliferation	25
2.3. Improving in vitro rooting	25
3. Somatic embryogenesis	25

Effets de l'état physique du milieu et des subcultures sur les paramètres de croissance <i>in vitro</i> des microboutures de la Picholine marocaine	31
Dou el Macane WALALI LOUDIYI, Abdelhadi ABOUSALIM & Asma SERHANI	31
1. Introduction	31
2. Matériel et méthodes	31
2.1. Effets de l'état physique du milieu	31
2.2. Effets de l'intervalle de transfert	32
3. Résultats et discussions	32
3.1. Effets de l'état physique du milieu	32
3.2. Effets de l'intervalle de transfert	35
Effets du type et de la concentration de sucres sur l'induction et le développement des embryons somatiques chez l'olivier cv. Picholine marocaine	39
Abdelhadi ABOUSALIM, Dou el Macane WALALI LOUDIYI & Najiba BRHADDA ...	39
1. Introduction	39
2. Matériel et méthodes	39
2.1. Matériel végétal	39
2.2. Milieu et conditions de culture	39
2.3. Analyses statistiques	40
3. Résultats	40
3.1. Effets de la concentration de saccharose	40
3.1.1. Induction des cals	40
3.1.2. Développement des embryons somatiques et régénération des plantules	41
3.2. Effets du type de sucre	41
3.2.1. Induction des cals	41
4. Discussion	41
Enracinement <i>in vitro</i> et production de vitroplants d'olivier (<i>Olea europaea</i> L.) à partir d'arbres adultes	45
Abdelhadi ABOUSALIM, Najiba BRHADDA, Dou el Macane WALALI LOUDIYI & Doha BENALI	45
1. Introduction	45
2. Matériel et méthodes	46
2.1. Matériel végétal utilisé et méthode de désinfestation	46
2.2. Milieux et conditions de culture	46
2.3. Acclimatation des vitroplants	46
2.4. Analyses statistiques	46
3. Résultats	47
3.1. Interaction entre les concentrations d'auxine et l'âge de l'explant	47
3.1.1. Pourcentage d'enracinement	47
3.1.2. Nombre moyen de racines	48
3.1.3. Effet de la concentration d'auxine	48
3.1.4. Effet de l'âge de l'explant	48
3.1.5. Acclimatation des vitroplants	48
4. Discussion	49
Le secteur oléicole dans le Tafilalet. Situation actuelle et perspectives	53
Mohamed ZEDDOUK	53
1. Introduction	53

2. Situation actuelle	53
2.1. Évolution des effectifs de l'olivier plantés	53
2.2. Profil variétal	54
2.3. Production oléicole et sa destination	54
2.4. Rôle socio-économique de l'olivier	55
2.5. Répartition spatiale des oliveraies dans la zone	55
2.6.1. Vieillissement des plantations	56
2.6.2. Dominance de matériel végétal peu performant	57
2.6.3. Manque d'entretien	57
2.6.3.1. Fertilisation et irrigation	57
2.6.3.2. Taille et traitement phytosanitaire	57
2.6.4. Techniques de récolte mal conduites	57
2.6.5. Trituration traditionnelle	58
3. Intervention de l'ORMVA du Tafilalet	58
3.1. Régénération des vieilles plantations	58
3.2. Extension des superficies plantées en olivier	58
3.3. Amélioration de l'outil de transformation et de la qualité d'huile	58
4. Perspectives	59
 Mécanisation de la récolte des olives en Tunisie. Résultats et perspectives d'avenir	61
Hatem BENTAHER, Béchir BEN ROUINA & Kamel GARGOURI	61
 1. Introduction	61
2. Matériel et méthodes	61
2.1. Outils d'aide à la récolte des olives	61
2.1.1. Peignes plastiques	62
2.1.2. Peignes vibrants	62
2.1.3. Peignes rotatifs (Pick Machines)	62
2.1.4. Outils à doigts oscillants OLIVIERO	63
2.1.5. Secoueurs de branches	63
2.2. Récolte par vibreurs de tronc et de charpentières	64
3. Résultats et discussion	66
3.1. Outils d'aide à la récolte des olives	66
3.2. Récolte par vibreurs de tronc et de charpentières	66
 Olive (<i>Olea europaea</i> L.) responses to environmental constraints in Mediterranean agroecosystems	69
Luca SEBASTIANI, Riccardo D'ANDRIA & Roberto TOGNETTI	69
 1. Introduction	69
2. Water deficit	70
4. Low (freezing) temperatures	76
5. Atmospheric pollution	77
6. Concluding remarks	82
 Activité photosynthétique, fluorescence chlorophyllienne et relation hydrique chez l'olivier (<i>Olea europaea</i> L.) cvs. Chemlali et Chetoui durant un stress hydrique	89
Mohamed Faouzi KASRAOUI, Faouzi ATTIA, Mounir DENDEN, Mohamed BRAHAM, Hechmi MEHRI, Thierry LAMAZE & Marc GARCIA	89
 1. Introduction	89
2. Matériels et méthodes	90
2.1. Matériel végétal et milieu de culture	90

2.2. Méthodes de mesure	91
2.2.1. Potentiel hydrique foliaire de base	91
2.2.2. Assimilation photosynthétique	91
2.2.3. Fluorescence chlorophyllienne	91
2.3. Analyses statistiques	92
3. Résultats et discussion	92
3.1. Evolution du potentiel hydrique foliaire de base	92
3.2. Évolution de l'assimilation photosynthétique nette	92
3.3. Évolution du rendement quantique du PSII	94
3.4. Évolution du rendement quantique maximal du PSII	94
3.5. Évolution du taux de transfert des électrons	98
3.6. Évolution du quenching photochimique du PSII	98
4. Conclusion	101
Impacts de la nature du sol sur la vigueur et la production de l'olivier au Sud tunisien	105
Béehir BEN ROUINA, Ahmed TRIGUI, Mekki BOUKHRIS, Saïd JILANI,	
Abderrahmen OMRI & Anouar JRIBI	105
1. Introduction	105
2. Matériel et méthodes	106
3. Résultats et discussions	107
3.1. Granulométrie et composition chimique du sol dans les deux parcelles	107
3.2. Caractéristiques hydriques du sol dans les deux parcelles	108
3.2.1. Capacité au champ et point de flétrissement permanent	108
3.2.2. Évolution mensuelle de l'humidité du sol	109
3.2.3. Vitesse d'infiltration de l'eau de pluie	110
3.3. Mécanismes d'adaptation de l'olivier à la sécheresse	111
3.3.1. Système racinaire	111
3.3.2. L'appareil végétatif	112
3.4. Évolution au cours du temps de la production d'olives selon la nature du sol	113
4. Conclusion	115
Quelques aspects de la gestion de l'eau par l'olivier durant la sécheresse 2000-2002 en	
Tunisie aride	119
Béehir BEN ROUINA, Mekki BOUKHRIS, Ahmed TRIGUI, Saïd JILANI,	
Abderrahmen OMRI & Anouar JRIBI	119
1. Introduction	119
2. Matériels et Méthodes	120
3. Résultats	121
3.1. Photosynthèse	121
3.2. Conductance stomatique et transpiration	122
4. Conclusions	126
Conduite technique des oliveraies et impact sur les rendements en huile d'olive dans le	
périmètre du Tadla	129
Zehor AIT YACINE & Saïd HILALI	129
1. Introduction	129
2. Matériel et méthodes	130
3. Résultats et discussion	130
4. Conclusion	132

Essais d'évaluation des pertes causées par l'hylésine (<i>Hylesinus oleiperda</i> Fabr., Coleoptera, Scolytidae): approche du seuil de nuisibilité	135
Mohieddine KSANTINI, Taieb JARDAK & Imen BLIBECH HADHRI avec la collaboration de M. Chaari, M. Ghorbel, Ch. Saadaoui, H. Smiri & Mme Njeh Assawer	135
1. Introduction	135
2. Matériels et méthodes	135
3. Résultats	136
3.1. Manifestations et symptômes des dégâts	136
3.2.1. Parcelle n° 1	139
3.2.2. Parcelle n° 2	139
4. Conclusion	140
Study of the possibility to control olive powdery mildew (<i>Leveillula taurica</i>) with the use of soft and biological fungicides	143
Vagellis A. BOURBOS & Eleni A. BARBOPOULOS	143
1. Introduction	143
2. Methods and materials	144
3. Results	144
4. Discussion	145
Screening of salt tolerant <i>Olea europaea</i> L. seedlings by <i>in vitro</i> technology	147
Tania BRACCI, Antonio MINNOCCI & Luca SEBASTIANI	147
1. Introduction	147
2. Materials and Methods	148
2.1. <i>In vitro</i> experiment	148
2.2. Energy-dispersive X-ray microanalysis of frozen-hydrated leaf tissues	149
3. Results and discussion	149
3.1. Effects of the NaCl treatments on the <i>in vitro</i> olive plantlets growth	149
3.2. Distribution of Na, Cl and K in different leaf tissues	151
4. Conclusions	153
Élevage en masse des Trichogrammes spp. Amélioration des conditions de production ...	155
Imen BLIBECH, Mohiedine KSANTINI & Taieb JARDAK	155
1. Introduction	155
2. Matériel et méthodes	155
2.1. Production de l'hôte, <i>Ephestia kuehniella</i> ZELL. (Lepidoptera, Pyralidae)	155
2.1.1. Conditions d'ensemencement de l'aliment	156
2.1.1.1. Dispositif d'élevage utilisé	156
2.1.1.2. Milieu d'élevage	156
2.1.1.2.1. Aliment et dose appliquée	156
2.1.1.2.2. Œufs hôtes (qualité et quantité)	156
2.1.2. Conditions d'élevage	157
2.1.3. Collecte des adultes et mise en pondoirs	157
2.1.4. Ponte	157
2.1.4.2. Récolte des œufs	157
2.1.5. Paramètres contrôlés	158

