

Épandage des margines sur les sols agricoles : impacts environnementaux microbiologiques

Hamdi SAHRAOUI^{1*}, Amel JRAD² et Hafedh Jamil MELLOULI³

¹*Faculté des Sciences de Bizerte, Jarzouna 7021 – Bizerte, Tunisie*

²*Centre International des Technologies de l'Environnement de Tunis, Boulevard de l'Environnement, 1080 Tunis, Tunisie*

³*Institut National de la Recherche Agronomique de Tunisie, Rue Hedi Karray, 2049 Ariana, Tunisie*

* Correspondance, courriel : hamdi.sahraoui@gmail.com

Résumé

L'épandage agricole des margines (effluents des moulins à huile d'olive) constitue une alternative parmi les solutions permettant de les valoriser, mais à condition que cette opération soit contrôlée et maîtrisée en respectant les doses à appliquer. Cependant, une réticence envers l'épandage demeure jusqu'à nos jours, pour des craintes d'éventuelles incidences microbiologiques négatives sur le sol.

Ainsi, pour contribuer à soulever l'ambiguïté qui a dû résulter des avis souvent controversés envers la valorisation agricole des margines, ce travail a été mené au niveau d'une exploitation agricole. En comparaison avec un sol non traité aux margines (témoin), les impacts environnementaux microbiologiques de l'épandage de 25 et 50 m³/ha ont été étudiés, pendant quatre mois, au niveau de deux horizons (0-20 cm et 20-40 cm) d'un sol homogène de texture sable limoneux.

Les résultats obtenus ont révélé que les phénols provenant des margines ont été dégradés ou réorganisés au cours du deuxième mois après l'épandage. Ni activation, ni inhibition de l'activité de la microflore du sol n'ont été constatées suite à l'épandage des doses étudiées.

Mots-clés : *margines, épandage, environnement, impacts microbiologiques.*

Abstract

Spreading of olive mill wastewater on agricultural soils: environmental microbiological impacts

It has been shown that the olive mill effluents (OME), which are a waste water of olive oil extraction process, constitutes an alternative among the solutions proposed. Thus provided that this operation should be realized by a controlled amounts to be applied. However, a reserve towards OME spreading remains, for fears of possible microbiological negative incidences on the soil. Consequently, to contribute in raising the ambiguity which had resulted from the controversial opinions related to the agricultural valorization of OME, by this work we have tried to study their microbiological environmental impacts. In comparison with an untreated soil with OME (control), the application of 25 and 50 m³/ha were studied, during four months, on two horizons (0-20 cm and 20-40 cm) of a homogeneous loamy sand soil.

By using a quantitative approach the microbiological impacts on the soil were carried out. From the obtained

results it could be drawn that the phenols coming from OME were degraded or reorganized during the second month after spreading. Neither activation, nor inhibition of the micro flora activities in the soil were noted with the studied amounts applied.

Keywords : *Olive Mill Effluents (OME), spreading, environment, microbiological impacts.*

1. Introduction

Les margines constituent les rejets des moulins à huile d'olive. Elles proviennent pour 40 à 50 % du fruit et le reste des quantités d'eau utilisées pour le lavage des olives et leur trituration. Ces effluents sont des eaux usées très acides (pH compris entre 4,5 et 5,2), très salines (conductivité électrique située entre 8 et 16 dS/m). Ces effluents présentent un grand pouvoir polluant des cours d'eau, dû surtout à leur couleur et leur concentration élevée en matières organiques et en polyphénols [1]. Différentes recherches ont démontré que l'épandage des margines avait des répercussions agronomiques défavorables, liés essentiellement à la teneur élevée en substances phénoliques non facilement biodégradables. Cependant, l'effet de l'épandage des margines sur l'activité microbienne du sol, est un problème à propos duquel existe une grande confusion et des divergences d'opinion, en raison essentiellement, de la différence des doses appliquées, des conditions édaphiques (texture du sol) et climatiques.