2.1.6. Traitements et nombre de répétitions	158
2.2. Production des parasitoïdes du genre <i>Trichogramma</i>	158
2.2.1. Souches de trichogrammes testées	158
2.2.2. Durée de stockage au froid des œufs hôtes	158
2.2.3. Technique de parasitisme	158
2.2.4. Paramètre étudié	159
3. Résultats et discussions	159
3.1. Production de l'hôte, <i>Ephestia kuehniella</i> ZELL. (Lepidoptera, Pyralidae)	159
3.1.1. Effet des conditions d'élevage sur les durées de développement et d'émergence des imagos d' <i>Ephestia kuehniella</i>	159
3.1.2. Effet des conditions d'élevage sur la quantité d'adultes d' <i>E. kuehniella</i> sortis	161
3.1.3. Effet des conditions d'élevage sur la fécondité des adultes d' <i>E. kuehniella</i>	161
3.2. Impact de la qualité des œufs hôtes sur le potentiel biotique des parasitoïdes oophages du genre <i>Trichogramma</i>	163
3.2.1. Effet de la durée de stockage au froid sur la fécondité totale des deux souches de trichogrammes	163
4. Conclusion	165
Pig slurry as amendment of olive culture	169
Maria del Mar DELGADO, Rosario Miralles DE IMPERIAL, José Valero MARTÍN, Luisa BERINGOLA, Miguel Ángel PORCEL & Eulalia Maria BELTRÁN	169
1. Introduction	169
2. Materials and methods	169
3. Results and discussion	170
Mycoflore naturelle des olives dans les Maâsra et pouvoir toxigène des souches d' <i>Aspergillus</i> sur céréales	175
Sevastianos ROUSSOS, Nabila ZAOUIA, Ghislane SALIH, Abdelghafour TANTAOUI-ELARAKI, Khadija LAMRANI, Mostafa CHEHEB, Hicham HASSOUNI, Frédéric VERHÉ, Isabelle GAIME-PERRAUD, Christopher AUGUR & Mustapha ISMAILI-ALAOUI	175
1. Introduction	175
2. Matériel et Méthodes	177
2.1. Origine des échantillons	177
2.2. Milieu de culture pour l'isolement des souches	177
2.3. Milieux de culture pour l'identification des souches	177
2.4. Technique d'inoculation et d'isolement des souches	177
2.5. Conditions d'incubation	178
2.6. Purification et conservation des souches	178
2.7. Identification des souches	178
2.8. Cas des autres genres	178
2.9. Pouvoir toxigène des souches isolées	179
2.9.1. Culture de certaines souches sur des substrats amylacés (riz et blé)	179
2.9.2. Conditions de production de l'aflatoxine sur grains de riz	179
2.9.3. Conditions de production de l'ochratoxine A sur grains blé	179
2.9.4. Extraction et purification des mycotoxines (Af et OTA)	179
2.10. Préparation de la solution tampon Phosphate Buffered Saline (PBS)	180
2.11. Purification des mycotoxines sur colonne d'immunoaffinité	180
2.11.1. Concentration de l'extrait	180

2.12. Dérivation des aflatoxines	180
2.13. Analyse des mycotoxines par HPLC	181
2.13.1. Caractéristiques de l'HPLC	181
3. Résultats	182
3.1. Origine des échantillons	182
3.2. Répartition des souches de moisissures mésophiles dans les Maâsra	182
3.4. Répartition des <i>Aspergillus</i> isolés à partir des échantillons d'olives et de grignons d'olives	183
3.5. Toxinogénèse des souches d' <i>Aspergillus</i> cultivées sur des céréales	184
3.6. Production d'Aflatoxines par les souches d' <i>Aspergillus flavus</i> cultivées sur riz	184
3.7. Production de l'ochratoxine A sur grains de blé	185
3.7. Analyse de mycotoxines dans les échantillons d'huile d'olive	185
4. Discussion	186
5. Conclusions	188
Changes in phenolic content and antioxidant activity of Chemlali olive fruits during maturation	193
Mohamed BOUAZIZ, Hedya JEMAI & Sami SAYADI	193
1. Introduction	193
2. Materials and methods	193
2.1. Olive extract preparation	193
2.2. High-performance liquid chromatography	194
2.3. Total phenols measurement	194
2.4. DPPH radical scavenging effect	194
3. Results	195
3.1. Oleuropein and monomeric phenols	195
3.2. Flavonoids	195
3.3. Total phenols determination	196
3.4. Antioxidant potential of crude extracts during maturation	196
Stabilité oxydative (photooxydation) de l'huile d'olive vierge. Influence du degré de maturité des olives	199
Mohammed RAHMANI & Idrissia JANATI IDRISSE	199
1. Introduction	199
2. Photooxydation des huiles d'olives vierges: mécanisme et facteurs d'influence	200
2.1. Influence du degré d'insaturation de l'huile	201
2.3. Influence des tocophérols et du β -carotène	202
3. Détermination de la date optimale de récolte des olives (cv. Picholine marocaine)	203
3.1. Procédure expérimentale	204
3.2. Évolution des caractéristiques carpométriques	204
3.3. Évolution de l'humidité, des teneurs en huile et en polyphénols totaux	204
4. Conclusion	205
Optical inspection for quality separation of olive fruit	207
Serafim EFSTRATIADIS, Apostolos KIRITSAKIS, Aristotelis BIZOPOULOS, Fotis STERGIPOULOS, Demetrios BECHTSIS, Vasilios KILINTZIS, Antonis ANTONIADIS, Kostas KIRITSAKIS & Kostas KOKONAS	207
1. Introduction	207
2. The proposed method	207
3. Conclusions	214

Élaboration des olives vertes de table. Contrôle de la fermentation et amélioration du rendement	215
Abdeslam ASEHRAOU, Dulce BRITO, Mohamed FAID, Manuella OLIVEIRA & Cidalia PERES	215
1. Introduction	215
2. Matériel et méthodes	216
2.1. Préparation des olives	216
2.2. Analyses physico-chimiques	216
2.3. Analyses microbiologiques	216
2.4. Évaluation du taux d'altération	217
3. Résultats et discussion	217
Caractérisation et prétraitement des margines par la chaux	223
Fadila BOUKHOUBZA, Asmaa JAIL, Lahcen HASSANI & Ahmed NEJMEDDINE	223
1. Introduction	223
2. Matériel et méthodes	224
3. Résultats et discussion	224
3.1. Qualité physico-chimique des différentes margines étudiées	224
3.2. Prétraitement des margines par la chaux	225
4. Conclusion	226
Traçabilité et labellisation des produits de terroirs. Cas des huiles d'olives	229
My Mustapha ISMAILI-ALAOUI, Najib AKESBI, Sevastianos ROUSSOS & Ali HEDDOUN	229
1. Introduction	229
2. Importance la filière oléicole	230
3. Traçabilité et labellisation	230
3.1. Historique	230
3.2. Avantage et intérêt de la mise en place d'un label d'origine et de traçabilité	231
3.3. Types de traçabilité	233
3. Aspects réglementaires	234
4. Avantages de la traçabilité	236
4.1. Définition de la certification	236
5. Application des technologies mobiles pour la certification des produits de terroirs	237
6. Modèle prévisionnel pour l'application de la traçabilité	240
7. Conclusion	241
Tentative de modernisation des Maâsra traditionnelles. Unité mobile d'extraction des huiles d'olives	243
My Mustapha ISMAILI-ALAOUI & Ali HEDDOUN	243
1. Introduction	243
2. Objectifs	245
3. Situation des structures de production	247
3.1. Mesures d'accompagnement	247
3.2. Diffusion de la technologie	247

4. Conclusion	248
Évolution de la technologie d'élaboration de l'huile d'olive vierge en Espagne durant la décennie 1994-2004	259
José ALBA MENDOZA	259
Co-compostage des boues riches en polyphénols issues du traitement des margines	269
Nozha ABID, Fathi ALOUI, Abdelhafidh DHOUIB, Michel PENNINCKX & Sami SAYADI	269
1. Introduction	269
2. Matériel et méthodes	269
3. Résultats	270
3.1. Évolution des différents paramètres physico-chimiques au cours du compostage	270
3.1.1. pH et conductivité électrique	270
3.1.2. Cycle d'azote	271
3.1.3. Polyphénols	271
3.1.4. Caractéristiques physico-chimiques	273
4. Conclusion	273
Impact des margines traitées et non traitées sur la microflore nitrifiante et des formes azotées du sol	275
Ali MEKKI, Abdelhafith DHOUIB & Sami SAYADI	275
1. Introduction	275
2. Matériel et Méthodes	276
2.1. Incubation des sols	276
2.2. Matière sèche et contenu en eau du sol	276
2.3. Demande chimique en oxygène	276
2.4. Demande biologique en oxygène	276
2.5. Matière organique	276
2.6. Carbone organique total	276
2.7. Acidité (pH) et conductivité électrique	276
2.8. Azote total Kjeldahl	276
2.9. Dosage de l'ammonium	276
2.10. Azote organique	277
2.11. Germes totaux	277
2.12. Germes ammonium oxydant	277
2.13. Respirométrie	277
2.14. Dosage de l'uréase et de l'ammonium oxydase	277
3. Résultats et Discussions	277
3.1. Caractéristiques des margines	277
3.2. Évolution de la matière organique	278
3.3. Évolution des formes azotées du sol	278
3.4. Germes ammonium oxydants	279
3.5. Uréases et ammonium oxydases	280
3.6. Respirométrie	281
4. Conclusion	282
Electro-Fenton oxidation of olive mill wastewater phenolic compounds	285
Sonia KHOUFI, Michel PENNINCKX & Sami SAYADI	285
1. Introduction	285

2. Materials and methods	286
2.1. OMW fraction characterization	286
2.2. Electro-Fenton reaction	287
2.3. Bioluminescence toxicity test	287
3. Results and discussion	287
3.1. The effects of current density	288
3.2. The effect of hydrogen peroxide dose	288
4. Conclusion	290
Distribution écologique des champignons filamenteux thermophiles isolés à partir des principales Maâsra du Maroc	
Khadija LAMRANI, Mustapha ISMAILI-ALAOUI, Mostafa CHEHEB, Nizar KAMMAS, Lotfi IRAQI HOUSSAINI, Hicham HASSOUNI, Bernard RIO, Moussa ETTALIBI & Sevastianos ROUSSOS	293
1. Introduction	293
2. Matériel et méthodes	294
2.1. Échantillonnage	294
2.2. Collection des champignons filamenteux thermophiles et thermotolérants	294
2.3. Milieux de culture et conditions d'incubation	295
2.4. Isolement et entretien des souches	295
2.5.1. Clés d'identification	296
2.5.2. Caractérisation des souches thermophiles	296
2.5.3. Effet de la source de carbone	296
2.5.4. Détection sur milieu solide des activités enzymatiques	296
2.6. Comptage des spores	296
3. Résultats et discussion	297
3.1. Stratégie d'échantillonnage	297
3.2. Isolement	298
3.3. Purification et conservation	298
3.4. Identification	299
3.4.1. Identification de quelques espèces de champignons filamenteux thermophiles et thermotolérants	300
3.4.1.1. Identification du genre <i>Aspergillus fumigatus</i>	300
3.4.1.2. Identification du genre <i>Humicola</i>	300
3.4.1.3. Identification de <i>Paecilomyces variotii</i>	301
3.4.1.4. Identification du genre <i>Rhizopus</i>	301
3.5. Caractérisation physiologique	301
3.5.1. Recherche des champignons filamenteux thermophiles et thermotolérants	301
3.5.2. Effet de la source de carbone	302
3.5.3. Détection sur milieu solide des activités enzymatiques	303
3.6. Indice de sporulation	304
4. Conclusions	304
Effet antioxydant de <i>Lactobacillus plantarum</i> sur l'augmentation des composés phénoliques de l'huile d'olive	
Faten KACHOURI & Moktar HAMDI	307
1. Introduction	307
2. Matériel et méthodes	307
3. Résultats et discussion	309
4. Conclusion	311