Toutefois, plusieurs microorganismes du sol utilisent la matière organique des margines comme seule source de carbone [2]. D'un autre côté, plusieurs chercheurs ont noté une diminution de la capacité d'adaptation de certains microorganismes du sol en présence des margines [3]. Cette diminution est préalablement due à une sélection des microorganismes les mieux adaptés à la croissance en présence des margines. Les composés phénoliques apportés lors de l'épandage disparaissent dans les deux mois qui suivent le traitement, sauf dans le cas d'épandage massif (300 m³/ha) contre indiqué pour la nutrition des plantes [4]. En présence des margines, une amélioration de la microflore du sol s'établit et devient capable de décomposer les éléments phytotoxiques tels que les polyphénols [5]. Les phénols contenus dans les margines peuvent être dégradés par les bactéries et les champignons, suite à une hydrolyse enzymatique [2].

En outre, l'épandage des margines augmente cette activité immédiatement après le traitement, puis elle diminue graduellement pour reprendre son état initial, dans le cas où un traitement suivant n'aurait pas eu lieu [6].

Bien que certains chercheurs notaient une augmentation de l'activité microbienne du sol lors de l'épandage des margines, d'autres signalaient une diminution du nombre de certaines bactéries du sol. Les travaux menés au champ afin d'élucider les incidences environnementales in situ sont quasi-inexistants. De même, les résultats sur les effets inhérents à l'activité microbiologique du sol demeurent controversés et n'ont pas précisé le devenir des polyphénols des margines. De ce fait, on se propose à travers ce travail mené in situ d'apporter quelques éléments de réponse.

2. Matériel et méthodes

2-1. Échantillonnage

Les essais du présent travail ont été menés à *Sidi Bou Ali* (Région du Sahel tunisien). L'échantillonnage du sol a été réalisé mensuellement et pour quatre mois après l'épandage (D₁, D₂, D₃ et D₄), au niveau de deux horizons P₁ (0 - 20 cm) et P₂ (20 - 40 cm). Le sol est de texture sable limoneux et homogène sur la profondeur

d'étude. Deux doses de margines ont été choisies pour l'épandage en plein champ, notamment T_1 (25 m³/ha) et T_2 (50 m³/ha) comparés à un témoin non traité T_0 .

2-2. Dénombrement de la flore total du sol

Le dénombrement des bactéries du sol a été déterminé à partir d'une solution du sol selon la méthode décrite en [7]. A partir de l'échantillon du sol prélevé, 1 g a été dilué dans 10 mL d'eau distillée stérile. Ainsi une série de 6 dilutions successives a été préparée à partir de la solution mère. Ensuite, se poursuit un ensemencement par mélange à un milieu de culture défini (gélose P.C.A) en boîte de pétri, des diverses dilutions de la suspension mère. Les boîtes, sont ensuite incubées à 37°C durant 22 ± 2 h.

Le calcul du nombre de microorganismes, se fait à partir du nombre de colonies obtenues dans la ou les boîtes correspondant aux dilutions donnant un résultat significatif. Chaque colonie est considérée comme ayant été engendré par un microorganisme. Le nombre de microorganismes « N » par gramme de produit, à l'aide de l'équation suivante :

$$N = \frac{C}{V} \quad (1)$$

où

C : le nombre de colonies comptées pour l'ensemble des boîtes des dilutions interprétables.

V : le volume total d'eau ensemencé, pour l'ensemble des boîtes des dilutions interprétables, en mL.

2-3. Dénombrement des levures et moisissures du sol

Le dénombrement des levures et moisissures est déterminé selon la méthode décrite en [7].

La méthode consiste en un ensemencement, en profondeur, dans un milieu de culture défini (Sabouraud chloramphénicol agar) de 1 mL de l'échantillon à analyser à partir des dilutions décimales obtenues à partir de la solution mère, à raison d'une boîte par dilutions. Les boîtes de pétri sont incubées à 25°C, en aérobiose pendant trois, quatre et cinq jours. A partir du nombre de colonies obtenues dans les boîtes de pétri retenues le nombre de levures et moisissures « *N*' » par gramme de produit, a été calculé.