Bioconversion des composés phénoliques de la margine par les bactéries lactiques	313
Nada BEN OTHMAN, Lamia AYED & Moktar HAMDİ	313
1. Introduction	313
2. Matériel et Méthodes	313
3. Résultats et Discussion	314
3.1. Fermentation de la margine fraîche par <i>Lactobacillus plantarum</i>	314
3.2 Fermentation de la margine traitée par <i>Pediococcus pentosaceus</i>	315
4. Conclusions	316
Production des bactéries lactiques et leurs potentialités d'applications aux produits de l'olivier.....	317
Nada BEN OTHMAN, Nadia CHAMMEM, Faten KACHOURI, Lamia AYED & Moktar HAMDİ	317
1. Introduction	317
2. Fermentation des olives de table	317
2.1. Production de <i>Lb. plantarum</i> Lb.NC18 en fermenteur	318
2.2. Processus d'élaboration des olives de table fermentées	319
4. Fermentation des margines par les bactéries lactiques	322
4.1. Fermentation de la margine par <i>Lactobacillus plantarum</i>	322
4.2. Décoloration de la margine traitée par <i>Pediococcus pentosaceus</i>	323
5. Conclusion et perspectives	327
Temporal evolution of the olive mill pomaces during composting	329
Gonzalo MARTÍNEZ, Juan Vicente GIRÁLDEZ, Rafaela ORDÓÑEZ & Pedro GONZÁLEZ	329
1. Introduction	329
2. Materials and methods	330
3. Results and discussion.	331
4. Conclusions	333
Powerful bio-active compounds from olive mill effluents	335
Noureddine ALLOUCHE, Mongi FEKI, Ines FKI & Sami SAYADI	335
1. Introduction	335
2. Materials and methods	336
2.1. Continuous-extraction procedure	336
2.2. Medium pressure liquid chromatography	336
2.3. Antioxidant activity determination	336
2.3.1. β -carotene bleaching method	336
2.3.2. Antioxidant activity in refined husk oil	336
3. Results and discussion	337
Isolement d'une nouvelle espèce bactérienne du genre <i>Bacillus</i> , transformant le p-hydroxyphényléthanol en acide p-hydroxy-phénylacétique à partir de saumures d'olives tunisiennes	341
Slim ABDELKAFI, Mohamed CHAMKHA, Laurence CASALOT, Jean LORQUIN, Sami SAYADI & Marc LABAT	341
1. Introduction	341
2. Matériel et Méthodes	341
2.1. Milieu de culture	341
2.2. Isolement et conservation des souches	342

2.3. Étude phylogénétique	342
2.4. Composition en (G+C)%	342
3. Résultats et discussions	342
3.1. Isolement et caractérisation physiologique	342
3.2. Caractérisation phylogénétique	343
3.3. Métabolisme du p-hydroxyphényléthanol	343
4. Conclusion	344
Conversion des tanins par <i>Lactobacillus plantarum</i>	345
Lamia AYED, Nada BEN OTHMAN, Nedra ASSAS, Mohamed HAMMAMI & Moktar HAMDİ	345
1. Introduction	345
2. Matériel et méthodes	345
2.1. Matériel biologique	345
2.2. Culture de <i>Lb. plantarum</i> sur milieux synthétiques supplémentés en tanins	345
2.3. Analyse des polyphénols par chromatographie en phase gazeuse (CPG) couplée à un spectromètre de masse (SM)	346
3. Résultats et discussion	346
4. Conclusion	347
Contribution à l'étude des effets protecteur et conservateur de quelques extraits d'olive et de composés phénoliques purifiés des margines	349
Ines FKI & Sami SAYADI	349
1. Introduction	349
2. Résultats et discussion	350
2.1. Extraction et identification de la fraction monomérique des margines	350
2.2. Mesure de l'activité antiradicalaire des composés phénoliques extraits des margines	351
2.3. Étude du pouvoir antioxydant des composés phénoliques en milieu aqueux	351
2.4. Étude de la stabilité des huiles raffinées par les composés phénoliques	352
2.4.1. Étude de la stabilité des huiles raffinées par l'extrait des margines	352
2.4.2. Étude de la stabilité des huiles raffinées par les composés phénoliques	353
Headspace extraction and identification of Tunisian virgin olive oil aroma components ..	355
Wissal DHIFI, Ibtissem HAMROUNI, Ibrahima OUMAR, Franca ANGEROSA, Arnaldo SERRAIOCCO, Samih ESHIMI, Amor BELLILA, Mohamed Elyes KCHOUK & Brahim MARZOUK	355
1. Introduction	355
2. Materials and methods	356
2.1. Oil extraction	356
2.2. Volatile compounds extraction	356
2.3. GC analysis	356
2.4. GC-MS analysis	356
3. Results	356
High value compounds from olive mill wastes	361
Umberto TOMATI, Francesca DI MARIO, Emanuela GALLI & Pompilio RAPANÀ	361
1. Introduction	361
2. Basidiomycete biopotentialities and biotechnologies	362
2.1. Mycelial growth on OMW	364
2.2. Extraction process	364
2.3. β -D-glucans	364

2.4. Chitin and chitosan	366
2.5. Fungal biomasses for biosorption	370
3. Conclusions	371
A common policy to face the problem of olive oil mill wastes	375
Umberto TOMATI & Emanuela GALLI	375
1. Introduction	375
2. Waste production	376
3. Olive oil by-products: waste or resources?	377
4. Environmental impact	377
4.1. Discolouring of natural waters	377
4.2. Threat to aquatic life	377
4.3. Surface and ground water pollution	378
4.4. Soil quality and plant growth	378
4.5. Odours	378
5. The use of omw as a soil conditioner	378
6. Regulation	379
6.1. The E.U. regulation	379
6.2. National regulation	380
6.2.1. Spain	380
6.2.2. Italy	380
6.2.3. Portugal	381
6.2.4. Greece	381
7. The stones for a common and rational regulation	381
7.1. Knowledge of the state of the olive mill industry	381
7.2. Environmental knowledge	381
7.3. Choice of technologies proposed for waste disposal and the possibility of using them in an efficient and economic way	381
7.4. National regulation and ecopolicy	382
8. Conclusions	382
Use of a selected strain of <i>Lactobacillus pentosus</i> in the production of black- (Itrana and Leccino Cv.) table olives at pilot plant-scale	383
Maurizio SERVILI, Gian Francesco MONTEDORO, Gianluca VENEZIANI, Sonia ESPESTO, Ombretta MASSITTI, Agnese TATICCHI, Stefania URBANI & Aldo CORSETTI	383
1. Introduction	383
2. Material and methods	388
2.1. LAB isolation and preliminary identification assays	388
2.2. Physiological characterization of LAB	388
2.3. Phenotypic and genotypic identification of LAB	388
2.4. Olive samples	388
2.5. Inoculation and pilot plant-scale fermentation	388
2.6. Microbiological analyses	389
2.7. Physicochemical analyses	389
2.8. Phenolic compounds analysis	389
2.9. Sensory analysis	389
3. Results and discussion	389
3.1. LAB isolation, preliminary identification and physiological characterization	389
3.2. Phenolic composition of olives and sensory analysis	394
4. Conclusions	398

Atelier 1. Génétique, marqueurs moléculaires, variétés d'oliviers adaptés à l'aridité

Apport des biotechnologies de marquage génétique à la caractérisation et à la valorisation des ressources génétiques de l'olivier	401
N. OUAZZANI , A. IDRISSE & M. ESSADKI	401
Effect of genotype-environment interaction on chemical characteristics of virgin olive oil	402
S. BEN TEMIME, L. ABAZA, B. BACCOURI, W. TAAMALLI, N. BEN YOUSSEF, D. DAOUD & M. ZARROUK	402
Lipogenesis and oil composition of nine olive descendants obtained through controlled crossings with Chemlali variety	403
H. MANAI, F. MAHJOUR HADDADA, A. YANGUI, A. TRIGUI, D. DAOUD & M. ZARROUK	403
Changes in olive oil quality according to genetical and environmental factors	404
L. ABAZA, W. TAAMALLI, S. BEN TEMIME, A. ALLALOUT & M. ZARROUK	404
Variability of olive oil quality as related to cultivar and agronomic factors in Sicily	405
A. MOTISI, G. CAMPISI, T. CARUSO, L. CATAGNANO, R. SACCHI, M.L. AMBROSINO & C. FINOLI	405
Morphological, phenological and molecular characterization of the Sicilian indigenous olive (<i>Olea europaea sativa</i> L.) germplasm	406
TIZIANO CARUSO, G. CAMPISI, A. MOTISI, M. LA MANTIA, G. OCCORSO, D. CARTABELLOTTA, O. LAIN & R. TESTOLIN	406
La verticilliose de l'olivier. Mécanismes de défense de l'hôte et facteurs de pathogénicité du parasite.	407
B. RAHIOUI, J. CHARAFI, E. EL BOUSTANI, A. EL MEZIANE, B. BOULOUHA & C. EL MODAFAR	407
Étude technologique de sept nouvelles variétés d'olivier Tunisiennes issues de croisements inter-variétaux	409
S. DABBOU, I. RJIBA, A. ECHBILI, A. YANGUI, N. GAZZAH, I. CHERAIF, M. HAMMAMI & A. TRIGUI	409
Sélection variétale et amélioration génétique ciblée par croisement de l'olivier en Tunisie: potentiel et acquis	410
A. TRIGUI, M. HAMMAMI, M. ZARROUK, N. GAZZAH, A. YANGUI, H. BELGOUTH, H. MANNAI, D. KRICHÈNE, I. RJIBA, S. DABBOU & A. TOUIL	410
Étude de la diversité de l'olivier au Maroc. Caractérisation par traitement d'images et analyse moléculaire	411
B. BOULOUHA, L. SIKAOUI, A. BARI, I. ELOUAFI, M. NACHIT, A. EL HEIRECH & P. MATHUR	411
Oxidative stability of monovarietal virgin olive oil of cv Carrasquinha in Beira Interior (Portugal)	412
M.F. PERES, L.R. HENRIQUES, P. SIMÕES-LOPES & M.C. PINHEIRO-ALVES	412
Olive oil composition of some descendants obtained through controlled crossings on Meski cultivar	413
H. TRABELSI, B. BACCOURI, A. ALLALOUT, W. TAAMALLI, N. BEN YOUSSEF, D. DAOUD & M. ZARROUK	413