Pour les boîtes contenant moins de 150 colonies, au niveau de deux dilutions successives :

$$N_i = \frac{\sum C}{1.1 \times d} \quad (2)$$

Pour les boîtes contenant moins de 15 colonies, *Ne* étant le nombre estimé :

$$N_e = \frac{C}{d} \quad (3)$$

Pour les boîtes ne contenant aucunes colonies, les résultats sont exprimés par 1/d colonies par gramme de sol.

2-4. Détermination de la matière organique du sol

La matière organique du sol est déterminée par calcination d'un échantillon de sol à 525°C [8].

Une prise d'essai de l'échantillon homogène est placée dans une tare vide en porcelaine, ensuite placée dans une étuve pendant 24h à 105°C afin de déterminer la matière sèche MS. La même prise d'essai est placée dans un four pendant 24h à 525°C afin de déterminer la matière organique :

$$MO(g/kgMS) = (MS - Mm) \times 1000 / MS \quad (4)$$

où

MS : Matière sèche (g)

Mm : Matière minérale (g)

2-5. Détermination de l'indice phénol

Le principe du mode opératoire repose sur les 4 étapes suivantes [9] :

1-Dispersion dans l'eau

2-Entrainement des dérivés phénoliques par distillation après acidation par de l'acide phosphorique (pH=1,5) en présence de sulfate de cuivre et de chlorure de sodium.

3-Alcalinisation à pH = 9,1 ± 0,1 et développement, en présence de ferricyanure de potassium, d'une coloration avec l'amino-4-antipyrine.

4-Mesure spectrophotométrique après extraction au chloroforme du composé coloré formé à la longueur d'onde de 460 nm.

$$IP = \frac{Q \times 200}{m \times v} \times \frac{H + 100}{100} \quad (5)$$

où : *IP* : Indice de phénol

m : La masse d'échantillon pour essai, en gramme

Q : La quantité de phénol, en microgrammes pour 100 mL

v : Le volume du distillat soumis à la coloration en mL

H : La teneur en eau pondérale du sol, en grammes par 100 grammes de sol sec.

La méthode est basée sur le développement d'une coloration brin-rouge entre les composés phénoliques et l'amino-4-antipyrine en présence de ferricyanure de potassium. L'intensité de cette coloration étant proportionnelle à la concentration. Cependant, les dérivés phénoliques substitués en position par un groupement alkyle, aryle, nitro, benzyle, nitroso, aldéhyde, etc., ne réagissent pas ou peu avec ce réactif. En outre, les caractéristiques de cette réaction (longueur d'onde des maxima d'adsorption, intensité) dépendent de la nature du dérivé phénolique présent. Une méthode conventionnelle pour la détermination de l'indice phénol dans des sols, exprime au moyen d'une courbe d'étalonnage établi en utilisant du phénol en milligrammes de phénol par kilogrammes.

2-6. Traitement statistique des résultats

Le traitement statistique des résultats est réalisé moyennant le logiciel STAISTICA (ver.V). L'ensemble des mesures a fait l'objet d'une analyse de la variance à un facteur par le test de Fisher-Snedecor au seuil de risque de 5 %. Elle est complétée par des comparaisons multiples des moyennes par le test de LSD de Student.

3. Résultats et discussion

Afin d'étudier l'impact microbiologique de l'épandage des margines, nous avons procédé moyennant une approche quantitative, au suivi de l'évolution de l'activité microbiologique par une numération des microorganismes après culture sur des milieux gélosés. Sur des échantillons du sol notre étude s'est focalisée sur une comparaison entre le sol témoin non traité (T_0) avec ceux des sols traités aux margines (T_1 et T_2). De ce fait nous avons réalisé le dénombrement de la flore totale du sol témoin et traité. En outre, nous nous sommes intéressés à dénombrer les levures et les moisissures considérés comme étant les principaux facteurs de dégradation des margines.

Etant donné que le dénombrement des microorganismes du sol ne permet pas, à lui seul, de déterminer le devenir des margines après l'épandage, nous avons procédé aussi à l'évaluation de l'activité microbiologique du sol en suivant en fonction du temps, la disparition de substrats incorporés. Ainsi, nous avons déterminé l'évolution de la matière organique et du phénol au niveau du sol traité en comparaison avec le témoin.

L'effet de l'épandage des margines sur l'activité microbienne du sol peut être étudié selon deux hypothèses opposées :

Hypothèse I : les margines possèdent un pouvoir antimicrobien

Hypothèse II : la matière organique des margines présente un stimulus de l'activité microbienne du sol.

Ainsi, nous allons analyser ces deux hypothèses, afin d'élucider l'effet des margines sur la flore microbienne du sol.

3-1. Effet du phénol au niveau de l'horizon P_1

Il est bien évident que la mesure de la teneur du phénol dans le sol permet d'expliquer l'effet de ce composé sur l'activité microbienne du sol. L'analyse de l'effet du phénol sur les microorganismes du sol (**Figure 1**), montre l'absence de ce composé dans les sols traités pour la dose T_1 ($25 \text{ m}^3/\text{ha}$), ceci suppose que la dégradation du phénol a commencée au cours du premier mois après l'épandage. D'où sa disparition au niveau de T_1 et sa faible présence au niveau de T_2 où il est en phase de dégradation ou de réorganisation.

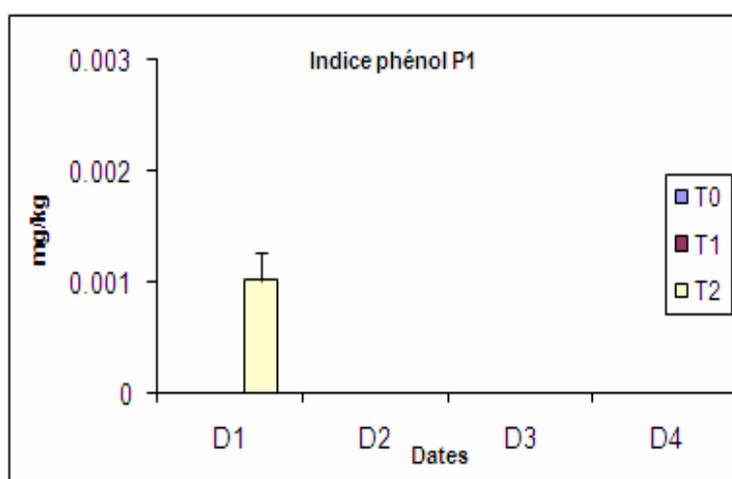


Figure 1 : *Indice phénol des sols traités au niveau de l'horizon P_1*

Si on analyse simultanément les histogrammes de l'indice phénol (**Figure 1**) et celle de la flore totale (**Figure 2**), on constate une légère augmentation de la teneur en phénol en T₂, en comparaison avec le témoin, au cours du premier mois ($1,02 \cdot 10^{-2}$ mg/kg). Celui-ci n'a induit aucun effet significatif sur la flore totale des sols traités au cours de ce mois (**Figure 2**). La présence de phénol à ce niveau semble n'avoir aucun effet sur l'activité microbienne, en raison de sa faible teneur.

Toutefois, aucune différence significative n'a été observée pour le nombre des levures et moisissures tout au long de l'essai (**Figure 3**), indiquant une dégradation ou une réorganisation du phénol dès le premier mois après l'épandage.