Acidic composition and oil contents of three populations of oleasters	414
B. BACCOURI, A. ALLALOUT, S. BEN TEMINE, W. TAAMALLI, L. ABAZA, D. DAOUD & M. ZARROUK	414
Caractérisation biochimique et moléculaire de la résistance de l'olivier à la maladie de l'œil de paon causée par <i>Spilocaea oleagina</i>	415
J. CHARAFI, B. RAHIOUI, A. EL MEZIANE, A. MOUKHLI, B. BOULOUHA, C. EL MODAFAR & B. KHADARI	415
Caractérisation chimique des huiles de quelques descendants de croisements dirigés de l'olivier Chemlali Sfax	417
I. RJIBA, A. ECHBILI, S. DABBOU, N. GAZZEH, A. YENGUI, H. BELGUTH, M. HAMMAMI & A. TRIGUI	417
Characterization, identification and utilization of autochthonous olive plant material in Crete	418
I. METZIDAKIS, N. NIKOLOUDAKIS & P. HATZOPOULOS	418
<i>Atelier 2. Agronomie, résistance au stress hydrique, développement durable des zones arides</i>	
Salinity and olive: growth, salt tolerance, photosynthesis, yield and management practices	419
K. CHARTZOULAKIS	419
Behaviour of some olive varieties introduced in Tunisia	420
F. MAHJOUB HADDADA, H. MANAI, D. DAOUD & M. ZARROUK	420
Durabilité de l'olivier en milieu aride tunisien	421
A. TRIGUI, A. YANGUI, H. BELGUTH & B. BEN ROUINA	421
Problématique de développement de la culture de l'olivier dans la vallée de Ziz (cas du Douar Ait Youssef ou Daoud)	422
H. ABOUCHARIF	422
Bioecology of the flowering phenomenon: possible use for early forecast olive yield model	423
F. ORLANDI, H. GARCIA-MOZO, B. ROMANO, C. GALAN, E. DOMÍNGUEZ & M. FORNACIARI	423
Effets de l'épandage simultané des margines et du phosphate naturel sur le statut nutritionnel du sol (P et K) dans une culture d'olivier (<i>Olea europaea</i> L. variété Chemlali)	424
B. MECHRI, M. BRAHAM, S. BEN ELHADJ & M. HAMMAMI	424
Place des composés phénoliques dans la phytotoxicité des margines: cas du maïs	425
M. BELAQZIZ, A. EL HADRAMI, S. HANIFI, A. ABBAD & I. EL HADRAMI	425
Caractérisation du comportement hydrique de quelques cultivars d'olivier (<i>Olea europaea</i> L.) cultivés en Tunisie en conditions de sécheresse	426
M. GUERFEL, D. BOUJNAH & M. ZARROUK	426
GF-120* Naturalyte insect control product. Field performance for the control of olive fruit fly (<i>Bactrocera oleae</i> Gmel) on olive trees by bait application in the Mediterranean countries	427
P. VERGOULAS, C. MAVROTAS, C. JOUSSEAUME & E. ALIMIS	427

Interaction Olivier-Psyllé. Analyse de quelques paramètres biochimiques en rapport avec l'infestation des cultivars par l'insecte ravageur <i>Euphyllura olivina</i> Costa	429
I. RAHOU, A. HILAL, Y. OUGASS, A. ABBAD & I. EL HADRAMI	429
Effect of temperature on the development and on other biological parameters of the parasitoid <i>Pnigalio pectinicornis</i> (Linnaeus) (Hymenoptera: Eulophidae)	430
A.P. KALAITZAKI, D.P. LYKOUSSIS, S.E. MICHELAKIS & V.Z. ALEXADRAKIS	430
Impact de l'utilisation des eaux usées traitées sur les caractéristiques chimiques du sol et la nutrition minérale de l'olivier Chemlali	431
S. BEDBABIS, B. BEN ROUINA & M. BOUKHRIS	431
Effet de l'épandage des margines sur la biomasse microbienne et la nitrification du sol dans une culture d'olivier (<i>Olea europaea</i> L. variété Chemlali)	432
B. MECHRI, M. BRAHAM, S. BEN ELHADJ & M. HAMMAMI	432
Plan National Oléicole	433
M. ISMAILI-ALAOUI, N. AKESBI, N. ELYASSAMI & O. ZEMRANI	433
Effect of irrigation and growing location on the quality characteristics of olive oil (cv Marsaline)	434
O. BACCOURI, W. TAAMALI, D. KRICHÈNE, M. ZARROUK & D. DAOU BEN MILED	434
Interaction olivier - psyllé (<i>Euphyllura olivina</i> Costa). Les composés phénoliques constitutifs peuvent-ils être des substituants potentiels des insecticides?	435
N. ZOUITEN & I. EL HADRAMI	435
<i>Sphaeropsis dalmatica</i> (Thum.) gigante, a causal agent of olive fruit rot in Montenegro .	436
J. LATINOVIC, J. TIODOROVIC & Z. VUCINIC	436
Assessing the effectiveness of mycorrhizal inoculation and soil compost addition on <i>Olea europaea</i> subsp. <i>sylvestris</i> seedlings through changes in soil biological and physical parameters	437
A. ROLDÁN, F. CARAVACA & D. FIGUEROA	437
Effet des extraits phénoliques à partir de margines ou de jeunes pousses d'olivier sur les taux d'infestation de l'olivier par <i>Euphyllura olivina</i> Costa	438
I. RAHOU, A. HILAL, Y. OUGASS, A. ABBAD & I. EL HADRAMI	438
Review of expansion olive culture in Iran Golestan Province	439
M. YAGHBANI	439
Study of the effectiveness of Mass Trapping and new products for the control of the olive fruit fly <i>Bactrocera oleae</i> (Gmelin) (Diptera: Tephritidae) in organic olive grooves ..	440
K. VARIKOU, V. ALEXANDRAKIS & A. KALAITZAKI	440
Olive orchard management for the improvement of quality and productivity and natural resources conservation in sloping land	441
I. METZIDAKIS, C. COSMAS & V. KASSIDONIS	441
Fertilizing practices used and nutritional status of olive orchards in the area of Crete	442
M. LOUPASSAKI, A. DIGALAKI, C. PSARRAS, K. CHARTZOULAKIS & J. ANDROULAKIS	442

Atelier 3. Technologie, récolte et post-récolte, transformation des olives, qualité et sécurité

Presence of moulds during olive post harvest process in Morocco and detection of mycotoxins in the end products	443
S. ROUSSOS, C. AUGUR, I. PERRAUD-GAIME, B. RIO, M. CHEHEB, G. SALIH, K. LAMRANI & M. ISMAILI-ALAOUI	443
Essai de lutte biologique contre les champignons de pourriture des olives	444
M. GHARSALLAOUI, A. RHOUMA, M. KHLIF & S. REBAI	444
Improving the olive oil quality by increasing the concentration of its natural antioxidants during processing	445
P. RODIS, G. MONTEODORO, J. ALBA MENTOZA, D. ICONOMOU, M. SERVILLI, R. GUILLEN & E. STEFANOUDAKI	445
Influence on olive oil quality of mixing in nitrogen atmosphere	446
P. AMIRANTE, A. TAMBORRINO, A. LEONE, G.L. MONTEL & G. DUGO	446
Effet du talc sur le taux d'extraction et la qualité de l'huile d'olive	447
M. AYADI	447
Nouvelle méthode de mesure de la teneur en acides gras polyinsaturés dans l'huile d'olive par couplage de deux enzymes	448
I. BEN REJEB, J. BEN HAMIDA & M. GARGOURI	448
Caractérisation chimique et organoleptique des huiles d'olive issues des Maâsra de la région d'Essaouira (Maroc)	449
A. EL ANTARI, A. EL MOUDNI, H. AJANA, C. MARION, S. PERES, A. PROFITT, M.L. AMBROSINO & R. SACCHI	449
Oil quality of some foreign varieties used for intensive culture	450
A. ALLALOUT, B. BACCOURI, D. DAOUD & M. ZARROUK	450
Small sized olive oil extraction plant for high quality local productions	451
P. AMIRANTE & L. BACCIONI	451
Optical inspection and automatic quality separation of olive fruit for production of table olives and olive oil	452
A. KIRITSAKIS, S. EFSTRATIADIS, F. STERGIPOULOS, K. KIRITSAKIS & E. SOKOUTI	452
Use of a selected strain of <i>Lactobacillus pentosus</i> in the production of naturally fermented green- (var. Nocellara del Belice) and black- (var. Itrana and Leccino) table olives at laboratory and industrial scale	453
M. SERVILI, G.F. MONTEODORO, J. ROSSI, G. VENEZIANI, S. ESPOSTO, O. MASSITTI, A. TATICCHI & A. CORSETTI	453
Identification par GC/Olfactométrie et GC/MS des composés odorants de l'olive verte de table et variation de la composition au cours du procédé de fabrication	454
R. IRAQI, A. BENZEKRI, A. BOUSETA, D. BOUYA, S. COLLIN & A. LEBRIHI	454
Major and minor components of virgin olive oil from some tunisian cultivars	455
L. ABAZA, S. BEN TEMIME, W. TAAMALLI, D. DAOUD & M. ZARROUK	455
Determination of harvesting time and effects of storage conditions of olive fruit on quality and quantity of its oil on superior cultivars of Iran	456
J. MOHAMADZADEH	456

Performances de l'unité mobile de trituration des olives	457
M. ISMAILI-ALAOUI, N. AKESBI, N. ELYASSAMI & O. ZEMRANI	457
Étude du comportement des oléiculteurs face aux nouveaux services offerts par la Maâsra mobile	458
M. ISMAILI-ALAOUI, N. AKESBI, N. ELYASSAMI & O. ZEMRANI	458
Effect of commercial enzymes treatment during olive paste malaxation on qualitative characteristics of virgin olive oil	459
E. STEFANOUDAKI, D. ICONOMOU, A. KOUTSAFTAKIS, C. ISRAILIDES, A. PAPAMANOLIOUDAKI & D. ARAPOGLOU	459
Étude préliminaire de la stabilité oxydative de l'huile d'olive vierge	460
F. KOTTI, M. ISMAILI-ALAOUI & M. GARGOURI	460
Caractérisation des huiles de quelques cultivars et types locaux tunisiens et de leurs clones sélectionnés	461
A. ECHBILI, I. RJIBA, S. DABBOU, N. GASA, A. YENGUI, H. BELGUITH, M. HAMMAMI & A. TRIGUI	461
Bacteriocins produced by olive lactics and table olive quality	462
M.D. BRITO, A.M. DELGADO, L. CATULO, F. QUINTANS & C. PERES	462
Conditions de trituration des olives dans la plaine de Tadla et analyse comparative des sous-produits de quelques huileries	463
Z. DROUSSSI, M. BEN SALAH, M. HAFIDI & A. OUATMANE	463
Étude préliminaire concernant la présence de mycotoxines (aflatoxine B et ochratoxine A) dans des olives noires prélevées au Maroc	464
C. EL ADLOUNI & A. PFOHL-LESZKOWICZ	464
Cold storage of 'Coratina' olives in air and controlled atmosphere	465
G. COLELLI, M.L. CLODOVEO & G.L. MONTEL	465
Mycoflore des Maâsra marocaines. Toxinogénèse des souches isolées d' <i>Aspergillus flavus</i> et d' <i>Aspergillus niger</i>	466
G. SALIH, A. TANTAOUI-EKARAKI, K. LAMRANI, M. ISMAILI-ALAOUI, M. CHEHEB, H. HASSOUNI, B. RIO, I. GAIME-PERRAUD, C. AUGUR & S. ROUSSOS	466
Contribution à l'étude de l'oxydation de l'huile d'olive vierge extra, traitée par filtration par gravité et sous pression	467
K. CHAARI & S. SAYADI	467
The influence of the extraction methods on antioxidant content in virgin olive oil	468
G. LACERTOSA, E. TRAMONTANO, E. ACITO, A. PETROZZA & F. CELLINI	468
Valorisation de la production oléicole dans le Tafilalet. Expériences et perspectives d'avenir	469
M. CHAOUCHAOU	469
Effect of genotype-environment interaction on chemical characteristics of virgin olive oil	470
S. BEN TEMIME, L. ABAZA, B. BACCOURI, W. TAAMALLI, N. BEN YOUSSEF, D. DAOUD & M. ZARROUK	470