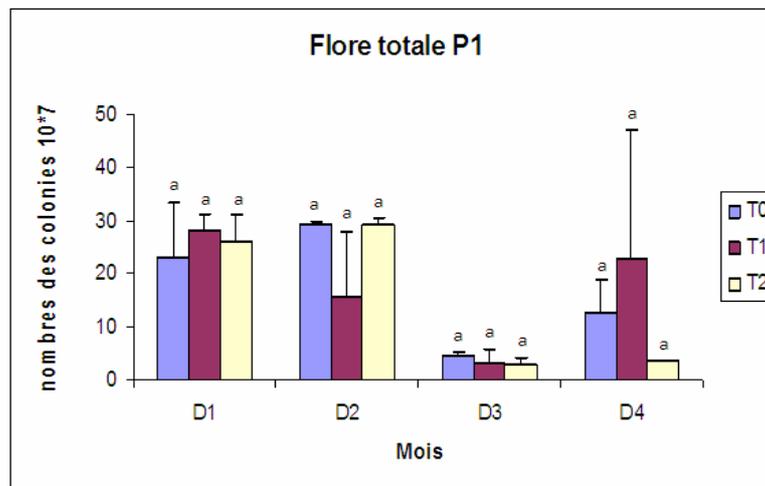


Figure 2 : Effet de l'épandage des margines sur la flore totale du sol au niveau de l'horizon P₁,

(Pour chaque date d'échantillonnage prise séparément, la même lettre indique que les moyennes ne sont pas significativement différentes avec le test de Fisher-Snedecor à un niveau de probabilité de 95%.)

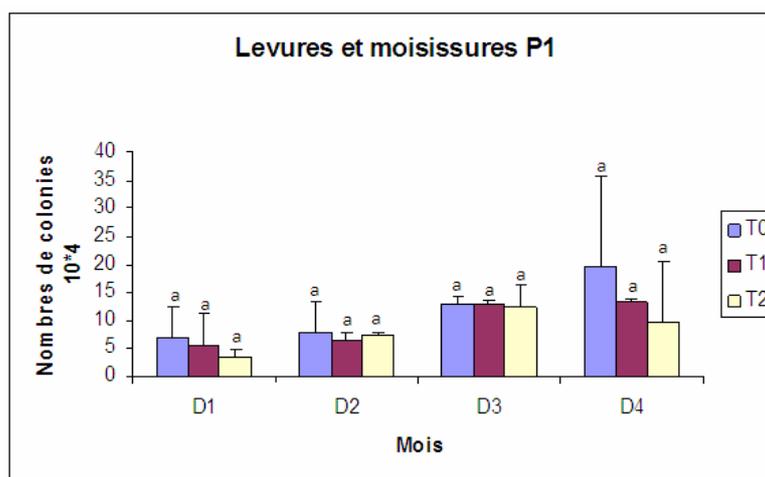


Figure 3 : Nombre de levures et moisissures du sol au niveau de l'horizon P₁,

(Pour chaque date d'échantillonnage prise séparément, la même lettre indique que les moyennes ne sont pas significativement différentes avec le test de Fisher-Snedecor à un niveau de probabilité de 95 %.)

3-2. Effet du phénol au niveau de l'horizon P₂

On note l'absence de phénol pour le traitement T₁ au cours des quatre mois de l'expérience (**Figure 4**). Ceci est dû à la faible quantité de margines appliqués (25 m³/ha). Ainsi, aucune différence significative n'a été remarquée pour le nombre des microorganismes du sol traité T₁.

Alors que pour T₂ on note la présence des phénols durant le premier mois d'expérimentation aussi bien pour l'horizon P₁ que pour P₂ (1,02.10⁻² mg/kg et 2,05 10⁻² mg/kg) comme la montre les figures 1 et 4. A partir du deuxième mois les faibles quantités de phénols disparaissent complètement de l'horizon P₁ et P₂. Par ailleurs, aucun effet significatif antimicrobien ne peut être associé à la présence de phénols durant D₁ (**Figure 5 et 6**).

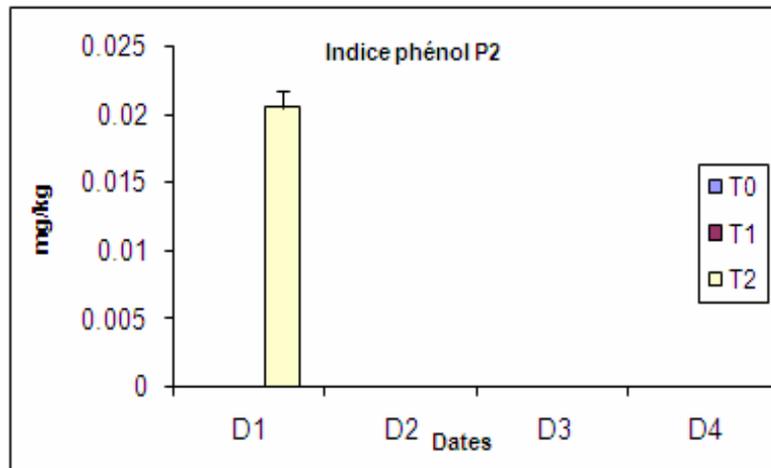


Figure 4 : Indice phénol des sols traités au niveau de l'horizon P₂

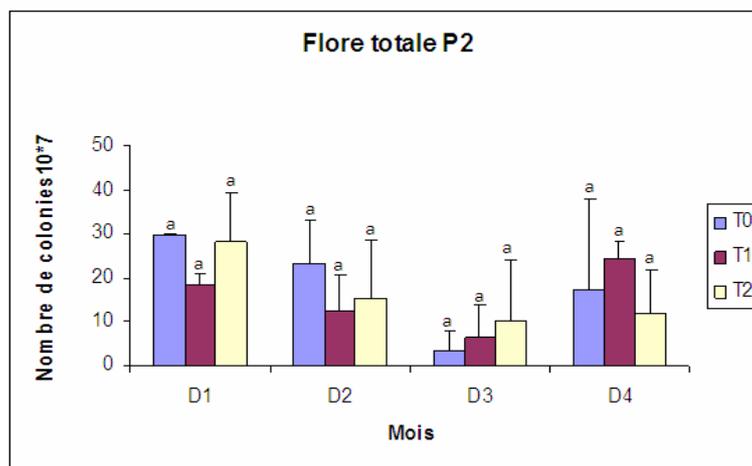


Figure 5 : Effet de l'épandage des margines sur la flore totale du sol au niveau de l'horizon P₂

(Pour chaque date d'échantillonnage prise séparément, la même lettre indique que les moyennes ne sont pas significativement différentes avec le test de Fisher-Snedecor à un niveau de probabilité de 95 %.)

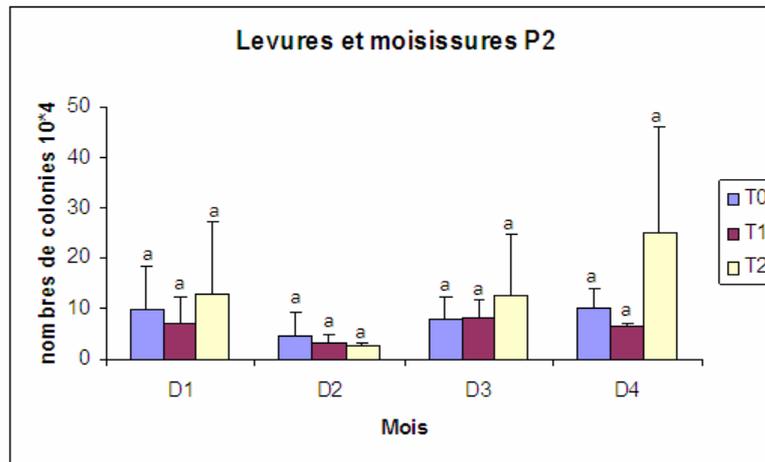


Figure 6 : Effet de l'épandage des margines sur les levures et moisissures du sol au niveau de l'horizon P_2

(Pour chaque date d'échantillonnage prise séparément, la même lettre indique que les moyennes ne sont pas significativement différentes avec le test de Fisher-Snedecor à un niveau de probabilité de 95%.)

Comme ça été obtenu au niveau de P_1 , aucune différence significative n'a été observée ni pour le nombre de la flore totale que sur les levures et moisissures durant les quatre mois d'essai au niveau de P_2 (**Figure 5 et 6**).