Changes in olive oil quality according to genetical and environmental factors	471
L. ABAZA, W. TAAMALLI, S. BEN TEMIME, A. ALLALOUT & M. ZARROUK	471
Variability of olive oil quality as related to cultivar and agronomic factors in sicily	472
A. MOTISI, G. CAMPISI, T. CARUSO, L. CATAGNANO, R. SACCHI, M.L. AMBROSINO & C. FINOLI	472
Presentation of a EU Programme on the integrated approach to sustainable olive oil and table olives production (INASOOP)	473
C. ISRAILIDES, P. GALIATSATOU, D.ICONOMOU, E.STEFANOUDAKI, A.KOUTSAFTAKIS, A. ARAPOGLOU, TH. VARZAKAS, S. PANAGOU, N. CHRISTOPOULOU & A. VLYSSIDES	473
Comparaison technico-économique de l'unité mobile avec les autres unités de trituration des olives au Maroc	474
M. ISMAILI-ALAOUI, N. AKESBI, N. ELYASSAMI & O. ZEMRANI	474
<i>Atelier 4. Biotechnologies pour la valorisation des co-produits et protection de l'environnement</i>	
Composting two-phase olive pomace ("alperujo") and testing the agricultural potential of the resulting compost	475
J. CEGARRA, J.A. ALBURQUERQUE, A. ROLDAN & G. TORTOSA	475
Co-composting of sludge from olive oil mill wastewater mixed with tree cuttings	476
N. SENESI, C. PLAZA, G. BRUNETTI & D. MONDELLI	476
Biotechnological composting olive oil mill wastewaters and residues for mediterranean sustainable agriculture (COMPMED)	477
G. RANALLI, G. ALFANO, C. BELLI, G. LUSTRATO, E. ZANARDINI & C. SORLINI	477
Biocontrol of fungal phytopathogens by two phase olive husks residues biotechnological composted.	478
G. Ranalli, G. Alfano, C. Belli, G. Lustrato & G. Lima	478
Treatment of high organic and toxic strength effluents using the method of co-composting with organic residuals	479
A. VLYSSIDES, M. LOIZIDES, E.M. BARAMPOUTI & S. MAI	479
Évolution des polyphénols et de la phytotoxicité au cours du co-compostage des boues de margines	480
N. ABID, A. DHOUIB, F. ALOUI, M. PENNINGCKS & S. SAYADI	480
Pilot plant operation of a novel system of oil milling wastewater using the Fenton method and recycling of byproducts in agriculture	481
A. VLYSSIDES, C. ISRAILIDES, C. LOUKAKIS, S. MAI, E.M. BARAMPOUTI, D. ARAPOGLOU & M. DROUKA	481
Comparaison de certains paramètres physico-chimiques et de la charge phénolique des margines. La mise en place d'une solution de détoxification est-elle envisageable ?..	482
S. HANIFI, M. BELAQZIZ, A. ABBAD & I. EL HADRAMI	482
Suivi des transformations des margines traitées par bio-procédé aérobie par chromatographie sur gel de sephadex	483
H. EL HAJJOUJI, N. FAKHARELINE, G. AIT BADDI, J.C. REVEL & M. HAFIDI	483

Étude comparative de trois technologies de culture cellulaire sur les margines	484
S. MDAGHRI ALAOUI, F.Z. EL HASSANI, F. ERRACHIDI, H. AISSAM & M. BENLMILH	484
La production des bactéries lactiques et leurs potentialités d'applications aux produits de l'olivier	485
M. HAMDI	485
Potentialité des bactéries pour la valorisation des margines d'olives. Cas d'une bactérie isolée d'un bassin d'évaporation de margines situé au Maroc	486
A. QATIBI, A. ELASLI, J. LORQUIN, P.P. LIEBGOTT, R. BENNISSE & M. LABAT ..	486
Valorisation des effluents liquides de l'industrie oléicole par extraction de l'antioxydant majeur, l'hydroxytyrosol. Effet de la variabilité des margines sur la quantité produite	487
N. ALLOUCHE & S. SAYADI	487
Valorisation non alimentaire des sous-produits de l'industrie oléicole (grignons d'olive et margines)	488
K. NYAZI, A. OUNAS, A. YAACOUBI, A. BACAOUI & C. BENNOUNA	488
Valorisation de sous-produits d'oléiculture. Utilisation comme source d'enzymes pour la production de note verte	489
N. BEN AKACHA, O. BOUBAKER & M. GARGOURI	489
Traitement des margines par des micro-organismes adaptés physiologiquement	490
H. AISSAM, F. ERRACHIDI, M. PENNINGCKX, M. MERZOUKI & M. BENLEMLIH	490
Essai de traitement des margines à l'aide d'un réacteur aérobie de type « jet loop »	491
A. JAIL, F. CHAMKH, M.J. REIDA, F. BOUKHOBZA, A. NEJMEDDINE, J.C. DUARTÉ & L. HASSANI	491
Biocontrol of fungal phytopathogens by two phase olive husks residues biotechnological composted	492
G. RANALLI, G. ALFANO, C. BELLI, G. LUSTRATO & G. LIMA	492
Olive oil mill wastes re-use: UE technical legislation and spreading system proposals	493
P. AMIRANTE, B. BIANCHI & G.L. MONTEL	493
Vermicomposting as an alternative to obtain value-added agricultural products from olive-mill wastes	494
E. BENÍTEZ, B. MORENO, E. ROMERO, J.D. FERNANDEZ, A. POLO & R. NOGALES	494
Effet de l'épandage des margines sur la biodiversité microbienne du sol	495
F.Z. EL HASSANI, S. MDAGHRI ALAOUI, H. AISSAM, F. ERRACHIDI, M. MERZOUKI, M. EL HASSOUNI & M. BENLEMLIH	495
Valorisation et détoxification des effluents liquides des huileries d'olives	496
N. FAKHAREDINE, G. AIT BADDI, H. HAMDI & M. HAFIDI	496
Aerobic biodegradation of olive mill wastes and maturation monitoring by the follow of humic acids evolution	497
G. AIT BADDI, M. HAFIDI, V. GILARD & P. RAMOS	497

Utilisation des margines dans la lutte contre l'orobanche, un parasite des légumineuses alimentaires	498
K. SAFFOUR, D. BOUYA & M. BOUHACHE	498
Essai de traitement des margines par des procédés innovants à base de plantes aquatiques	499
M. ACHAK, L. MANDI & N. OUZZANI	499
Isolement et sélection des champignons filamenteux thermophiles à partir de Maâsra au Maroc pour la production des phytases sur grignon d'olive	500
L.H. IRAQI, K. LAMRANI, M. ISMAILI-ALAOUI, M. CHEHEB, N. KAMMAS, H. HASSOUNI, B. RIO, I. GAIME-PERRAUD, C. AUGUR & S. ROUSSOS	500
Isolement et sélection des champignons filamenteux thermophiles à partir des Maâsra au Maroc pour la production de tannase sur grignons d'olive	501
N. KAMMAS, K. LAMRANI, M. ISMAILI-ALAOUI, M. CHEHEB, H. HASSOUNI, L.H. IRAQI, B. RIO, I. GAIME-PERRAUD, C. AUGUR & S. ROUSSOS	501
Biodégradation et bioremédiation des margines dans le sol	502
S. KACHOURI, N. LÂADHAR & M. HAMDİ	502
Décoloration des composés phénoliques de la margine par les bactéries lactiques	503
N. BEN OTHMAN, L. AYED & M. HAMDİ	503
Utilisation des grignons d'olive pour la production de spores des champignons filamenteux producteurs d'enzymes (lipases et tannases)	504
H. HASSOUNI, M. ISMAILI-ALAOUI, K. LAMRANI, M. CHEHEB, B. RIO, I. GAIME-PERRAUD, C. AUGUR & S. ROUSSOS	504
Préparation d'aliment pour bétail à partir des grignons d'olives marocaines	505
M. ISMAILI-ALAOUI & M. CHEHEB	505
Cold storage of 'Coratina' olives in air and controlled atmosphere	506
G. COLELLI, M.L. CLODOVEO & G.L. MONTEL	506
Pour la paix, que chacun plante un olivier!	507
M. ETTALIBI	507
<i>Conclusions et recommandations des ateliers thématiques</i>	
Compte rendu de l'atelier n° 1. Génétique, marqueurs moléculaires et sélection variétale	509
1. Introduction	509
2. Recommandations	510
2.1. Gestion, évaluation et valorisation des ressources génétiques au niveau méditerranéen	510
2.2. Mise en valeur des terroirs, des qualités et typicités des produits méditerranéens	510
2.3. Amélioration de la qualité du matériel végétal et de ses dérivés	510
Compte rendu de l'atelier n° 2. Agronomie et stress hydrique et protection des plantes ...	511
1. Introduction	511
2. Recommandations	512
Compte rendu de l'atelier n° 3. Technologie, récolte et post-récolte, transformation des olives, qualité et sécurité	513
1. Introduction	513

2. Récolte mécanique des olives	513
3. Effet du stockage sur la qualité sanitaire des fruits	513
4. Développement d'une technique automatique pour l'inspection optique des olives	513
5. Influence de la date optimale de récolte et de la technologie sur le contenu de l'huile en polyphénols	513
6. Action de la lumière sur la stabilité oxydative de l'huile d'olive	514
7. Utilisation de bactéries lactiques sélectionnées pour l'élaboration des olives de table ..	514
8. Aspects de traçabilité	514
Compte rendu de l'atelier n° 4. Biotechnologies pour la valorisation des co-produits et protection de l'environnement	515
1. Introduction	515
2. Problèmes soulevés par les différentes technologies	515
2.1. Compostage	515
2.2. Traitements physico-chimiques et biologiques	516
2.3. Récupération des produits, transformation et sources de biodiversité	516
3. Législation	516
4. Conclusion	516
Synthèse de clôture du premier séminaire (OliveBioteq 2004) «Biotechnology and quality of olive tree products around the Mediterranean basin» «Biotechnologies et qualité des produits de l'olivier dans le bassin méditerranéen»	517
Najib Akesbi	517
1. Introduction	517
2. Contraintes	517
3. Potentialités	518
4. Place de la recherche	519
5. Conclusion	519
Comité d'Honneur	521
Comité de coordination	522
Comité d'organisation	522
Comité scientifique	523
Secrétariat/ page Web	524
Liste des participants	525

Liste des figures, photos et tableaux par ordre de citation

Figures

Dendrogram of genetic similarity of 100 NOVA collection accessions using 9 SSRs	12
Dendrogram of genetic similarity of ten Mission samples, Manzanillo (Spain), Mission (UC Davis) and Nevaldillo Blanco (UC Davis)	13
Examples of rooting systems developed for juvenile (A) and adult (B) 'Moroccan Picholine' cultivar	26
Regeneration of 'Moroccan Picholine' plants via somatic embryogenesis. Embryogenic callus induction stage (A) and established plantlets in soil (B)	26
Effet de l'état du milieu sur le % de débourrement	33
Effet de l'état du milieu sur le % de pousses formées	33

Effet de l'état du milieu sur le % de vitrification.....	34
Effet de l'état du milieu sur le % de brunissement	34
Effet de la concentration de saccharose sur l'induction des cals. Les valeurs suivies des mêmes lettres ne sont pas significativement différentes	40
Effet de la concentration de saccharose sur la régénération des plantules par embryogenèse somatique.....	41
Effet du type de sucre sur l'induction des cals et la régénération des plantules par embryogenèse somatique	42
Effet de l'interaction de la concentration d'auxine et de l'âge de l'explant sur le pourcentage d'enracinement <i>in vitro</i> des microboutures de la Picholine marocaine	47
Évolution des effectifs de l'olivier dans le Tafilalet	54
Évolution de la production oléicole dans le Tafilalet.....	54
Répartition spatiale de l'olivier dans le Tafilalet	56
Peigne plastique	63
Peigne vibrant	63
Peigne rotatif (Pick machine)	64
Outil à doigts oscillants	64
Secoueur de branches.....	64
Diagramme d'excitation pour différents paramètres du vibreur	65
Modèle éléments finis de l'olivier	65
Distribution de la réponse niveau des pédoncules	66
Moyenne des réponses des pédoncules	67
Cumulative yield (5-year) of olive cultivars grown under different watering regimes in southern Italy	72
Total polyphenol content (5-year mean) of olive cultivars grown under different watering regimes in southern Italy	74
Visible symptoms, photosynthesis, stomatal conductance and stomatal density changes in olive plants (cv. Frantoio and Moraiolo) exposed to ozone, sulphur dioxide and carbon dioxide	80
Évolution du potentiel hydrique chez les variétés Chemlali (A) et Chetoui (B)	93
Assimilation photosynthétique nette chez les variétés Chemlali (A) et Chetoui (B)	95
Rendement quantique du PSII chez les variétés Chemlali (A) et Chetoui (B)	96
Rendement quantique maximal du PSII chez les variétés Chemlali (A) et Chetoui (B)	97
Taux de transfert des électrons JT chez les variétés Chemlali (A) et Chetoui (B)	99
Quenching photochimique du PSII chez les variétés Chemlali (A) et Chetoui (B).....	100
Humidité moyenne dans les 120 premiers centimètres du sol au cours d'une campagne agricole à pluviométrie normale (1998/99) et d'une année exceptionnellement sèche (2000/2001) en comparaison avec l'humidité au point de flétrissement permanent et celle à la capacité au champ	109
Variation du nombre moyen des grappes florales formées en fonction de la longueur du rameau florifère	110
Perméabilité à l'eau dans les sols des deux parcelles (infiltromètre à double anneau)	111
Productions annuelles et moyennes décennales des deux parcelles à sol sableux favorable et à sol sablo - argilo - limono - gypseux marginal	114
Évolution mensuelle de la photosynthèse nette chez l'olivier conduit en pluvial et stressé à cause de la sécheresse en comparaison à celui conduit en irrigué et recevant 600 mm par an	122
Évolution mensuelle de la conductance stomatique chez l'olivier conduit en pluvial et stressé en comparaison à celui qui est conduit en irrigué et recevant 600 mm par an .	123

Relation linéaire entre la transpiration et la conductance stomatique chez l'olivier Chemlali Sfax évoluant en milieu aride tunisien	124
Évolution mensuelle des potentiels de base (A) et minimum (B) enregistrés chez l'olivier Chemlali Sfax en fonction du mode de conduite du verger	125
EDXMA dot maps for K ⁺ (a), Na ⁺ (b) and Cl ⁻ (c) of leaf lamina transverse freeze-fracture of <i>in vitro</i> Frantoio C seedling (most sensitive) cultivated at 200 mM NaCl (d)	152
EDXMA dot maps for K ⁺ (a), Na ⁺ (b) and Cl ⁻ (c) of leaf lamina transverse freeze-fracture of <i>in vitro</i> Frantoio Z seedling (less sensitive) cultivated at 200 mM NaCl (d)	152
EDXMA peak/background ratios percentage of Na ⁺ , Cl ⁻ , K ⁺ and Ca ⁺⁺ ions in the different leaf cell layers of Frantoio C (most sensitive), Frantoio Z (less sensitive), Moraiolo J (most sensitive) and Moraiolo Z (less sensitive)	153
Effet de la température d'élevage sur le nombre d'adultes sortis à partir des différents éclosiers (Traitements)	162
Fécondité moyenne des femelles issues des différents traitements durant les 5 périodes d'émergence (en mg d'œufs/ Femelle)	163
Fécondité totale de la souche 2F pour les trois durées de stockage au froid des œufs hôtes	164
Fécondité totale de la souche 2F pour les 3 durées de stockage au froid des œufs hôtes...	164
Olive nursery tree height (%) versus time (year) in different treatments	171
Olive nursery trunk diameter (cm) versus time (year) in different treatments	172
Olive nursery shoot length (cm) versus time (year) in different treatments	172
Oleuropein (g/kg of olive) and Hydroxytyrosol (g/kg of olive) levels during the maturation of olive variety	196
Correlation between total phenols concentrations (g/kg of olive) and DPPH radical scavenging effect (IC50) of the extracts during maturation of fruits	197
Mécanisme de photooxydation sensibilisée des lipides insaturés	200
The process of olive oil production including the proposed optical method	208
The washing stage in the olive oil production process	209
Schematic diagram of the optical inspection system	209
Oil stone for crushing olive fruit	210
Processing stages of the optical inspection method	211
The morphological operators used for image segmentation	212
Optical inspection of three different cases: healthy (a) and defective olives (b,c)	213
Évolution du pH au cours de la fermentation contrôlée des olives vertes	217
Variations des sucres au cours de la fermentation contrôlée des olives vertes	218
Variations des coliformes au cours de la fermentation contrôlée des olives vertes	218
Variations des bactéries lactiques au cours de la fermentation contrôlée des olives vertes	219
Variations des levures et des moisissures au cours de la fermentation contrôlée des olives vertes	219
Évolution du pH avant et après chaulage des margines de quatre huileries	226
Évolution de la conductivité électrique avant et après chaulage des margines de quatre huileries	226
Évolution de la demande chimique en oxygène avant et après chaulage des margines de quatre huileries	227
Évolution de la teneur en polyphénols avant et après chaulage des margines de quatre huileries	227
Famille des normes de certification ISO et méthodologie de la traçabilité globale ISO 9001:2000	230
Développement des technologies mobiles au niveau du terroir marocain	232
Différents types de traçabilité	234

Exemple de terroir conservateur au niveau de la zone de Biosphère des Oasis du sud du Maroc	237
Diagramme de mise en œuvre du schéma de traçabilité dans la filière Huile d'olive	238
Mise en place des technologies mobiles dans le milieu oasien	239
Technologies mobiles post-récolte au service de la traçabilité et de la labellisation des produits de terroirs	240
Démarche méthodologique pour la mise en œuvre de la traçabilité	241
Principaux paramètres influençant la qualité de l'huile d'olive	244
Schéma récapitulatif des principales étapes influençant la qualité de l'huile d'olive	244
Exemple de zones à oléiculture intensive/ traditionnelle	246
Unité mobile de trituration d'olives (Objet d'un brevet d'invention)	249
Unité semi-mobile	249
Trémie de réception des olives	250
Système d'alimentation et de lavage	250
Système de broyage (meules en granit)	250
Pâte d'olive en cours de broyage	251
Malaxeur et trémie de broyage	251
Presse des scourtins chargés d'olives triturées à l'aide de l'unité mobile	251
Armoire électrique de commande	252
Récupération des huiles d'olives décantées à partir du bassin de décantation	252
Vue d'ensemble de l'unité mobile première version	253
Huiles d'olive de différentes Maâsra du Maroc	253
Dégustation avant dosage des huiles d'olive	254
Dosage des huiles d'olive de la campagne (2004)	254
Journée de sensibilisation et de formation organisée en collaboration avec l'Office de Mise en valeur Agricole de Tafilalet	255
Journée de sensibilisation organisée en collaboration avec l'Office de Mise en valeur Agricole de Tafilalet	255
Dégustation des huiles d'olives produites par l'unité mobile	256
Fabriquer des unités d'extraction des huiles d'olive, c'est possible aujourd'hui au Maroc	257
Évolution du pH dans les composts contenant 25%, 35%, 50% et 65% de boues	270
Évolution de la CE dans les composts contenant 25%, 35%, 50% et 65% de boues	271
Évolution des pertes en azote dans les composts contenant 25%, 35%, 50% et 65% de boues	271
Évolution de l'azote Kjeldahl dans les composts contenant 25%, 35%, 50% et 65% de boues	272
Évolution des taux de polyphénols dans les composts contenant 25%, 35%, 50% et 65% de boues	272
Indice de germination des composts matures contenant 25%, 35%, 50% et 65% de boues	272
Évolution de la matière organique des sols	278
Évolution de l'azote organique des sols en fonction du temps d'incubation	279
Évolution de l'azote ammoniacal des sols en fonction du temps d'incubation	279
Évolution du nombre des germes ammonium oxydant	280
Évolution de l'activité uréase des sols	281
Évolution de l'activité ammonium oxydase des sols	281
Respiration spécifique des sols incubés en fonction du temps	282
C18-HPLC chromatogram of phenolic compounds present in OMW fraction	286
Schematic representation of the electro-Fenton process at laboratory scale	287