3-3. Effet des margines sur la teneur en matière organique au niveau de P_1 et P_2

Rappelons que généralement les margines sont des effluents à contenu organique allant de 2,5 à 10,5 % du volume total. Bien que cette teneur soit faible, elle pourrait constituer un stimulus de l'activité microbienne du sol.

Au niveau de l'horizon P_1 l'apport de la matière organique des margines (**Figure 7**) étant faible et semble n'avoir aucun effet ni sur la flore totale, ni sur le nombre des levures et moisissures du sol qui demeurent inchangé comme démontré précédemment. Il en est de même pour l'horizon P_2 (**Figure 8**).

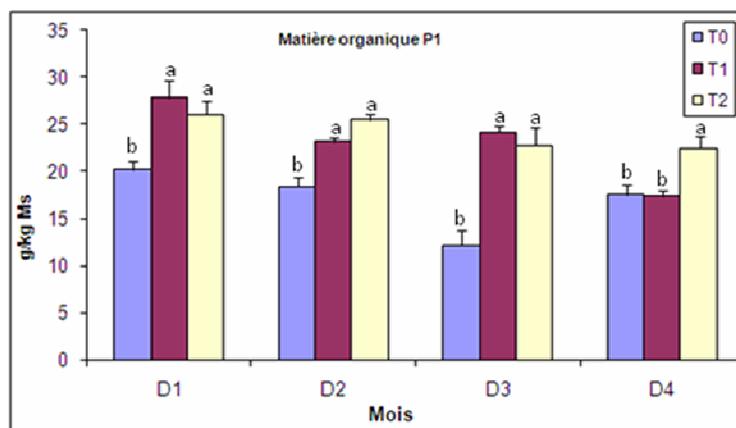


Figure 7 : Effet de l'épandage des margines sur la matière organique du sol au niveau de l'horizon P_1

(Pour chaque date d'échantillonnage prise séparément, la même lettre indique que les moyennes ne sont pas significativement différentes avec le test de Fisher-Snedecor à un niveau de probabilité de 95%.)

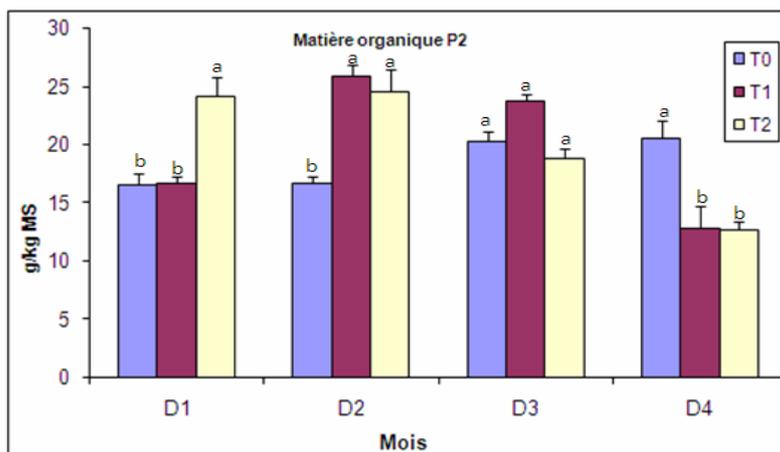


Figure 8 : Effet de l'épandage des margines sur la matière organique du sol au niveau de l'horizon P_2

(Pour chaque date d'échantillonnage prise séparément, la même lettre indique que les moyennes ne sont pas significativement différentes avec le test de Fisher-Snedecor à un niveau de probabilité de 95 %.)

3-4. Discussion

L'analyse des deux hypothèses I et II nous a révélé que :

- Les phénols provenant des margines sont soit dégradés, soit réorganisés au cours du deuxième mois,
- L'apport de la matière organique des margines n'a pas modifié l'activité microbienne du sol.

Toutefois, d'après la littérature les margines induisent soit une intensification de l'activité microbienne du sol [6-10], ou son inhibition [11]. Dans le cas de notre essai, les faibles quantités de phénol mesurées au premier mois D_1 en P_1 et P_2 semblent n'avoir aucun effet inhibiteur sur l'activité microbienne du sol. L'hypothèse I est par conséquent rejetée.