Effect of hydrogen peroxide dose on COD (A), color (B) and monomers (C) removals and evolution of coloration and TSS ($H_2O_2 = 1 \text{ g.l}^{-1}$) (D) during the electro-Fenton reaction of OMW fraction at current density of 7.5 A.dm^{-2}	289
Relative toxicity of OMW fraction before (F) and after electro-Fenton treatment using the <i>Vibrio fischeri</i> LUMISTox test	290
Origine des 178 échantillons prélevés à partir des Maâsra appartenant à différentes régions du Maroc	298
Pourcentage des souches isolées en fonction des différentes sources de carbone	303
Aspect de colonies de <i>Lactobacillus plantarum</i> après coloration Gram	308
Diagramme d'extraction de l'huile d'olive en une seule phase selon le brevet tunisien SN 02034 (Hamdi <i>et al.</i> , 2002)	308
Inhibition de la polyphénoloxydase en fonction du volume d'une culture de <i>Lactobacillus plantarum</i> , l'activité initiale (100%) étant égale à 1.74 U	310
Effet de l'inoculation de <i>Lactobacillus plantarum</i> sur la coloration de la pâte d'olives	311
Mécanisme de bioconversion enzymatique de l'acide p-coumarique des tanins hydrolysables (b) et de l'acide gallique (c)	314
Profil d'élution de la margine fraîche avant et après fermentation par <i>Lactobacillus plantarum</i> à pH variable et à pH constant sur gel Sephadex G-50	315
Profil d'élution de la margine traitée avant et après 24 h de fermentation par <i>Pc. pentosaceus</i> sur gel Sephadex G-50	316
Évolution de la biomasse et de la concentration en glucose au cours de la production de <i>Lb. plantarum</i> Lb.NC18 en fermenteur	318
Diagramme de fabrication des olives de table selon différents procédés	319
Évolution des enterobacteriaceae, des levures et des bactéries lactiques de la saumure lors de la fermentation contrôlée des olives ayant subi un traitement alcalin suivi d'un traitement thermique (STFD)	320
Diagramme du processus d'extraction de l'huile d'olive vierge (Brevet Tunisien SN 02034)	321
Profil d'élution de la margine fraîche avant et après fermentation par <i>Lactobacillus plantarum</i> à pH variable et à pH constant sur gel Sephadex G-50	324
Effet de la dilution sur l'évolution de la croissance et la décoloration de la margine contenant 1 g/l d'extrait de levure et 2.5 g/l de glucose	325
Évolution de la DO280, DO390 et de l'UFC suite à l'addition d'une concentration cellulaire de $2.3 \cdot 10^9 \text{ UFC/ml}$ de <i>Pc. pentosaceus</i>	326
Profil d'élution de la margine traitée avant et après 24 h de fermentation par <i>Pc. pentosaceus</i> sur gel Sephadex G-50	326
Temperature evolution during composting at two depths (10, 20 cm)	331
GI index and C/N ratio in the heaps	332
Time course of the β -carotene bleaching in model systems containing: hydroxytyrosol (a); ethyl acetate extract (b); BHT (c); and without added compound (control) (d)	338
Peroxide values of refined husk oils with added phenolic compounds during storage at 50°C . (a) control, (b) BHT at 200 ppm, (c) extract at 200 ppm; (d) extract at 500 ppm, (e) hydroxytyrosol at 200 ppm	338
Dendrogramme montrant la position phylogénétique de la souche YAS1, nouvelle espèce du genre <i>Bacillus</i>	343
Mécanisme de dégradation de l'acide tannique par <i>Lactobacillus plantarum</i>	347
Mécanisme de dégradation de la quercétine par <i>Lactobacillus plantarum</i>	347
Analyse par HPLC de la fraction monomérique des margines	350
Évolution de l'absorbance à 460 nm (a) et à 232 nm (b) au cours de l'oxydation de l'acide linoléique/ β -carotène en présence de différents composés phénoliques	352

Suivi de l'Indice de peroxyde des huiles de grignon (a) et d'olive (b) raffinées à 50°C	353
Suivi de l'Indice de peroxyde des huiles de grignon (a) et d'olive (b) raffinées à 50°C	354
Lipoxygenase pathway in olive	357
Chetoui virgin olive oil aroma composition	358
Olive Mill Waste as a resource	362
Mycelial biomass as a source of valuable products	363
Application of Basidiomycetes to ligninocellulose waste recycle	363
Extraction process of polysaccharides	365
¹ H-detected DOSY spectrum of the purified polysaccharide fraction in 0.5 M NaOD at 300 K	366
¹ H-TOCSY map of the purified polysaccharide fraction in NaOD at 300K	367
¹ H-detected DOSY spectrum of a xylose sample in NaOD at 300 K	368
Structure of (1->3) -D-glucan containing 1-6 glucopyranosyl branch points	368
FT-IR spectra of commercial and fungal chitin	369
Elution curves of columns containing by biomass-loaded Polyvinyl Alcohol (PVA) and PVA alone loaded with 10 mg L ⁻¹ of Cu (II)	371
Olives and olive oil production in the Mediterranean area during 1998	376
Chemical structures of the secoiridoids glucosides of Olive fruit	385
Chemical structures of verbascoside (hydroxycinnamic derivative found in olive fruit) ...	386
Chemical structures of the secoiridoids derivatives and phenolic alcohols of brined olives	387
Growth in MRS broth (8% NaCl) at 28°C, during 48 h, of 3 strains representatives of 3 different group of lactic acid bacteria	390
Growth of lactic acid bacteria in MRS containing verbascoside (0.5%)	390
Growth of lactic acid bacteria in MRS containing oleuropein (0.1%)	391
Growth of lactic acid bacteria in filter-sterilized brine (pH 6) containing 6% NaCl, 0.05% oleuropein, 0.15% verbascoside and added of 0.3% glucose and 0.05% yeast extract	392
Changes in lactic acid bacteria and coliforms during the fermentation of Itrana and Leccino olives with the indigenous flora (Control) or with <i>Lactobacillus pentosus</i> starter culture	393
Changes in pH during the fermentation of black olives with the indigenous flora (Control) or with <i>Lactobacillus pentosus</i> starter culture	394
Changes in glucose during the fermentation of Itrana Cv. with the indigenous flora (Control) or with <i>Lactobacillus pentosus</i> starter culture	395
Changes in lactic and acetic acid during fermentation of Itrana olives with the indigenous flora (Control)	395
Changes in lactic and acetic acid during fermentation of Itrana olives with <i>Lactobacillus pentosus</i> starter culture	396
Phenolic content of Itrana Cv. in olives (mg/kg) and brines (mg/L)	396
Phenolic content of Leccino Cv. in olives (mg/kg) and brines (mg/L)	397
Bitter sensation of Itrana and Leccino Cv. brined olives tasted before and after fermentation	397
<i>Photos</i>	
Maâsra traditionnelle	294
Maâsra améliorée	294
Mélange d'espèces de CFT cultivées sur différents milieux après incubation à 50°C	298

Tableaux

Effet de la source d'explants sur le débournement et le développement ultérieur des bourgeons axillaires	17
Évolution de la croissance moyenne des pousses et manifestation de la callogenèse chez les explants issus des 3 sources de plants	17
Effet du TIBA sur le débournement et le développement des bourgeons axillaires de l'olivier	19
Évolution du comportement des micro boutures après 5 subcultures sur un milieu contenant du TIBA à différentes doses	20
Effet du nitrate d'argent sur le débournement et le développement des bourgeons axillaires	21
Effet de l'intervalle de transfert sur le comportement de microboutures d'olivier	36
Effet de l'état physique du milieu sur le débournement et le développement des bourgeons axillaires de l'olivier après 45 jours de mise en culture	37
Effet de la concentration d'auxine sur le nombre moyen de racines produites par microbouture	48
Effet de l'âge de l'explant sur le nombre moyen de racines produites par bouture	48
Caractéristiques mécaniques du bois de l'olivier	65
Performances des ouvriers récoltant les olives aux outils d'aide à la récolte	66
Composition granulométrique des horizons du sol dans les deux parcelles d'étude	107
Composition chimique des différentes strates pédologiques du sol dans les deux parcelles d'étude	107
Nombre total de racines recensées à 12 mètres du tronc de l'olivier Chemlali Sfax, planté sur deux types de sol, nombre et longueur unitaire des racines principales au départ du tronc et leurs moyennes	112
Caractéristiques morphologiques des feuilles de Chemlali Sfax, cultivé sur deux types de sol dans la région du Chaâl en comparaison avec des arbres de la même variété, conduits en irrigué	113
Répartition annuelle des précipitations durant les 27 mois d'étude échelonnés entre octobre 2000 et décembre 2002	121
Pourcentage des agriculteurs pratiquant les techniques culturales étudiées	130
Pourcentage des différentes dates de récolte des olives	131
Classes des rendements obtenus par les agriculteurs	132
Effet du degré d'infestation par l'hylésine exprimé par le nombre cumulé de plaques de ponte/arbre sur la croissance des rameaux et la production moyenne annuelle/arbre dans la parcelle n°1 durant la période (1999 - 2003)	137
Effet du degré d'infestation par l'hylésine exprimé par le nombre de plaques/arbre sur la production moyenne/arbre dans la parcelle n°2 durant la période (2001- 2003)	138
Effect of wetting sulphur and <i>Ampelomyces quisqualis</i> on the percentage of leaf infection	144
Effect of wetting sulphur and <i>Ampelomyces quisqualis</i> on the percentage of leaf fall	144
FW RGR of Frantoio and Moraiolo seedling lines at increasing NaCl concentrations	150
DW RGR of Frantoio and Moraiolo seedling lines at increasing NaCl concentrations	150
Durées de développement et d'émergence des imagos	159
Composition of pig slurry and the soil used in the trial	170
Chemical characteristics of the different treatments in soil (2004 Year)	171
Répartition des échantillons d'olives et de grignons d'olives collectés au cours des campagnes oléicoles de 2003 et 2004 en fonction de leur nature et de leur provenance	177

Bilan comparé de l'origine des échantillons et de la distribution des moisissures pour les deux campagnes oléicoles de 2003 et de 2004 au Maroc	182
Répartition des souches mésophiles isolées selon leur genre	183
Répartition des genres des moisissures thermophiles identifiées au sein de la mycoflore thermophile totale isolée en 2004-2005	183
Répartition des 65 souches d' <i>Aspergillus</i> isolées au cours des campagnes oléicoles de 2003/2004 et 2004/2005 au Maroc	184
Production d'Aflatoxines par les souches d' <i>Aspergillus flavus</i> cultivées sur riz à 25°C pendant 7 jours	184
Origines des souches d' <i>Aspergillus niger</i> isolées au cours de la campagne oléicole 2004/2005 et leur production d'OTA dans les cultures sur grains de blé	186
Composition (%) en acides gras d'huiles d'olive vierges en fonction du degré de maturité des fruits (cv. Picholine marocaine, campagne 1998/99)	201
Facteurs de protection FP20* des composés phénoliques utilisés à une concentration de 0,01% (m/m) dans l'huile d'olive décolorée	202
Évolution des caractéristiques carpométriques des fruits (cv. Picholine marocaine) en fonction du degré de maturité	204
Contenu en eau, humidité, huile et polyphénols totaux dans les fruits en fonction du degré de maturité	205
Time performance (sec) and overall error (%) when testing the available 295 feature vectors	213
Évaluation du taux d'altération dans les olives fermentées	220
Protocoles expérimentaux utilisés pour la caractérisation physico-chimique des margines issues des huileries H1, H2, H3 et H4	224
Caractérisation physico-chimique des margines issues des huileries H1, H2, H3 et H4 ...	225
Paramètres physico-chimiques des composts matures	273
Caractéristiques moyennes des margines	278
Effect of current density on the coloration, COD and monomers removals and pH of OMW fraction in the presence of 1 g.l ⁻¹ of H ₂ O ₂ and during 4 hours of electro-Fenton reaction	288
Composition des différents milieux de culture utilisés et conditions d'incubation des champignons filamenteux thermophiles et thermotolérants	295
Principaux groupes de moisissures à importance industrielle	299
Croissance apicale des différentes espèces en fonction de la température d'incubation ...	302
Croissance apicale des différentes espèces isolées à partir des Maâsra, en fonction de différentes sources de carbone, l'incubation ayant lieu à 50°C pendant 7 jours	302
Effet de l'inoculation des olives par <i>Lactobacillus plantarum</i> sur la composition phénolique de l'huile d'olive extraite	309
Effet de l'application de <i>Lactobacillus plantarum</i> sur les paramètres de la qualité de l'huile d'olive	310
Effet de la croissance de <i>Lb. Plantarum</i> sur les caractéristiques de la margine fraîche	314
Effet de la croissance de <i>Pc. pentosaceus</i> sur les caractéristiques de la margine traitée	315
Effet de l'application de <i>Lb. plantarum</i> durant le processus d'extraction sur la composition phénolique (mg/kg) de l'huile d'olive vierge	322
Effet de l'application de <i>Lb. plantarum</i> durant le processus d'extraction sur la qualité de l'huile d'olive	322
Effet de la dilution sur le changement du pH, UFC, DCO (g/l) et la DO390 durant la croissance de <i>Lactobacillus plantarum</i> sur margine fraîche	323
Chemical characteristics of alperujo	330
Proportions of the ingredients	330

Characteristics of final composts	332
Quantification of the major phenolic monomers in crude OMW and in the continuous counter-current ethyl acetate extract	337
Effet des différentes concentrations des composés phénoliques sur la croissance de <i>Lactobacillus plantarum</i>	346
Concentration des composés phénoliques dans l'extrait de margines	351
Activité antiradicalaire des composés phénoliques	351
Chetoui virgin olive oil whole C6 fraction composition	358
Amounts of C6 compounds (ppm of nonan-1-ol) from LOX pathway of Chetoui virgin olive oil	358
Chitin extracted from the different mycelia	369
Degree of acetylation of fungal chitins compared to commercial chitin (Sigma)	370
Degree of acetylation of commercial chitin (Sigma) after enzymatic deacetylation	370
Olive industry in the Mediterranean area	376
The main phenolic compounds in olive fruit	384

Ouvrages parus chez Actes Éditions

•••••> Collection "Proceedings"

- Le point sur l'aviculture au Maroc. A. Ait Boulahsen, M. El Houadfi & F. Guessous (Éds.) (1994), 186p.
- Contribution du froid à la préservation de la qualité des fruits, légumes et produits halieutiques. A. Lahmam- Bennani & D. Messaho (Éds.) (1994), 484 p.
- Working equines. M. Bakkoury & R.A. Prentis (Eds.) (1994), 410 p.
- Biodiversity & adaptation. A. Zaime (Ed.) (1996), 256 p.
- Diversité biologique et valorisation des plantes médicinales. M. Rejdali & A. Birouk (Eds) (1996), 254p
- Rehabilitation of faba bean. W. Bertenbreiter & M. Sadiki (Eds.) (1996), 200 p.
- Ressources phytogénétiques et développement durable. A. Birouk & M. Rejdali (Eds.) (1997) 370p.
- Plantes aromatiques et médicinales et leurs huiles essentielles. B. Benjlali, M. Ettalibi, M. Ismaili-Alaoui & S. Zrira (Eds.) (1997), 548p.
- Tuberculose animale en Afrique et au Moyen-Orient. J. Berrada, N. Bouchriti & M. Bouslikhane (Eds.) (1997), 228p.
- Élevage et produits de l'abeille. N. Belkadi, S. Tazi, E.H. Mohssine & S. Benamar (Eds.) (1997), 172p.
- World information and early warning system on Plant Genetic Resources. A. Birouk (Ed.) (1999) 98p.
- Drainage de la plaine du Gharb. E.M. Atif, A. Taky, A. Hammami & S. Bouarfa (Eds) (1999) 146p.
- Maladies parasitaires et infectieuses du dromadaire. A. Dakkak (Ed.) (2000) 164p.
- Arbres et espaces urbains: du chercheur au gestionnaire. A. Boukroute (Ed.) (2003), 170p.
- Gestion environnementale de l'agriculture. Maîtrise des flux de matières et rationalisation des pratiques agricoles. B. Soudi, Ch. Debouche, L. Krim, M. Vanoverstraeten & M. Ettalibi (Eds.) (2005), 284p.

•••••> Collection Agriculture et Développement

- Le secteur des rosacées fruitières au Maroc. A. Basler, J.P. Détry, M. Kerbaba, H. Moussaoui & D.M. Walali Loudiyi avec la collaboration de M. Berrichi & B. Heuel-Rolf (1995), 430p.
- Pertes à la récolte des céréales dans un pays méditerranéen. A. Chafaï Elalaoui, A. Bentassil & M. El Mekkaoui (1996) 196p.
- Plantes aromatiques et médicinales. Atouts du secteur et exigences pour une valorisation durable. B. Benjlali & S. Zrira (2005), 346p.
- La chèvre dans l'arganeraie. A. El Aich, A. Bourbouze & P. Morand-Fehr (2005), 123p.

•••••> Collection Documents Scientifiques et Techniques

- Theriogenology in camelidae. Anatomy, Physiology, Pathology and Artificial breeding. A. Tibary & A. Anouassi (1997), 489p. Format A4 en couleurs.
- Les ressources génétiques ovines au Maroc. I. Boujenane (1999), 136p. *Prix du Maroc 1999 pour les Sciences et Technologies*
- Les races bovines au Maroc. I. Boujenane (2002), 144p.
- Antibactériens en médecine vétérinaire. E.H. Abdennebi (2006), 303p.
- Systèmes d'élevage bovin laitier au Maghreb. M.T. Sraïri (2006), 228p.

••••> Collection Manuels Scientifiques et Techniques

Éléments d'amélioration génétique des plantes. A. Zahour (1992), 232 p. *Grand Prix du Maroc 1993 pour les Sciences et la Technologie*

Modélisation mathématique des processus pédologiques. H. Laudelout, C. Cheverry & R. Calvet avec la collaboration de C. Gascuel-Oudoux, P. Boivin & C. Walter (1994), 264p.

Reproduction équine. Tome I. La jument. A. Tibary & M. Bakkoury avec la collaboration de A. Anouassi, A. Mazouz, M. Ouassat & A. Sghiri (1995), 434p.

Assurance de la qualité en industrie halieutique. L.H. Ababouch (1995), 212p.

Reproduction équine. Tome II. L'étalon. A. Tibary & M. Bakkoury (2005), 554p.

Reproduction équine. Tome III. Biotechnologies appliquées. A. Tibary & M. Bakkoury (2005), 532p.

••••> Collection Agriculture et Environnement

Compostage des déchets ménagers et valorisation du compost (cas des petites et moyennes communes au Maroc). B. Soudi (2001), 104p.

The effects of phosphate fertilizer management strategies on soil phosphorus status and crop yields in some European countries. A.E. Johnston, P.A.I. Ehlert, M. Kuecke, B. Amar, K.W. Jaggard & C. Morel (2001), 174p.

Household solid waste composting and valorisation of compost. Case of small and medium communities in Morocco. B. Soudi & M. Eisa (2003), 100p.

••••> Collection Biochimie pour tous (Format 21x27)

Glucides. M. Ettalibi (1998), 172p.

Expression et exploitation des gènes. M. Ettalibi (1998; 2003), 120p.

Lipides. M. Ettalibi (2000), 288p.

Biochimie des saccharides. M. Ettalibi (2004), 584p.

Conception et réalisation: Actes Éditions

Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II,
BP 6202-Instituts, Madinate Al Irfane, 10101 Rabat, Maroc
Courriel: m.ettalibi@iav.ac.ma

Flashage et impression: ImprimElite, Salé

Achevé d'imprimer: 4^{ème} trimestre 2006

Dépôt légal (Bibliothèque Nationale du Royaume du Maroc):

2006/2324

ISBN: 9981-801-71-2

PROCEEDINGS

This book is essentially based on the works presented at the 1st International Seminar on «**Biotechnology and Quality of Olive Tree products around the Mediterranean Basin**» (OliveBioteq-2004), held at Errachidia, Morocco, november 22-24, 2004. The seminar was organized by IAV Hassan II (Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Rabat, Morocco), ORMVAT (Office Régional de Mise en Valeur Agricole du Tafilalet, Errachidia, Morocco) and IRD (Institut de Recherche pour le Développement, Paris, France).

This book gives an in depth view of Olive Biotechnology and Quality with comments on the general layout of the four sections around which the seminar was structured:

- Tissue culture and Genetics.
- Agronomy, hydric stress and pest controls.
- Harvest equipment and post harvest technology.
- Environment Biotechnology and valorization of sub-products.

Each of the four themes of this first international seminar is an invitation for the actors interested in research and development of the olive industry to get together and double their efforts to achieve well being and peace around the Mediterranean basin. In order to help attain such a goal, a second seminar will be held shortly in 2006 in Palerma, Italy.

© **Actes Éditions, Rabat, 2006**

Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, B.P. 6202-Instituts,
Madinat Al Irfane, 10101 Rabat, Maroc.

Courriel: m.ettalibi@iav.ac.ma

ISBN : 9981-801-71-2