L'apport de la matière organique des margines n'a engendré aucune intensification de l'activité microbienne du sol. L'hypothèse II est donc rejetée.

Il semble que les doses appliquées de margines n'ont induit aucune modification de l'activité microbienne des sols traités. Les hypothèses posées initialement pourraient être vérifiées pour des doses plus importantes, considérée excessives et contre indiquées pour l'épandage des margines.

Ces résultats montrent qu'il y a eu une dégradation naturelle de la matière organique et des phénols des margines ajoutées, tout en tenant compte des doses appliquées et de la période de l'épandage. Il semble que la migration des margines, particulièrement du phénol, au-delà de 40 cm de profondeur serait écartée. Néanmoins, nous rejoignons l'hypothèse de [12] qui suggère que les phénols s'organisent avec la matrice du sol notamment le complexe argilo-humique, et les différentes chaînes carbonées qui les supportent et ils forment ainsi une architecture qui leur permet de s'organiser avec les édifices humiques du sol sans altérer les propriétés d'échange.

4. Conclusion

Les résultats expérimentaux ont révélé que les phénols provenant des margines ont été dégradés ou réorganisés au cours du deuxième mois après l'épandage et que l'apport de la matière organique des margines n'a engendré aucun effet négatif sur l'activité microbienne du sol, de ce faite ni activation, ni inhibition de l'activité de la microflore du sol n'ont été constatées suite à l'épandage des doses étudiées.

Les résultats obtenus par le présent travail sur les effets microbiologiques des margines sur le sol ont montré que l'épandage de ces effluents n'ont pas des incidences environnementales négatives sur les terres agricoles. Des doses plus importantes que celles étudiées et qui sont d'ailleurs considérées excessives et non recommandées, pourraient engendrer des répercussions non désirables.

Références

- [1] - C. SAIZ-JIMENEZ, in "International Symposium on Olive By-products valorization", Sevilla, Spain, (1986) 61-76
- [2] - A. NEFZAOUI et M. ZIDANI, "Les sous-produits de l'olivier", Ed. Institut de l'Olivier, Sfax, Tunisie (1987).
- [3] - E. MORENO, J. PEREZ, A. Ramos CORMENZANA and J. MARTINEZ, *Microbios.*, 51 (1987) 169 - 174.
- [4] - L. BERNDT, J. A. Fiestas Ros De URSINOS, K. GEISSEN, M. KACHOURI, E. KLIMM, G. L. De MONPEZAT and D. XANTHOULIS, "Les expériences méditerranéennes dans le traitement et l'élimination des eaux résiduaires des huileries d'olives", Ed. Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ) (1996).
- [5] - I. D. HATZIPAVLIDES, G. SERVIS, C. TZERKIS and C. BALIS, in: "Eighth Congress of Greek Society of Biological Sciences", Icannina, Greece, (1986).
- [6] - V. MARSILIO, L. Di GIOVACCHINO, M. SOLINAS, N. LOMBARDO and C. BRICCOLI-BATI, *Acta. Hort.*, 286 (1990) 493-496.
- [7] - AFNOR, "Qualité de l'eau", Ed. AFNOR, Paris (1999)
- [8] - J. RODIER, "L'analyse de l'eau", Ed. DUNOD (1996).
- [9] - AFNOR, "Qualité de sol", Ed. AFNOR, Paris (1999)
- [10] - M. KOTSOU, I. MARI, K. LASARIDI, I. CHATZIPAVLIDIS, C. BALIS and A. KYRIAKOU, *Appl. Soil. Ecol.*, 26 (2004) 113-121.
- [11] - B. MECHRI, H. CHEHEB, O. BOUSSADIA, F. ATTIA, F. BEN MARIEM, M. BRAHAM, M. HAMMAMI, *Environ. Exper. Bot.*, 2 (2010) 184-191.
- [12] - G. L. De MONPEZAT, in "les expériences méditerranéennes dans le traitement des eaux résiduaires des huileries d'olives" Ed. Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ) (1996).